

# ABS



# ACTA BIOLOGICA SLOVENICA

VOL. 63 ŠT. 1 LJUBLJANA 2020

prej/formerly BIOLOŠKI VESTNIK

ISSN 1408-3671  
UDK 57(497.4)

izdajatelj/publisher  
Društvo biologov Slovenije

# **ABS** ACTA **BIOLOGICA** **SLOVENICA**



**VOL. 63 ŠT. 1 LJUBLJANA 2020**

**prej/formerly BIOLOŠKI VESTNIK**

**ISSN 1408-3671**  
**UDK 57(497.4)**

**izdajatelj/publisher**  
**Društvo biologov Slovenije**

Acta Biologica Slovenica

Glasilo Društva biologov Slovenije – Journal of Biological Society of Slovenia

Izdaja – Published by

Društvo biologov Slovenije – Biological Society of Slovenia

Glavna in odgovorna urednica – Editor in Chief

Alenka Gaberščik, e-mail: [alenka.gaberscik@bf.uni-lj.si](mailto:alenka.gaberscik@bf.uni-lj.si)

Tehnična urednica – Managing Editor

Jasna Dolenc Koce, e-mail: [jasna.dolenc.koce@bf.uni-lj.si](mailto:jasna.dolenc.koce@bf.uni-lj.si)

Uredniški odbor – Editorial Board

Robert Zorec (SLO), Matija Gogala (SLO), Alenka Malej (SLO),  
Livio Poldini (I), Mark Tester (AUS), Nejc Jogan (SLO), Mihael J. Toman (SLO),  
Franc Janžekovič (SLO), Branko Vreš (SLO), Boris Sket (SLO), Franc Batič (SLO),  
Hubert Potočnik (SLO), Georg A. Janauer (A), Doekele G. Stavenga (NL)

Naslov uredništva – Address of Editorial Office

Acta Biologica Slovenica, Večna pot 111, SI-1001 Ljubljana, Slovenija

<http://bijh.zrc-sazu.si/abs/>

Zasnova oblikovanja – Design

Žare Vrezec

ISSN 1408-3671 (Tiskana izdaja - Printed edition)

ISSN 1854-3073 (Spletna izdaja - Web edition)

UDK 57(497.4)

Natisnjeno – Printed: 2020

Tisk – Print: Nonparel d.o.o., Škofja Loka

Naklada: 350 izvodov

Cena letnika (dve številki): 15 € za posameznike, 42 € za ustanove

Številka poslovnega računa pri Ljubljanski banki: 02083-142508/30

Acta Biologica Slovenica je indeksirana v – is indexed in: CAB Abstracts, Web of Knowledge – Thomson Reuters

**Vrednotenje velikosti populacij sviščevega mravljiščarja *Phengaris alcon* (Lepidoptera: Lycaenidae) in status njegove ogroženosti na zahodnem delu Ljubljanskega barja**

Evaluation of the population size of Alcon Blue *Phengaris alcon* (Lepidoptera: Lycaenidae) and its conservation status in western part of Ljubljansko barje

Mitja Močilar<sup>a</sup>, Rudi Verovnik<sup>b\*</sup>

<sup>a</sup>Robova 10, 1360 Vrhnika, Slovenija

<sup>b</sup>Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo,

Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, Slovenija

\*correspondence: rudi.verovnik@bf.uni-lj.si

**Izvleček:** Na območju zahodnega dela Ljubljanskega barja, smo pregledali vse do sedaj znane lokacije sviščevega mravljiščarja in območja, kjer smo iz satelitskih posnetkov prepoznali potencialno primeren življenjski prostor za to vrsto. Sviščevega mravljiščarja smo potrdili le na območju med Vrhniko in Ligojno. Vrsta se pojavlja na dveh habitatnih krpah, ki sta med seboj oddaljeni 300 metrov. Velikost populacij smo ocenili s pomočjo metode MRR (mark-release-recapture) in s metodo štetja jajčec na hranilnih rastlinah močvirskih sviščev. Kljub majhni oddaljenosti med habitatnima krpama ni prišlo do izmenjave osebkov, smo pa posamezne osebkove opazili tudi izven obeh poseljenih krp. Z MRR metodo smo določili dnevno velikost populacije na habitatni krpi A med 50 in 130 osebkov, na B pa približno 50 osebkov. Z metodo štetja jajčec, smo ocenili velikost populacije na obeh krpah na približno 30 osebkov. Ugotovili smo, da je gostota jajčec in odraslih osebkov na večji habitatni krpi manjša, dnevne velikosti populacij pa so bile večje na večji habitatni krpi. Glavni razlog za tako razporeditev je v pomanjkanju hranilnih rastlin na manjši krpi, saj so bili v času cvetenja močvirskega svišča vsi sosednji travniki pokošeni. Ugotovili smo tudi, da samice za odlaganje jajčec raje uporabljajo rastline bolj v sredini krpe. Poleg košnje v neprimernem času, sta glavna ogrožajoča dejavnika fragmentiranost življenjskega prostora in hidromelioracijski ukrepi, ki dolgoročno zmanjšujejo nivo podtalnice na tem območju, kar vpliva na habitat vrste.

**Ključne besede:** *Phengaris alcon*, razširjenost, naravovarstvo, ogroženost

**Abstract:** We surveyed all known historical sites and potential suitable habitats of Alcon Blue based on satellite images in the western part of Ljubljansko barje. The species was present only in the area between Vrhnika and Ligojna. In this area two habitat patches were occupied by Alcon Blue at the distance of 300 meters. The population size was determined with MRR (mark-release-recapture) method and egg counting method on the host plants the Marsh Gentians. Even though the habitat patches

are relatively close to each other, we have not observed any migrations between them. However, we recorded some individuals outside both habitat patches. The MRR method gave us the estimate of daily population sizes for habitat patch A between 50 and 130 individuals, and approximately 50 for patch B. Total estimated size of population A and B was around 30 individuals according to egg counting method. We determined that the density of the eggs and adult specimens was smaller and daily population sizes were larger on the bigger habitat patch. The main reason for this observation is probably the shortage of host plants on the smaller habitat patch, because all surrounding meadows were mowed during the flowering of the Marsh Gentians. We also observed that the females prefer to oviposit nearer to the centres of the habitat patches. Besides mowing during the flight period, the two main factors that negatively affect the population Alcon Blue in the studied area, are habitat fragmentation and hydro-melioration measures that permanently lower the levels of groundwater which changes the species habitat.

**Key words:** *Phengaris alcon*, distribution, conservation, threats

## Uvod

Sviščev mravljiščar *Phengaris alcon* (Denis in Schiffermüller, 1775) spada v velikostni razred manjših metuljev z prepoznavno sinje modro obarvanostjo zgornje strani kril pri samcih (Kudrna in Fric 2013). V Evropi je uvrščen v kategorijo verjetno ogroženih vrst (NT) (Van Swaay s sod. 2010), vendar mu novejšje raziskave pripisujejo status ranljive vrste (VU) (Maes s sod. 2019). V Sloveniji je vrsta ogrožena (EN) (Uredba o posebnih... 2004), zavarovana pa sta tako življenjski prostor kot tudi osebkovi te vrste (Pravilnik o uvrstitvi... 2002)

Območje razširjenosti sviščevega mravljiščarja sega preko osrednje Azije do zahodne Sibirije, lokalno pa je razširjen tudi po celotni Evropi (Tshikolovets 2011). Za vrsto sta značilni dve ekološki formi, ki so jih še do nedavnega obravnavali kot dve ločeni vrsti, in sicer f. *alcon*, ki poseljuje predvsem mokrotne travnike, ter f. *rebeli*, ki je vezana na suha travnišča (Sielezniew s sod. 2012). Formi sta genetsko enaki (Bereczki s sod. 2005, Steiner s sod. 2006), razlikujeta pa se v stopnji genske variabilnosti. Forma *rebeli* je manj polimorfna, kar je najverjetneje odraz habitata v katerem živi (hrboviti predeli z večjim številom naravnih preprek, kar pogosteje povzroča izoliranost populacije) (Sielezniew s sod. 2012).

Vrste rodu *Phengaris* imajo kratko obdobje letenja med poletjem, pri sviščevem mravljiščarju se ta razlikuje med formama, f. *alcon* navadno leti od sredine junija do sredine julija, f. *rebeli* pa en

meseč kasneje (Árnyas s sod. 2009). V Sloveniji je fenologija drugačna, saj se f. *rebeli* v nižinah začne pojavljati že pred f. *alcon*, kar pa je verjetno pogojeno z zgodnejšim začetkom cvetenja sviščev na tem območju (Verovnik s sod. 2012). Obe formi imata velik nabor hranilnih rastlin, iz rodov *Gentianella* in *Gentiana*, in gostiteljskih vrst mravelj iz rodu *Myrmica*. Nekatere od teh vrst so značilne za obe formi, druge pa le za posamično (Als s sod. 2002, Tartally s sod. 2019). Obe formi se v Sloveniji pojavljata lokalno, vendar njuna skupna razširjenost obsega veliko območje vse od Goriškega na vzhodu, do Kraškega roba in doline Soče na zahodu. Pomembnejša območja razširjenosti, kjer so bile opažene tudi lokalno številčne populacije, so na nekaterih Dinarskih kraških poljih, na obrobju Ljubljanskega barja in v vzhodnem delu Goriškega (Verovnik s sod. 2012). V naši raziskavi smo preučevali formo *alcon*, ki je bila že opažena na zahodnem delu Ljubljanskega barja.

Sviščev mravljiščar se pogosto pojavlja v geografsko ločenih in izoliranih populacijah, zaradi česar redko prihaja do prenosa genskega materiala med njimi (Hoverstadt in Novicki 2008). Odrasli osebkovi so izrazito vezani na habitat larvalnih stadijev metulja in večino časa preživijo v okolici hranilnih rastlin gosenic. Ta območja, ki jih imenujemo domači okoliš ali »home range«, so pri sviščevem mravljiščarju velika v povprečju 320 m<sup>2</sup> (Korösi s sod. 2008). Odrasli osebkovi sviščevega mravljiščarja le redko migrirajo izven habitatnih krp in še to le v primeru, da je habitatna

krpa na homogenem in prehodnem območju brez gozdnih ali drugih ovir (Ovaskainen 2004). Visoka vegetacija (npr. mejice) in večje oddaljenosti med habitatnimi krpami pogosto vodita v popolno izoliranosti lokalnih populacij (Maes s sod. 2004).

Preživetje sviščevega mravljiščarja je povezano s prisotnostjo larvalne hranilne rastline (različne vrste svišcev in sviščevcev) ter gostiteljske vrste mravlje (najpogosteje *Myrmica scabrinodis*) (Sielezniew s sod. 2012). Posledično je vrsta izjemno občutljiva že na manjše spremembe v življenjskem prostoru, ki vplivajo na prisotnost hranilnih rastlin in gostiteljskih vrst mravelj. Če k temu dodamo še nizko stopnjo disperzije, to povečuje verjetnost izumrtja izoliranih lokalnih populacij (Rodrigues s sod. 2010). Poglavitni razlog za vse večjo ogroženost mravljiščarjev v Evropi, je fragmentacija njihovih naravnih habitatov, kot posledica opuščanja tradicionalnega kmetijstva, ki vodi bodisi v opuščanje in zaraščanje, ali pa intenzifikacijo rabe travnišč (Kostrakiewicz-Gieralt 2013).

Namen naše raziskave je bil ugotoviti razširjenost in oceniti velikost populacij sviščevega mravljiščarja (f. *alcon*) na območju zahodnega dela Ljubljanskega barja, ter opredeliti dejavnike ogrožanja. Na tem območju je bila vrsta najdena na več lokalitetah v času popisov za atlas dnevnih metuljev Slovenije (Verovnik s sod. 2012, Verovnik, lastna opažanja). Raziskati smo želeli preference samic pri odlaganju jajčec ter opredeliti dejavnike, ki ogrožajo preživetje te vrste na obravnavanem območju.

## Material in metode

Območje raziskave je obsegalo ekstenzivne vlažne travnike v zahodnem delu Ljubljanskega barja. Na območju med Staro Vrhniko in Ligojno (centroid: 45,9799607; 14,2949073), ter predelu zahodno od avtoceste in severno od vasi Sinja Gorica (centroid: 45,977462; 14,3214361), kjer je bila vrsta opažena pred več kot 20 leti (Verovnik s sod. 2012). Stanje teh močvirnih travnikov smo preverili s pomočjo orto foto posnetkov v aplikaciji Google Earth (Google 2002) in s terenskimi pregledi.

Velikost populacij sviščevega mravljiščarja smo ocenili s pomočjo dveh različnih metod. Uporabili smo standardno metodo MRR (mark-

-release-recapture) pri kateri popisovalec metuljev lovi, markira in s pomočjo že označenih metuljev pri ponovnem ulovu, izračuna dnevno velikost populacije. Delež že označenih metuljev predstavlja delež vseh ulovljenih metuljev v populaciji, na dan ulova. Velikost celotne populacije smo ocenili s pomočjo izračunanih dnevnih velikosti populacije. Za bolj verodostojno oceno velikosti populacije, smo uporabili še metodo štetja jajčec na hranilnih rastlinah (na tem območju so to izključno močvirski svišči *Gentiana pneumonanthe*), s katero popisovalec na osnovi števila jajčec oceni velikost populacije odraslih osebkov metulja (Nowicki s sod. 2008). Metoda temelji na predpostavki, da samica izleže v povprečju 80 jajčec (Maes s sod. 2004, Mouquet s sod. 2005). Tako lahko predpostavimo, da štirideset jajčec ustreza prisotnosti enega odraslega osebkov, saj sta za oploditev jajčec potrebna moški in ženski osebki (Kljun s sod. 2016). Pri tej metodi so odstopanja ocen od realne velikosti populacije navadno večja kot z metodo MRR, saj je možnost napake kot posledica manjše opaznosti jajčec veliko večja.

Na vsaki habitatni krpi smo opravili 15 obhodov v obdobju od 25. 6. 2016 do 18. 7. 2016, navadno v dopoldanskem času (med 9:00 in 12:00) pri čemer smo krpe pregledali v celoti s cik-cak obhodi travnikov. Odrasle osebkove smo lovili z metuljnico in jih označevali z zaporednimi številkami s pomočjo vodoodpornega flomastra na spodnjo stran zadnjega krila. Vsako točko ulova, smo zabeležili z GPS napravo za odčitavanje koordinat. Pri vsakem obhodu smo pregledovali tudi sosednje travnike, saj smo tako ugotavljali prisotnost metuljev okoli habitatnih krp. Štetje jajčec in hranilnih rastlin smo opravili 20. 7. 2016, na koncu obdobja pojavljanja odraslih osebkov.

## Rezultati

Velik del preiskovanega območja smo lahko takoj izločili iz raziskave, saj so bili travniki košeni prezgodaj, ali pa so bili intenzivno pašeni ter gnojeni. Na območju severno od Sinje Gorice na znani lokaciji za vrsto nismo našli nobene hranilne rastline, kar je verjetno posledica zaraščanja, saj travnik na katerem so se nekoč pojavljali močvirski svišči ni bil košen že vsaj 10 let. Na travnikih med Staro Vrhniko in Ligojno, smo našli dve

krpi poseljeni s sviščevim mravljiščarjem, ki sta med seboj oddaljeni približno 300 metrov (Sl. 1). V neposredni bližini poseljenih krp jih je bilo še šest

s prisotno hranilno rastlino močvirskim sviščem, vendar smo na njih v celotnem popisu opazili le šest posamičnih osebkov sviščevega mravljiščarja.

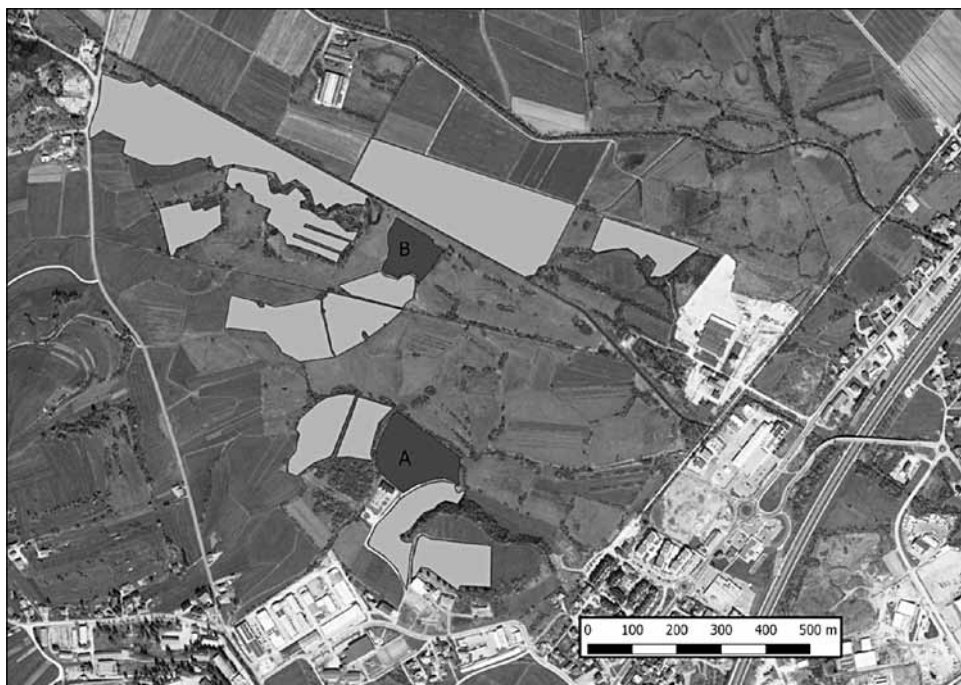


**Slika 1:** Pojavljanje sviščevega mravljiščarja (*Phengaris alcon*) (temneje označeni travniki) ter potencialna območja razširjenosti vrste – prisotnost hranilne rastline gosenic močvirskega svišča (svetlejšje označeni travniki) severno od Vrhnike. Najdbe posamičnih osebkov vrste so označene z belimi točkami.

**Figure 1:** Occurrence of Alcon Blue (*Phengaris alcon*) (darker colour) and potential range - presence of larval host plant Marsh Gentian (lighter color) north of Vrhnika. Single records of Alcon Blue are denoted by white dots. Habitat patches are denoted by letters A and B.

Velikost habitatne krpe A je 19116 m<sup>2</sup>, habitatne krpe B pa 11981 m<sup>2</sup>. V okolici habitatne krpe B so prisotni travniki s hranilno rastlino, ki predstavljajo potencialni habitat sviščevega mravljiščarja. Večina teh travnikov, pa tudi ostalih v širši okolici poseljenih krp, je bilo pokošenih v

času pred začetkom terenskega dela ali med njim (Sl. 2) in tako niso primerni kot habitat za larvalne stadije te vrste. Neoznačeni travniki niso primerni za naselitev metulja bodisi zaradi intenzivne rabe, ali pa v manjši meri zaradi zaraščenosti, saj visoka vegetacija povsem zaduši rast močvirskega svišča.



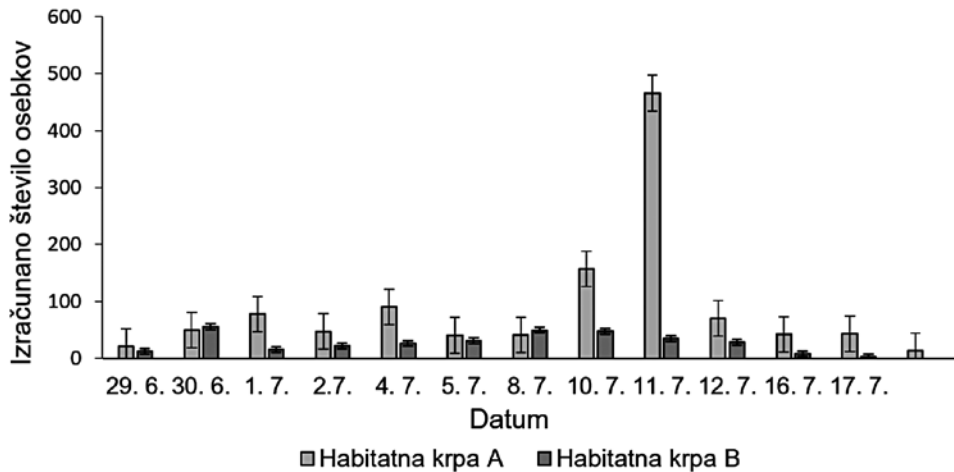
**Slika 2:** Travniki pokošeni pred ali med terenskim delom (svetlejša območja) na območju severno od Vrhnike. Krpe s sviščevim mravljiščarjem (*Phengaris alcon*) so označene s temno barvo. Habitatski krpi sta označeni z črkama A in B.

**Figure 2:** Meadows mowed before or during fieldwork (lighter color) in the area north of Vrhnika. The patches with Alcon Blue (*Phengaris alcon*) are denoted by darker color. Habitat patches are denoted by letters A and B.

Na habitatski krpi A smo označili 73 osebkov (skupno število ulovov je bilo 135 osebkov), od tega 52 samcev in 21 samic. Dnevne velikosti (izračunana velikost populacij na dan ulova, na osnovi števila ponovno ujetih osebkov in neoznačenih osebkov) populacij, določene s MRR metodo, na krpi A so se gibale med 50 in 130 osebkov (Sl. 3). Ocena velikosti za vzorčenje 10. 7. močno izstopa, kar je povezano s slabim vremenom dan prej, zaradi česar v tem vzorčenju ni bilo ponovnih ulovov že markiranih osebkov. Z metodo štetja jajčec smo velikost celotne populacije na habitatski krpi A ocenili na 33 osebkov (obeh spolov), torej precej manj kot so ocene dnevnih velikosti populacij s MRR metodo.

Na habitatski krpi B smo označili 45 posamičnih metuljev (skupno število ulovov pa je 91). Od tega je bilo ujeta 31 samcev in 14 samic. Tudi pri ocenah dnevnih velikosti populacije z MRR metodo, na krpi B je prišlo do manjšega odstopanja ocene dnevnih velikosti populacije za vzorčenje 30. 6., kar je zopet povezano z odsotnostjo ponovnega ulova (Sl. 3). Sicer pa je razporeditev dnevnih velikosti pričakovana z maksimumom pojavljanja odraslih osebkov v začetku julija. Dnevno velikost populacije smo s to metodo ocenili na maksimalno 50 osebkov, kar je za 21 osebkov več, kot je ocena skupne velikosti populacije na podlagi štetja jajčec.





**Slika 3:** Ocena dnevnih velikosti populacije (metoda MRR) sviščevega mravljiščarja (*Phengaris alcon*) na habitatnih krpa A in B severno od Vrhnike s standardno napako.

**Figure 3:** Estimates of daily population sizes (MRR method) of the Alcon Blue (*Phengaris alcon*) on habitat patches A and B north of Vrhnika with standard error.

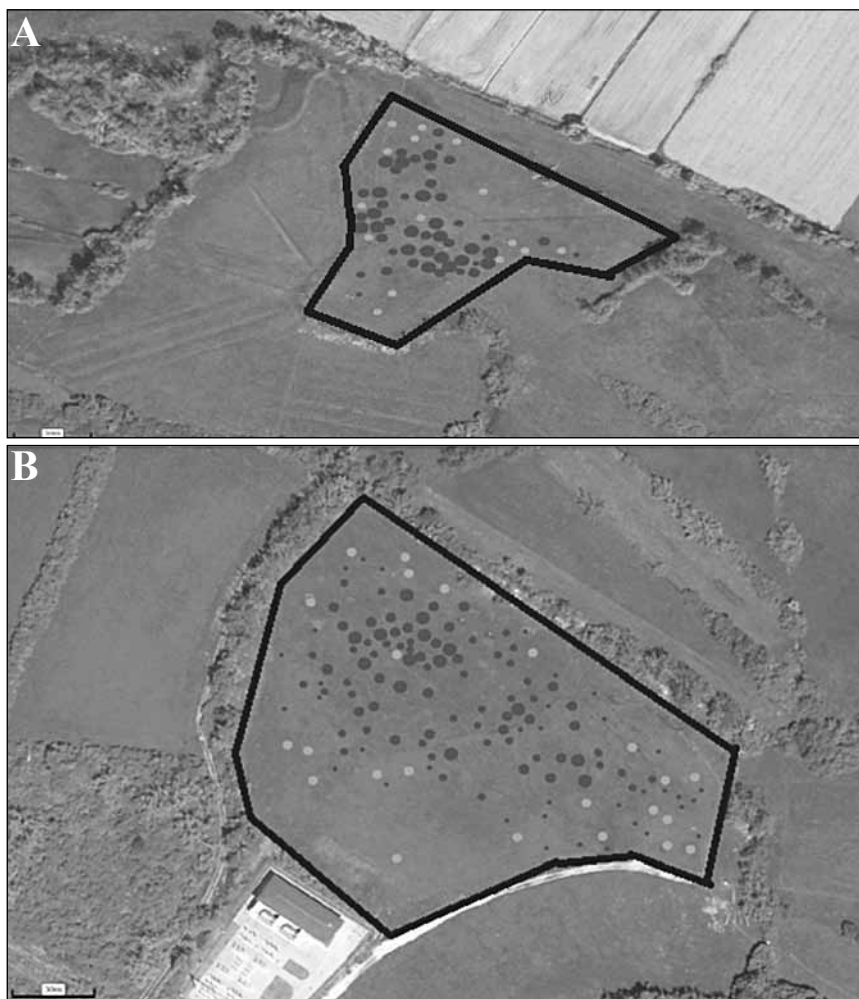
Skupno število najdenih hranilnih rastlin je bilo skoraj trikrat večje na habitatni krpi A, medtem ko je bilo število jajčec na obeh krpah približno enako (Tab. 1) Na habitatni krpi A je imelo 24 rastlin le po eno jajčece, 10 rastlin pa več kot dvajset (Sl. 5). Maksimalno število jajčec na eni

rastlini je bilo 61. Razporeditev rastlin z jajčeci na krpi A ni bila enakomerna, z rahlo zgoščenostjo na severovzhodnem in osrednjem delu (Sl. 4A). Rastline brez jajčec so skoraj v celoti omejene na obrobje travnika.

**Tabela 1:** Rezultati štetja hranilnih rastlin in jajčec na habitatni krpi A in B. Pri izračunu povprečnega števila jajčec smo upoštevali le svišče s prisotnimi jajčeci.

**Table 1:** Results of host plant and egg counts on habitat patches A and B. Only plants with eggs were taken into account for the calculation of the average values.

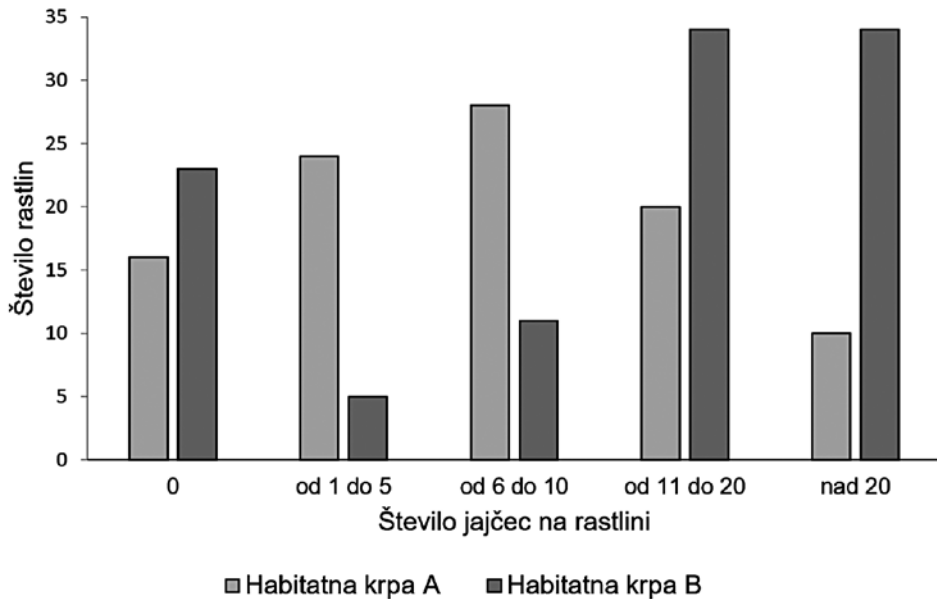
Habitatna krpa	Število hranilnih rastlin	Število jajčec	Število rastlin z jajčeci	Povprečno število jajčec na rastlino
A	167	1319	143	11
B	65	1149	50	23



**Slika 4:** Razporeditev hranilnih rastlin na habitatni krpi A in B. Svetle točke prikazujejo rastline, na katerih nismo našli jajčec, temne točke pa rastline z jajčeci. Premer temnih točk ponazarja velikostne razrede števila jajčec od najmanjše do največje: 1-5, 6-10, 11-20, več kot 20 jajčec.

**Figure 4:** Distribution of host plants on habitat patch A and B. Light dots denote plants without eggs, and dark dots indicate plants with eggs. The diameter of the dark dots indicates the size classes of the number of eggs from the smallest to the largest: 1-5, 6-10, 11-20, more than 20 eggs.

Na habitatni krpi B, je imelo 34 rastlin več kot 20 jajčec (Sl. 5), največ (125) pa jih je bilo na veliki rastlini na vzhodnem delu krpe. Tudi na tej krpi so bile rastline brez jajčec razporejene le na obrobju (Sl. 4B).



**Slika 5:** Primerjave gostote jajčec sviščevega mravljiščarja (*Phengaris alcon*) na hranilnih rastlinah med krpama A in B severno od Vrhnike.

**Figure 5:** Comparisons of the egg density of the Alcon Blue (*Phengaris alcon*) on host plants between plots A and B north of Vrhnika.

Migracij med obema poseljenima krpama nismo zasledili, čeprav sta med seboj oddaljeni le 300 metrov. To je toliko bolj presenetljivo, saj smo šest osebkov opazili izven habitatnih krp (Sl. 1) in sicer bolj na začetku obdobja pojavljanja odraslih osebkov, ko sosednji travniki s prisotnimi močvirskimi svišči še niso bili pokošeni. Med njimi je bil en osebek opažen približno 600 m od najbližje poseljene krpe (B). V primeru več ponovnih ulovov istega osebkov smo ugotovili tudi, da se posamezni metulji gibljejo le na manjšem delu habitatne krpe (Sl. 6), kar predstavlja njihov domači okoliš (Hoverstadt in Nowicki 2008).



**Slika 6:** Primeri območja gibanja (predstavljeni z obroči – »home range«) sviščevih mravljiščarjev (*Phengaris alcon*) na krpi A severno od Vrhnike za osebkke, ki so bili ulovljeni vsaj trikrat.

**Figure 6:** Example of home ranges of the Alcon Blue (*Phengaris alcon*) on habitat patch A north of Vrhnika for specimens caught at least three times.

## Razprava

Na zahodnem delu Ljubljanskega barja smo našli dve poseljeni habitatni krpi, s čimer smo potrdili obstoj sviščevega mravljiščarja na tem območju. Glede na dnevne ocene števila osebkov je preživetje vrste na tem območju možno, saj so potrdili dolgoročni obstoj tudi manj številčnih populacij (Nowicki s sod. 2005). Med obema poseljenima krpama nismo zasledili preletov osebkov, kar je najverjetneje povezano tudi z omejitvami uporabljene MRR metode in vzorčenjem omejenim na eno sezono. Oboje zmanjšuje verjetnost ponovnih najdb označenih osebkov. Vsekakor razdalja 300 m v pretežno travniški ravninski krajini ni velika ovira, saj najdaljši opaženi preleti v drugih raziskavah daleč presegajo to razdaljo (Schtickzelle in Baguette 2003).

Med raziskavo smo opazili šest osebkov izven stalno poseljenih krp, tudi v oddaljenosti 600 m od najbližje krpe. Vprašanje je, ali so ti osebki tja migrirali iz ene od obeh poseljenih krp, ali pa so se izlegli na travnikih kjer smo jih našli, saj so bile tudi tam prisotne hranilne rastline, ki pa so jih kasneje v času raziskave pokosili. Te najdbe nakazujejo velik potencial za ohranjanje sviščevega mravljiščarja na tem območju, kar bi lahko dosegli že zamikom košnje ekstenzivnih travnikov v drugo polovico avgusta.

Z raziskavo smo potrdili, da so sviščevi mravljiščarji slabo mobilni in imajo pogosto omejena območja gibanja znotraj habitatne krpe »home range«, kot so ugotovili tudi v raziskavi na Madžarskem (Korösi s sod. 2008), ter da so izrazito vezani na območja večjih gostot hranilnih rastlin. Večkrat ponovno ujeti osebki so se zadrževali le

na enem delu travnika, kar je glede na homogenost habitata vrste znotraj ene krpe, presenetljivo. Še bolj je presenetljiva odsotnost vrste na primernem travniku s hranilno rastlino vzhodno od krpe B, ki ju ločuje le manjši jarek z visokim stebličjem. Možno je, da ta travnik zaradi opuščanja košnje ni več primeren za gostiteljske mravlje iz rodu *Myrmica*. Znano je, da vrste iz rodu mravljiščarjev (*Phengaris* spp.) lahko zaznavajo prisotnost gostiteljskih mravelj s pomočjo kemičnih signalov (Wynhoff in Langevend 2017) in v odvisnosti od tega tudi odlagajo jajčeca.

Več kot dvakrat večja številčnost jajčec na hranilnih rastlinah na krpi B, v primerjavo s krpo A, je gotovo povezana s pomanjkanjem močvirskih sviščev v času letanja odraslih osebkov na tej krpi in v njeni okolici. Možno je, da so samice migrirale v krpo B tudi iz sosednjih travnikov, ki so bili prezgodaj pokošeni in tako dodatno povečale gostoto odloženih jajčec. Zagotovo velike gostote jajčec zmanjšujejo preživetju larvalnih stadijev metulja, saj se s tem povečuje kompeticija za omejene vire hrane – notranji deli cvetov svišča (Czekes s sod. 2014) in tudi povzroči prenaseljenost mravljišč gostiteljskih mravelj, ki lahko zaradi tega propadejo (Elmes s sod. 1996).

Življenjski prostor sviščevega mravljiščarja na zahodnem delu Ljubljanskega barja je v kritičnem stanju, saj vrsta poseljuje samo še dve manjši krpi z ustreznim režimom košnje. Če nekaj sezon, v kateri bi ti dve krpi pokosili v času letanja odraslih osebkov, bi lahko povzročila izumrtje te vrste na zahodnem delu Ljubljanskega barja in tudi širše v Ljubljanski kotlini. Vrsta je namreč na Gorenjskem izginila v zadnjem desetletju zaradi zraščanja in intenzifikacije rabe travnikov (Verovnik, lastna opažanja). Glavni ogrožajoči dejavnik preiskovane populacije je tudi v tem primeru izguba in fragmentacija habitata, ki je povezan z gospodarjenjem s travniki. Večinoma so travniki na območju severno od Vrhnike intenzivirani, gnojeni in košeni vsaj trikrat letno, nekaj najbolj močvirnih pa je opuščeni in se zaraščajo z visokim steblikovjem.

Slovenska zakonodaja je glede varstva in ohranjanja ogroženih vrst (Pravilnik o uvrstitvi... 2002; Uredba o posebnih... 2004) ustrezna in območje leži znotraj omrežja Natura 2000, le upoštevanje zakonskih normativom izostaja. Lastniki zemljišč pogosto niso niti seznanjeni

z naravovarstvenim statusom svojih zemljišč. V primeru sviščevega mravljiščarja na zahodnem delu Ljubljanskega barja, je tako nujno treba vzpostaviti kontakt z lastniki in se dogovoriti o spremembah režima košnje, gnojenja in uporabe pesticidov. Veliko bi naredili že, če bi prvo košnjo opravili v začetku junija, drugo pa zamaknili na konec avgusta, s čimer bi zagotovili cvetenje močvirskih sviščev v času letanja odraslih osebkov in tudi njihov začetni larvalni razvoj v cvetovih. Za ohranjanje vitalne populacije metulja, bi morali izvajati tudi sanitarne košnje z odstranitvijo biomase na zaraščujočih mokrotnih travnikih ter spremljati potencialne širitve močvirskega svišča na sosednje travnike. S povečanjem števila primernih krp bi tudi povečali pretok osebkov med njimi in s tem zagotovili bolj dolgoročen in stabilen obstoj sviščevega mravljiščarja na tem območju.

## Summary

Alcon Blue *Phengaris alcon* (Denis in Schiffmüller, 1775) is distributed from central Asia to west Siberia and locally throughout Europe (Tshikolovets 2011). Two ecological forms f. *alcon* and f. *rebeli* are recognised that are not genetically distinct despite ecological segregation (Bereckzki et al. 2005, Steiner et al. 2006). Both forms are widespread but local in Slovenia, present form the Goričko in the north-east to the Soča valley in the west (Verovnik et al. 2012). Because of the often geographically separated populations, low migration rate and limited home ranges, the gene flow among populations is usually low limiting their ability to adapt to environmental changes (Hoverstadt in Novicki 2008, Korösi et al. 2008). Their survival on a habitat patch depends on presence of their host plants (different species of *Gentiana* and *Gentianilla* genus) and the ant host, predominantly *Myrmica scabrinodis* in Europe (Sielezniev et al. 2012). Thus, they are extremely vulnerable to even minor changes in their habitat (Rodrigues et al. 2010). In Europe, they are mainly threatened by habitat fragmentation due to abandonment of traditional farming practices (Kostrakiewicz-Gieralt 2013). The species is considered vulnerable (VU) in Europe (Maes et al. 2019) and endangered (EN) in Slovenia (Uredba o posebnih... 2004). The aim of our study was

to determine the current status of populations of Alcon Blue in the western part of Ljubljansko barje region, to assess the main threats, and provide guidelines for its long-term survival.

Only two occupied habitat patches were located in the survey area both located between Stara Vrhnika and Ligojna only 300 m apart. Habitat patch A was larger with 19116 m<sup>2</sup> than habitat patch B with 11981 m<sup>2</sup> (Fig. 1). Additional habitat patches with host plant were present near habitat patch B but due to early mowing during the survey, only a few individuals were observed there (Fig. 1, 2). We used two methods to calculate the population size, the MRR (mark, release, recapture) and egg count method. Daily population sizes calculated by MRR method for habitat patch A were between 50-130 specimens and around 50 specimens for habitat patch B (Fig. 3). Egg count method gave much lower estimates of total population size of 33 and 30 specimens for habitat patches A and B respectively. A total of 167 gentians were recorded on habitat patch A and 65 on B, while the egg count was 1319 for A and 1149 for B. It is important to note that host plants without eggs were mainly distributed near the edges of the both habitat patches. The average number of eggs per plant was much higher on habitat patch B possibly due to lower host plant availability and untimely mowing of nearby potential habitat patches. Such high concentration of eggs reduces the viability of the population due to higher competition for limited food resources and in extreme cases demise of the host ant colonies (Elmes et al. 1996, Czekes et al. 2014).

## Literatura

- Als, T. D., Nash, D.R., Boomsma, J.J., 2002. Geographical variation in host-ant specificity of the parasitic butterfly *Maculinea alcon* in Denmark. *Ecological Entomology*, 27 (4): 403-414
- Árnyas, E., Bereczki, J., Toth, A., Varga, K., Pecsénye, K., Tartally, A., Kövics, G., Karsa, D., Varga, Z., 2009. Oviposition behaviour of *Maculinea alcon* (Lepidoptera: Lycaenidae) influenced by food-plant specialized aphids (*Aphis gentianae*) and fungal infection by *Puccinia gentianae*. *Ecological Entomology*, 34 (1): 1-25
- Bereczki, J., Pecsénye, K., Peregovits, L., Varga, Z., 2005. Pattern of genetic differentiation in the *Maculinea alcon* species group (Lepidoptera, Lycaenidae) in Central Europe. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 43 (2): 157-165
- Czekes, Z., Marko, B., Nash, D., Ferencz, M., Lazar, B., Rakosy, L., 2014. Differences in oviposition strategies between two ecotypes of the endangered myrmecophilous butterfly *Maculinea alcon* (Lepidoptera: Lycaenidae) under unic syntopic conditions. *Insect Conservation and Diversity*, 7(2): 122-131

No migrations between both habitat patches were recorded, however six specimens were recoded outside them even at distance of 600 m from the nearest patch. The home ranges were recorded for the specimens captured at least three times and were extremely small, always limited to a small fraction of the habitat patch, usually with high host plant density. Interestingly no butterflies were found venturing in neighbouring patches despite presence of host plants there and no obvious barriers. In some cases, the reason could be the absence of mowing which makes the meadows unsuitable for ant hosts.

Alcon Blue habitats north from Vrhnika are in critical condition, as only two habitat patches are mowed properly and if mowing regime changes the species is likely to disappear. However, minor changes in mowing regimes (not between mid-June and the end of August) of nearby meadows could largely improve the situation. The overgrown meadow could also be restored rather quickly, but majority of grasslands are intensified and would require long term effort to make them suitable for the species. As entire area is part of the Natura 2000 network and the species is protected by law in Slovenia (Pravilnik o uvrstitvi... 2002; Uredba o posebnih... 2004) at least the legislative tools are available. Lack of their implementation is however discouraging.

## Zahvala

Avtorja se za pomoč pri terenskem delu zahvaljujeva Maticu Kraševcu.

- Elmes, G., Clarke, R., Thomas, J., Hochberg, J., 1996. Empirical tests of specific predictions made from a special model of the population dynamics of *Maculinea rebeli*, a parasitic butterfly of the red and colonies. *Acta Oecologica*, 17: 61-80
- Google (2002): Google Earth, <https://www.google.com/intl/sl/earth/>, (6.5.2020)
- Hoverstadt, T., Nowicki, P., 2008. Investigating movement within irregularly shaped patches: analysis of Mark-Release-Recapture data using randomization procedures. *Israel Journal of Ecology and Evolution*, 54(1): 137-154
- Kljun, I., Zagoršek, T., Rome, T., Lončar, T., Ramšak, B., 2016. Estimation of current population status of the Alcon large blue *Phengaris alcon* (Denis in Schiffermüller, 1775) (Lepidoptera: Lycaenidae) in Bela krajina (SE Slovenia) based on egg counts. *Natura Sloveniae*, 18(1): 5-15
- Korösi, A., Orvössy, N., Batáry, P., Kövér, S., Peregovits, L.A., 2008. Restricted within-habitat movement and time-constraining egg laying of female *Maculinea rebeli* butterflies. *Oecologia*, 156(2): 455-464
- Kostrakiewicz-Gieralt, K., 2013. The effect of vegetation character on abundance and structure of sub-populations of rare herb species *Gentiana pneumonanthe*. *Polish journal of ecology*, 61(3): 35-46
- Kudrna, O., Fric, F., 2013. On the identity and taxonomic status of *Lycaena alcon rebeli* Hirschke 1905 - a long story of confusion and ignorance in the fabrication of the "ghost species" (Lepidoptera: Lycaenidae). *Nachrichten des Entomologischen Vereins Apollo*, 34(3): 117-124
- Maes, D., Wanreusel, W., Talloen, W., Van Dyck, H., 2004. Functional conservation units for the endangered Alcon Blue butterfly *Maculinea alcon* in Belgium (Lepidoptera: Lycaenidae). *Biological Conservation*, 120(2): 233-245
- Mouquet, N., Belrose, V., Thomas, J.A., Elmes, G.W., Clarke, R.T., Hochberg, M.E., 2005. Conserving community modules: a case study of the endangered lycaenid butterfly *Maculinea alcon*. *Ecology*, 86(12): 3160-3173
- Nowicki, P., Settele, J., Henry, P., Woyciechowski, M., 2008. Butterfly Monitoring Methods: The ideal and the Real World. *Israel Journal of Ecology and Evolution*, 54(1): 69-88
- Nowicki, P., Settele, J., Thomas, A., Woyciechowski, M., 2005. A review of population structure of *Maculinea* butterflies. *Pensoft*, 2: 144-149
- Ovaskainen, O., 2004. Habitat-specific movement parameters estimated using mark-recapture data and a diffusion model. *Ecology*, 85(1) 242-257
- Rodrigues, C. M., Soares, P., Aranha, J., Seixas-Arnaldo, P., 2010. Characterization of *Maculinea alcon* population in the Alvão Natural Park (Portugal) by a mark-recapture method. *Research gate*: 404-408
- Schtickzelle, N., Baguette, M., 2003. Behavioural responses to habitat patch boundaries restrict dispersal and generate emigration-patch area relationships in fragmented landscapes. *Journal of Animal Ecology*, 72(4): 533-545
- Sielezniew, M., Rutkowski, R., Ponikwicka-Tyszko, D., Ratkiewicz, M., Dziekańska, I., Švitra, G., 2012. Differences in genetic variability between two ecotypes of the endangered myrmecophilous butterfly *Phengaris (=Maculinea) alcon* - the setting of conservation priorities. *Insect Conservation and Diversity*, 5(3): 223-236
- Steiner, F. M., Schlick-Steiner, B. C., Hottinger, H., Nikiforov, A., Moder, K., Christian E., 2006. *Maculinea alcon* and *M. rebeli* (Insecta: Lepidoptera: Lycaenidae) - one or two Alcon Blues? Larval cuticular compounds and egg morphology of East Austrian populations. *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien. Serie B für Botanik und Zoologie*, 107: 165-180
- Tartally, A., Nash, D.R., Varga, Z., Lengyel, S., 2019. Changes in host ant communities of Alcon Blue butterflies in abandoned mountain hay meadows. *Insect Conservation and Diversity*, 12(6): 492-500
- Tshikolovets, V. V., 2011. *Butterflies of Europe and the Mediterranean area*. Pardubice, CZ, Tshikolovets Publishing, 544 str.
- Ur. l. RS 2002. Pravilnik o uvrstitvi ogroženih rastlinskih in živalskih vrst v rdeči seznam. Uradni list RS 82(02): 8893-8975

- Ur. l. RS 2004. Uredba o posebnih varstvenih območjih (območjih Natura 2000). Uradni list RS 49(04): 6414-6472
- Van Swaay, C., Cuttelod, A., Collins, S., Maes, D., López Munguira, M., Šašić, M., Settele, J., Verovnik, R., Verstrael, T., Warren, M., Wiemers, M., Wynhoff, I., 2010. European Red list of butterflies. Publications Office of the European Union, Luxembourg, 47 str.
- Verovnik, R., Rebeušek, F., Jež, M., 2012. Atlas dnevnih metuljev (Lepidoptera: Rhopalocera) (Atlas faune et florae Sloveniae 3). Miklavž na Dravskem polju, Center za kartografijo favne in flore, 456 str.
- Wynhoff, I., van Langevelde, F., 2017. *Phengaris (Maculinea)* teleius butterflies select host plants close to *Myrmica* ants for overposition, but *P. nausithous* do not. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 165(1): 9-18





**Modularity of the dorsal and lateral view of the skull in  
the European ground squirrel**

Modularnost dorzalne in lateralne strani lobanje evropske tekunice

Tina Klenovšek

Department of Biology, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, University of Maribor,  
Koroška cesta 160, 2000 Maribor, Slovenia  
correspondence: tina.klenovsek@um.si

**Abstract:** Modular organization is a general characteristic of biological systems from cellular to organismal level. The mammalian skull is a complex structure that can in general be divided into two functional components, the neurocranium and the viscerocranium. The two-module organisation of the skull of the European ground squirrel *Spermophilus citellus* (Linnaeus, 1766) has already been confirmed on the ventral cranium, while different studies of integration and modularity of squirrel skulls in general gave mixed results. Studies using 2D geometric morphometrics capture and analyse different views of the skull separately, and often the ventral cranial view is considered as the most suitable. In this study, the hypothesis of the two-module organisation of the *S. citellus* skull was re-evaluated and confirmed also on the dorsal and lateral cranial view. Nevertheless, the lateral cranium was more integrated than the dorsal cranium. Allometry had almost no effect on the pattern of modularity. This and the previous study of the *S. citellus* skull modularity show that different cranial views can give different results. Advisably, all three views should be considered also because the lateral view of the skull shows morphological variation in the sagittal plane that is not visible along the frontal plane, when only the ventral and/or dorsal views are considered.

**Keywords:** Sciuridae, modular organization, cranium, RV coefficient, *Spermophilus citellus*

**Izvleček:** Modularna organizacija je splošna značilnost biotskih sistemov od nivoja celic do organizmov. Lobanja sesalcev je kompleksna struktura, ki jo lahko razdelimo v dve funkcionalni komponenti, nevrokranij in viscerokranij. Organizacija lobanje evropske tekunice *Spermophilus citellus* (Linnaeus, 1766) na dva modula je bila potrjena na ventralni strani lobanje, medtem ko različne raziskave integracije in modularnosti lobanje veveric na splošno dajejo različne rezultate. Raziskave, ki temeljijo na dvo-dimenzionalni geometrijski morfometriji, ločeno zajemajo in analizirajo različne strani lobanje in pogosto obravnavajo ventralno stran lobanje kot najbolj primerno. V tej raziskavi je bila modularna organizacija lobanje *S. citellus* ponovno ovrednotena in potrjena tudi na dorzalni in lateralni strani lobanje. Vendar je bila stopnja integracije lateralne strani bolj izrazita kot dorzalne. Alometrija ni imela skoraj nobenega vpliva na vzorec modularnosti. Ta in predhodna raziskava modularnosti lobanje *S. citellus* kažeta, da lahko različne strani lobanje dajo različne rezultate. Iz tega sledi,

da je priporočljiva obravnava vseh treh strani lobanje, tudi zato, ker je z lateralne strani lobanje vidna morfološka variabilnost v sagitalni ravnini, medtem ko lahko pri analizi samo ventralne in/ali dorzalne strani zajamemo variabilnost samo v frontalni ravnini.

**Ključne besede:** Sciuridae, modularna organizacija, kranij, RV koeficient, *Spermophilus citellus*

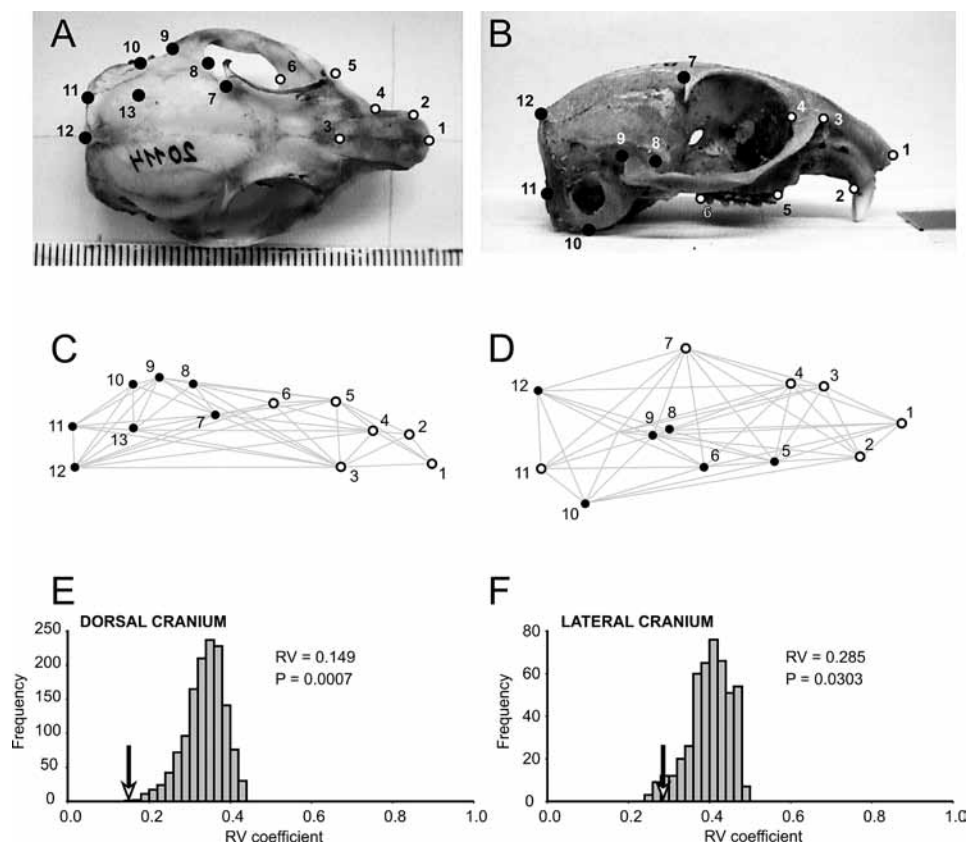
## Introduction

Modular organization is a general characteristic of biological systems and is present at all biological levels, from cells to whole organisms (Klingenberg et al. 2003). Modules are units with a high degree of internal integration because of functional, developmental, genetic or other interactions, which are relatively independent of other such units (Klingenberg 2008). Integration and modularity have been most frequently studied in mammal skulls (for review see Klingenberg 2013). The mammalian skull is a complex structure that can be divided into two functional components, the neurocranium, composed of the braincase, eyes and ears, and the viscerocranium, consisting of the jaw apparatus (Emerson and Bramble 1993). Nevertheless, some studies have supported a more complex six-module organisation of the mammalian cranium (for review see Felice et al. 2018). Most studies of mammal skull modularity and integration are performed using linear measurements (traditional morphometrics) or 3D geometric morphometrics of the whole cranium (e.g. Goswami 2006, Drake and Klingenberg 2010). In 2D geometric morphometrics, the ventral view of the cranium is very suitable for analyses (Klenovšek and Jojić 2016). Thus, the hypothesis of modularity of the European ground squirrel *Spermophilus citellus* (Linnaeus, 1766) was tested and confirmed only on the ventral cranium (Klenovšek 2014a). Modular organisation of the *S. citellus* skull was in contrast to previous findings claiming that squirrels have a highly integrated skull without clear subdivisions into subunits (Olson and Miller 1958, Roth 1996). The aim of this study was to re-evaluate the hypothesis of the two-module organisation of the *S. citellus* skull on the dorsal and lateral cranium. Also the effect of allometry, as a possible strong integrating factor that can counteract modularity (Klingenberg 2009), has been estimated.

## Material and Methods

Dorsal and lateral cranial views of *S. citellus* skulls were studied for modular organisation. The skulls originated from Burgenland (Austria) and Banat (Serbia) deposited in the Slovenian Museum of Natural History (Ljubljana, Slovenia), the Museum of Natural History (Vienna, Austria), and the Zoological Research Museum Alexander Koenig (Bonn, Germany). Juvenile (< 5 months old) and very old (after the fourth hibernation) individuals were not used in the study. The sample included 65 skulls of *S. citellus*, from which 64 (Banat: N=44; Burgenland: N=20) were studied from the dorsal and 62 (Banat: N=43; Burgenland: N=19) from the lateral cranial view. Both sides of the crania were photographed under constant conditions following the protocol described in Klenovšek (2014b). Thirteen landmarks were digitized on the dorsal (Fig. 1A) and 12 on the lateral (Fig. 1B) cranium using the tpsDig2 program (Rohlf 2015).

For each side of the skull, landmark coordinates of all individuals were aligned using the Generalized Procrustes Analysis (GPA) (Rohlf and Slice 1990). GPA standardizes size and removes the differences in landmark configurations due to position and orientation. GPA also separates size and shape information. Shape information is retained in the form of Procrustes coordinates, which are shape variables containing the complete information on shape variation in the sample after superimposition. Because sexual shape dimorphism is not present in the skull of *S. citellus* (Klenovšek and Kryštufek 2013, Ramos-Lara et al. 2014) the sexes were pooled. Also the two populations were pooled to increase the number of studied objects compared to the number of shape variables (26 and 24 variables for dorsal and lateral crania, respectively) despite known significant shape differences between the populations (Klenovšek and Kryštufek 2013).



**Figure 1:** Dorsal (A) and lateral (B) cranial views of the *S. citellus* skull with 13 and 12 landmarks, respectively, divided into two hypothesized modules (black dots – neurocranium, white dots – viscerocranium). Adjacency graphs for the dorsal (C) and lateral (D) crania showing landmark partitions to the two subsets with the smallest RV coefficient. Histograms of the RV coefficients for all spatially contiguous partitions of landmarks into two subsets for the dorsal (E) and lateral (F) cranium. The values of RV coefficients observed for the partition into viscerocranial and neurocranial regions are indicated by arrows. P-values present proportion of partitions with RV lower than or equal to the a priori hypothesis.

**Slika 1:** Dorzalna (A) in lateralna (B) stran lobanje *S. citellus* s 13 in 12 oslonilnimi točkami razdeljenimi na dva hipotetična modula (črne pike – nevrokranij, bele pike – viscerokranij). Žični graf za dorzalno (C) in lateralno (D) stran lobanje za delitvijo oslonilnih točk na dve podskupini z najmanjšim RV koeficientom. Histogram RV koeficientov vseh prostorsko sosednjih delitev konfiguracij oslonilnih točk za dorzalno (E) in lateralno (F) stran lobanje. Vrednosti RV koeficientov med hipotetičnima moduloma (viscerokranijem in nevrokranijem) so označene s puščico. P vrednosti predstavljajo delež delitev na podskupine z nižjim RV koeficientom kot tistim za hipotetična modula.

To correct the data for the effect of population affiliation, the pooled within-populations covariance matrix could be used (Klingenberg 2009). Because this method assumes that the groups have the same covariance matrix, the Box's M test for the equality of covariance matrices was performed

(SPSS Statistics 2008). The Box's M test was carried out on the first 15 Principal Components that explained 95.4 % and 95.8 % of total variance in the dorsal and ventral cranium, respectively. The differences between covariance matrices were not statistically significant either for the dorsal

or lateral crania. Therefore, the pooled within-populations covariance matrices were computed for each cranial view by subtracting differences between the population means (Klingenberg 2009).

To re-evaluate the hypothesis of modularity of the *S. citellus* skull (Klenovšek 2014a), landmark configurations of the dorsal and lateral cranium were divided into subsets describing the anterior (viscerocranium) and posterior (neurocranium) parts of the skull (Fig. 1). The degree of covariation between the hypothesized modules was compared to all alternative spatially contiguous partitions with the same number of landmarks as in the hypothesized modules (Klingenberg 2009).

The strength of association between the subsets of landmarks was estimated with the Escoufier RV coefficient (Escoufier 1973), which represented the amount of covariation scaled by the amount of variation within the two subsets of variables. The RV coefficient takes the value of zero if the two sets of variables are completely uncorrelated and the value of one if the two sets of variables are completely interdependent (Klingenberg 2009). If the hypothesis of modularity holds, the RV coefficient for the selected partition should be the lowest value, or at least near the lower extreme of the distribution of RV coefficients of all partitions (Klingenberg 2009). To estimate the effect of allometry on modularity, I repeated the analyses of modularity for each cranial view using residual data of a multivariate regression of Procrustes coordinates onto centroid size. All analyses of modularity were performed using the MorphoJ software (Klingenberg 2011).

## Results

The hypothesis of 2-module organization was confirmed both in the dorsal and lateral cranium. The RV coefficient obtained for the hypothesized partition into the viscerocranium and neurocranium was 0.149 for the dorsal cranium, and 0.285 for the lateral cranium. In the dorsal cranium, none of the 1352 alternative partitions to two subsets had a lower RV coefficient than the partition into the hypothesized modules. The hypothesized partition (Fig. 1A) was the same as the partition with the smallest RV coefficient (Fig. 1C). In the lateral cranium, 14 (or 3.037 %) of the 461 alternative

spatially contiguous partitions had a lower or equal RV coefficient. Partition to two subsets with the minimal covariation (Fig. 1D) was different from the hypothesized one (Fig. 1B).

To match the number of landmarks in all hypothesized modules, i.e. viscerocranium and neurocranium in dorsal and lateral view, landmark 13 (Fig. 1A) was omitted and the hypothesis of modularity in the dorsal cranium was repeated on 12 landmarks. The new RV coefficient was 0.219 and again none of the 453 alternative partitions to two subsets had a lower RV coefficient than the a-priori hypothesis.

To sum up, in both cranial views the covariation between the viscerocranium and neurocranium was significantly weaker than it would be expected for a random partition of the dorsal and lateral cranium into two parts with the pre-defined number of landmarks. This is illustrated in histograms of RV coefficients, where for both cranial views the hypothesized subdivisions to two modules were clearly in the lower extreme of the distribution of RV coefficients for the alternative partitions (Fig. 1E, F).

The allometry accounted for 6.65% ( $P < 0.0001$ ) and 4.20% ( $P = 0.0042$ ) of shape variation in the dorsal and lateral cranium, respectively. After the correction for allometry, the values of RV coefficients between the viscerocranium and neurocranium were 0.169 for the dorsal cranium, and 0.292 for the lateral cranium. In the dorsal cranium, the hypothesized partition was the same as the partition with the smallest RV coefficient. In the lateral cranium, 18 (or 3.905 %) of the 461 alternative spatially contiguous partitions had a lower or equal RV coefficient.

## Discussion

The hypothesis of two-module organisation of the dorsal and lateral view of the *S. citellus* skull was confirmed, which is in agreement with a previous study performed on the ventral cranium (Klenovšek 2014a). This is important because studies of integration and modularity in the Sciuridae family yielded mixed results. Olson and Miller (1958) and Roth (1996) claimed that squirrels have a highly integrated skull without clear subdivisions into subunits. Porto et al. (2013),

on the other hand, discovered that Sciuridae have compared to some other rodent families less integrated skulls, but modular organisation becomes more pronounced after removing size variability. Moreover, a skull is a complex three-dimensional structure, therefore most studies of skull modularity and integration use morphometric methods that consider the skull as a whole; e.g. traditional morphometrics uses linear measurements of the skull in all three dimensions, while the more sophisticated 3D geometric morphometrics uses landmarks on 3D scans of the skull. In 2D geometric morphometrics, skulls are photographed from different sides and analyses are performed separately for different views of the skull, from which the ventral view is mainly used (examples in Sciuridae: Roth 1996, Cardini and O'Higgins 2004, Klenovšek and Kryštufek 2013, Klenovšek 2014a). This is because the ventral cranium is genetically and functionally diverse (Caumul and Polly 2005), and due to its complexity, contains a large number of anatomical landmarks (Kryštufek et al. 2012). In this study, skull modularity of the lateral view was less obvious than that of the ventral and dorsal. In the lateral cranium, the two-subset partition with the minimal covariation (Fig. 1D) was different from the hypothesized partition to viscerocranium and neurocranium (Fig. 1B). Contrary to the hypothesis, the molar tooth row (LM 5 and 6) was in stronger covariation with the posterior part of the skull, while the base of the caudal supraorbital process (LM 7) and the occipital bone (LM 11) were in stronger covariation with the anterior part. In both ventral (Klenovšek 2014a) and dorsal cranial view (Fig. 1C), the hypothesized partition to viscerocranium and neurocranium had the lowest covariation compared to all alternative partitions to two subsets. Also, the difference in RV coefficients between the studied cranial views suggests that in *S. citellus* the lateral cranium is more integrated than the dorsal cranium. This was supported by higher RV values for all alternative partitions in the lateral (RV range up to approx. 0.5) compared to the dorsal cranium (RV range up to approx. 0.4) (Fig. 1F and 1E). Although allometry can be a strong integrating factor (Klingenberg 2009), it had very little influence on the pattern of modularity in *S. citellus*. After the correction for allometry, the values of RV coefficients between the viscerocranium and neurocranium were in all cranial

views a little higher than before the correction (this study and Klenovšek 2014a). Moreover, in the lateral cranium, the P-value slightly increased. This is contrary to findings of Porto et al. (2013), who discovered that modular organization becomes more pronounced after removing size variability.

Because the ventral and dorsal surfaces of the skull are opposite sides along the frontal plane, the 2D geometric morphometric analyses of these cranial views do not capture morphological variation in the sagittal plane. Addition of the lateral cranial view to studies of modularity and integration using 2D geometric morphometrics is valuable and meaningful; because it allows the analysis of morphological variation of the skull in the ventral-dorsal axis, which is in an additional dimension that is not observable in the frontal plane.

## Conclusions

1. The analysis of the covariation among landmarks in the dorsal and lateral cranium supported the hypothesis that in adult specimens of the European ground squirrels *S. citellus* the viscerocranium and neurocranium are separate modules.

2. Modular organisation of the dorsal and lateral view of the *S. citellus* skull was in agreement with a previous study performed on the *S. citellus* ventral cranium (Klenovšek 2014a).

3. Lateral cranium was more integrated than the dorsal cranium.

4. Allometry had almost no effect on the modularity of the dorsal and ventral cranium of the *S. citellus* skull.

5. In studies of modularity and integration using 2D geometric morphometrics, the lateral cranial view should be analysed together with the ventral or dorsal view, because it shows morphological variation in the sagittal plane or ventral-dorsal axis that is not visible along the frontal plane.

## Povzetek

Modularna organizacija je splošna značilnost biotskih sistemov od nivoja celic do organizmov. Lobanja sesalcev je kompleksna struktura,

ki jo lahko razdelimo v vsaj dve funkcionalni komponenti, nevrokranij in viscerokranij. Za lobanje veeveric naj bi bila značilna visoka stopnja integracije brez jasnih delitev na module (Olson in Miller 1958, Roth 1999). Medtem ko je novejša raziskava primerjave stopnje integracije in modularnosti lobanje med različnimi družinami sesalcev pokazala, da imajo veeverice v primerjavi z ostalimi glodavci manj integrirane lobanje (Porto et al. 2013). Organizacija lobanje evropske tekunice *Spermophilus citellus* (Linnaeus, 1766) na nevrokranij in viscerokranij je že bila potrjena na ventralni strani lobanje (Klenovšek 2014a). Namen pričujoče raziskave je bil ovrednotiti morfološko integracijo in modularnost lobanje tudi na dorzalni in lateralni strani. Ovrednotenih je bilo 65 lobanj odraslih osebkov *S. citellus*. Oblika dorzalne strani lobanje je bila opisana s 13 oslonilnimi točkami in lateralne strani lobanje z 12 (Slika 1A in 1B). Z delitvijo točk na nevro- in viscerokranij je bila postavljena hipoteza o modularni organizaciji lobanje. Analiza morfološke variabilnosti lobanje in s tem modularnosti je temeljila na metodah geometrijske morfometrije, ki konfiguracije oslonilnih točk poravnana s posplošeno Procrustovo analizo (GPA) in ki omogoča ločeno obravnavo velikosti in oblike objektov.

Moduli so notranje tesno povezani deli strukture, ki so med seboj relativno neodvisni. Hipoteza modularnosti (delitev lobanje na nevro- in viscerokranij) je bila testirana z izračunom stopnje kovariabilnosti med hipotetičnima moduloma. Stopnja kovariabilnosti se primerja z vsemi alternativnimi delitvami oslonilnih točk na dve podskupini z enakim številom točk, kot jih imata hipotetična modula. Hipoteza o modularnosti drži, če je kovariabilnost med hipotetičnimi moduli izrazito nižja kot med vsemi ostalimi alternativnimi delitvami točk na podskupine. Analiza je temeljila

na Escoufier RV koeficientu, ki obsega vrednosti od 0 do 1. Nižja kot je vrednost RV koeficienta, nižja je stopnja kovariabilnosti med hipotetičnima moduloma in večja je njuna neodvisnost z vidika morfološke variabilnosti. Če hipoteza o delitvi lobanje na dva modula drži, ima delitev na hipotetična modula v primerjavi v vsemi alternativnimi delitvami najnižjo vrednost RV koeficienta.

Hipotetična delitev na neuro- in viscerokranij lobanje *S. citellus* je bila potrjena tako na dorzalni kot na lateralni strani (dorzalno:  $RV = 0,149$ ;  $p < 0,001$  in ventralno:  $RV = 0,285$ ;  $p = 0,030$ ). Vendar je bila modularnost lateralne strani lobanje slabše izražena, saj je bila vrednost RV koeficienta višja v primerjavi z dorzalno stranjo in tudi 14 od 461 alternativnih delitev na dve podskupini (3.037%) je imela nižjo vrednost RV koeficienta kot hipotetična modula. Čeprav je alometrija lahko močan integracijski faktor, je imela zelo majhen vpliv na vzorec modularnosti.

Raziskave, ki temeljijo na dvo-dimenzionalni geometrijski morfometriji, ločeno zajemajo in analizirajo različne strani lobanje in pogosto obravnavajo samo ventralno stran lobanje zaradi njene kompleksnosti in relativne ploščatosti. Rezultati raziskave modularnosti lobanje *S. citellus* kažejo, da lahko različne strani lobanje dajo različne rezultate. Iz tega sledi, da je priporočljiva obravnava vseh treh strani lobanje, med drugim tudi zato, ker je z lateralne strani lobanje vidna morfološka variabilnost v sagitalni ravnini oziroma dimenziji, ki je z analizo samo ventralne in/ali dorzalne strani ne moremo zajeti.

## Acknowledgements

Funding for this research was provided through the Slovenian Research Agency (Grant P1-0403).

## References

- Cardini, A., O'Higgins, P., 2004. Patterns of morphological evolution in *Marmota* (Rodentia, Sciuridae): geometric morphometrics of the cranium in the context of marmot phylogeny, ecology and conservation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 82 (3), 385–407. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2004.00367.x>
- Caumul, R., Polly, P. D., 2005. Phylogenetic and environmental components of morphological variation: skull, mandible, and molar shape in marmots (*Marmota*, Rodentia). *Evolution*, 59, 2460–2472.
- Drake, A.G., Klingenberg, C.P., 2010. Large-scale diversification of skull shape in domestic dogs: disparity and modularity. *American Naturalist*, 175, 289–301.

- Emerson, S.B., Bramble, D.M., 1993. Scaling, allometry and skull design. In: Hanken, J., Hall, B.K. (eds.): *The Skull*. The University of Chicago Press, Chicago, pp. 384-416.
- Escoufier, Y., 1973. Le traitement des variables vectorielles. *Biometrics*, 29, 751-760.
- Felice, R. N., Randau, M., Goswami, A., 2018. A fly in a tube: Macroevolutionary expectations for integrated phenotypes. *Evolution*, 72 (12), 2580-2594.
- Goswami, A., 2006. Cranial modularity shifts during mammalian evolution. *American Naturalist*. 168, 270-280.
- Klenovšek, T., 2014a. Skull modularity of the European ground squirrel *Spermophilus citellus* (Linnaeus, 1766). *Acta Biologica Slovenica*, 57(1), 59-67.
- Klenovšek, T., 2014b. Priročnik za uporabo geometrijske morfometrije v biologiji. Fakulteta za naravoslovje in matematiko, Maribor.
- Klenovšek, T., Kryštufek, B., 2013. An ontogenetic perspective on the study of sexual dimorphism, phylogenetic variability, and allometry of the skull of European ground squirrel, *Spermophilus citellus* (Linnaeus, 1766). *Zoomorphology*, 132(4), 433-445.
- Klenovšek, T., Jojić, V., 2016. Modularity and cranial integration across ontogenetic stages in Martino's vole, *Dinaromys bogdanovi*. *Contributions to Zoology* 85(3), 275-289.
- Klingenberg, C.P., Mebus, K., Auffray, J.-C., 2003. Developmental integration in a complex morphological structure: how distinct are the modules in the mouse mandible? *Evolution and Development*, 5, 522-531.
- Klingenberg, C.P., 2008. Morphological integration and developmental modularity. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 39, 115-132.
- Klingenberg, C.P., 2009. Morphometric integration and modularity in configurations of landmarks: Tools for evaluating a-priori hypotheses. *Evolution and Development*, 11, 405-421.
- Klingenberg, C.P., 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*, 11, 353-357.
- Klingenberg, C.P., 2013. Cranial integration and modularity: insights into evolution and development from morphometric data. *Hystrix*, 24, 43-58.
- Kryštufek, B., Klenovšek, T., Bužan, E., Loy, A., Janžekovič, F., 2012. Cranial divergence among evolutionary lineages of Martino's vole, *Dinaromys bogdanovi*, a rare Balkan paleoendemic rodent. *Journal of Mammalogy*, 93, 818-825.
- Olson, E.C., Miller, R.L. 1958: *Morphological Integration*. University of Chicago Press, Chicago, 376 pp.
- Porto, A., Shirai, L. T., de Oliveira, F. B., Marroig, G., 2013. Size variation, growth strategies, and the evolution of modularity in the mammalian skull. *Evolution*, 67, 3305-3322. doi:10.1111/evo.12177
- Ramos-Lara, N., Koprowski, J.L., Kryštufek, B., Hoffmann, I.E., 2014. *Spermophilus citellus* (Rodentia: Sciuridae). *Mammalian Species*, 46 (913), 71-87. doi:10.1111/evo.12177
- Rohlf, F.J., 2015. The tps series of software. *Hystrix*, 26(1), 9-12. doi:10.4404/hystrix-26.1-11264.
- Rohlf, F.J., Slice, D.E., 1990. Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Zoology*, 39, 40-59.
- Roth, V.L., 1996. Cranial Integration in the Sciuridae. *American Zoologist*, 36, 14-23.
- SPSS Statistics, 2008. Version 17.0. IBM Corporation.





**On the systematic implication of foliar epidermal micro-morphological and venational characters: diversities in some selected Nigerian species of Combretaceae**

Mikromorfološke značilnosti listne povrhnjice in žilnatost listov ter implikacije za sistematiko: raznolikost izbranih nigerijskih vrst iz družine Combretaceae

Opeyemi Philips Akinsulire<sup>a\*</sup>, Olaniran Temitope Oladipo<sup>a</sup>, Oluwabanmi Christy Akinkunmi<sup>b</sup>,  
Oladipo Ebenezer Adeleye<sup>a</sup>, Akinwumi Johnson Akinloye<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Botany, Obafemi Awolowo University, Ile-Ife, Nigeria

<sup>b</sup>Department of Microbiology, Federal University of Technology, Akure, Nigeria

\*correspondence: opeyemibotanist@gmail.com, opeyemiakinsulire@gmail.com

**Abstract:** Foliar epidermal micro-morphology and venation patterns of eleven species representing four genera in the family Combretaceae revealed stable foliar anatomical characters that are diagnostic and are important in separating the taxa. Distinguishing characters of taxonomic significance in the cells and tissues structures of the species include epidermal cell shape, stomata type, stomata frequency, stomata index, trichome micro-morphology and frequency, areolation shape, vein micro-morphology as well as distribution of druses within areoles. Numerous epidermal striations on the abaxial surface of lamina are diagnostic for *Combretum zenkeri* while *C. platypterum* is distinctly separated from other taxa by the possession of staurocytic stomata in addition to the prominent anomocytic and/or anisocytic stomata. The simple unicellular non-glandular trichomes in the genus *Combretum* indicate a generic attribute classificatory for members of the genus. Druses within the areoles classify *C. platypterum*, *Terminalia catappa*, *T. superba* and *Quisqualis indica* within and across the genera studied. This study which is in line with most previous studies revealed that characters of epidermal micromorphology and venation patterns are important in the identification and separation of the taxa discussed, and that the placement of the species in each of their respective genus should be maintained.

**Keywords:** classification, Combretaceae, diagnostic, epidermal micromorphology, spot character, systematic, venation pattern

**Izvleček:** Mikromorfološkost listne povrhnjice in vzorec žilnatosti listov pri enajstih vrstah iz štirih rodov družine Combretaceae je pokazala, da anatomske lastnosti listov stabilne in pomembne za ločevanje taksonov. Taksonomsko pomembni razlikovalni znaki so oblika epidermalnih celic, tip in pogostost listnih rež, stomatalni indeks, mikromorfološkost trihomov, oblika areol, mikromorfološkost žil, razporeditev drusov v areolah. Za vrsto *Combretum zenkeri* so značilne številne epidermalne

proge na abaksialno stran listne ploskve. Vrsta *C. platypterum* ima poleg anomocitnega in/ali anizocitnega tipa še staurocitni tip rež in se jasno loči od ostalih taksonov. Za rod *Combretum* so značilni enocelični nežlezni trihomi. Druse v areolah imajo *C. platypterum*, *Terminalia catappa*, *T. superba* and *Quisqualis indica*. Raziskava prikazuje pomen mikromorfologije povrhnjice in žilnatosti za identifikacijo in ločevanje preučevanih taksonov in podpira uvrstitev v ustrezne rodove.

**Ključne besede:** Combretaceae, diagnostika, klasifikacija, mikromorfologija povrhnjice, pegavost, sistematika, žilnatost

## Introduction

The family Combretaceae belongs to the angiosperm order Myrtales. Gill (1988) reported that the genus consists of 20 genera and 600 species. Stace (2007) put the number of genera in the family at 23. Mabberley (2008) described the family as comprising trees, shrubs, lianas and mangroves largely distributed in tropical and subtropical Africa. The family is also wide spread in central and south America, southern Asia and northern Australia (Thiombiano et al. 2006). However, Gere et al. (2015) reported that Old world has the bulk of the species richness of the family. Gere (2013) also reported that the genus *Combretum* Loeffl. is the only infrageneric taxon. In West Africa, the family is represented by 9 genera with 72 species with the genus *Combretum* being the largest with 49 species (Gill 1988). Keay (1989) reported 25 species in the genus *Combretum* which are mainly straggling shrubs or lianas in Nigeria. Hutchinson and Dalziel (1958) showed that a number of species are indeterminate and occur in the south-eastern Nigeria. The family stands out economically for its ornamental value, with some species commercialized by florists worldwide. Others are cited in the literature as having pharmacological potential and being widely used as popular diuretics or antipyretics. A number of species exhibit antimicrobial, anti-haemorrhagic and antiulcer activities. The ethno-pharmacological importance of Combretaceae which include anti-inflammatory, anthelmintic, anti-bilharzias (anti-schistosomal), treatment of malaria, pain, dermatitis, diarrhea, Pneumonia, gonorrhoea, syphilis, hypertension and cancer have been reported (Baba-Moussa et al. 1999, Fyhrquist et al. 2002, Simon et al. 2003, Martini et al. 2004, Batawila et al. 2005, Couliadiati

et al. 2009). Some members of this family produce useful construction timber, such as *idigbo* from *Terminalia ivorensis* A. Chev. A comprehensive vegetative and reproductive morphological description of the eleven species considered in this study has previously been documented by Akinsulire et al. (2018a), while the wood anatomy of the eleven taxa has also been investigated by Oladipo et al. (2016). Other researchers (Carlquist 1988, Kishore et al. 1999, Tilney 2002, Jayeola et al. 2009, Jordaan et al. 2011, Ekeke et al. 2014, Akinsulire et al. 2018b) had also investigated the family but the family Combretaceae is a rather complex one. According to Jayeola et al. (2009), scientific diagnosis calls for a very sound knowledge of anatomical structures. There has been a call for the review of the present taxonomic status of the family Combretaceae. Though Oladipo et al. (2016) and Akinsulire et al. (2018a) reported on the wood anatomy and the vegetative and reproductive morphology respectively of the eleven species in this family, as well as Akinsulire et al. (2018b) on the leaf and petiole anatomy of the genus *Terminalia* L., one of the genera investigated in this paper, there are still gaps to be filled in our knowledge of the family. The taxonomy of the family Combretaceae is unresolved (Ekeke et al. 2015). A lot of conflicting identities exists in the Nigerian species with great morphological signs of introgression (Oladipo et al. 2016). The objective of this study therefore serves to increase our knowledge of the family Combretaceae, identify patterns of variation in the foliar epidermal characteristics and venation patterns of the species and assess their taxonomic value in delimiting members of the family, as well as serving as a follow-up research to those investigations of Oladipo et al. (2016) and Akinsulire et al. (2018a, b).

## Materials and methods

Foliar epidermal micro-morphology and venation patterns of 11 species representing four genera in the family Combretaceae in Nigeria were investigated using light microscopy since paucity of information exists on the topological properties of the leaf venation patterns and epidermal micro-morphology of the species and in relation to their taxonomy, thus these traits were far from being well understood. Similarly, the species were selected based on their complexities and their mistaken identities in their respective genus and based their unresolved taxonomy (Akinsulire et al. 2018), their large ecological distributions and on their usefulness in pharmacopeia and other great economic importance (Thiombiano 2005). The species are: *Combretum platypterum* Hutch. and Dals., *Combretum racemosum* P. Beauv., *Combretum zenkeri* Engl. and Diels., *Combretum dolichopetalum* Engl. and Diels., *Terminalia catappa* L., *Terminalia superba* Engl. and Diels., *Terminalia ivorensis* A. Chev., *Terminalia mantaly* H. Perr., *Terminalia avicennioides* Guill. and Perr., *Anogeissus leiocarpus* (DC.) Guill. and Perr. and *Quisqualis indica* Linn.

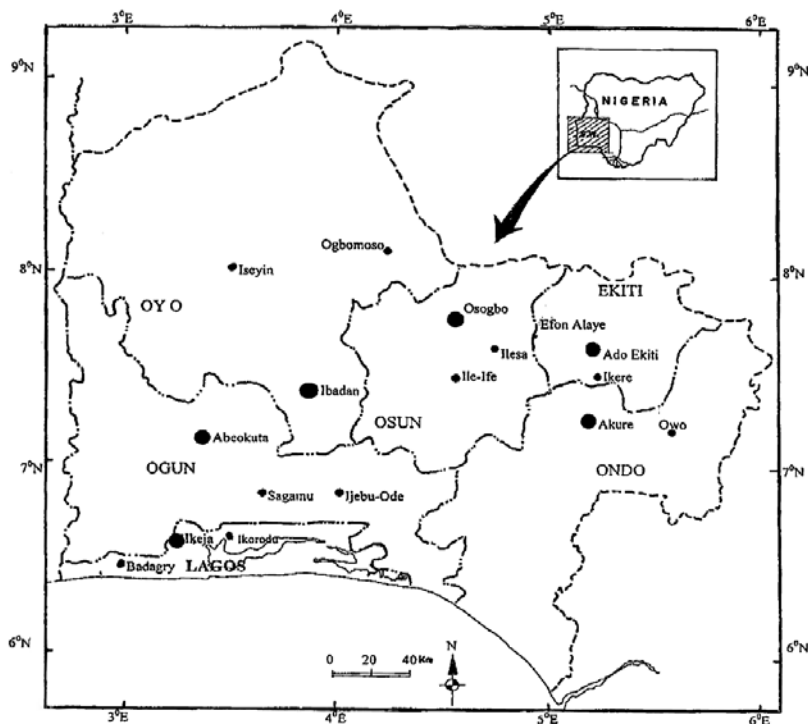
In addition to these, *A. leiocarpus* and *Q. indica* were selected because the two taxa represent the only West African monotypic genera in the family Combretaceae with their epidermal micro-morphology and venation patterns yet unstudied. Three to five matured and healthy accessions were collected for each of the 11 species while eight to 10 matured leaves were investigated in each of the accessions. All plants collected were in sunlit environments and collections were done during regular field trips to various parts of southwestern Nigeria (Fig. 1) and between April and June. The fresh leaf materials were preserved in formalin acetic-alcohol (FAA) (Formaldehyde 10%; Alcohol: 50%; Acetic acid: 5%; Water: 35%) solution. Sizeable portions from the leaves of the species were taken from standard median portion from each species and portions were put into nitric acid, in glass Petri-dishes, and kept in an oven at 60°C for 20 minutes. Each sample was then washed thoroughly in 4-5 changes of water. The adaxial and the abaxial epidermises were separated by means of fine forceps and dissecting needle. The epidermises were then stained in safranin O

solution, and counter stained in Toluidine blue for five minutes, washed with 4-5 changes of water to remove excess stain and then mounted in 25 % glycerol (containing thymol crystals to prevent fungal attack) on a clean glass slide for examination under a light microscope as previously documented (Akinsulire et al. 2018b, Jainab and Kensa 2018, Priya and Hari 2018, Shirsagar and Vaikos 2013, Sonibare et al. 2014). Both qualitative and quantitative characters of the epidermis (including spot characters), which could enhance the identification of the taxa were observed and documented. Stomata index was estimated for the two leaf surfaces using the formula below as proposed by Wilkinson (1979):

$$\text{Stomata index (I)} = S / (S + E) * 100$$

where S = number of stomata per unit area and E = number of ordinary epidermal cell in the same area.

The venation patterns of the species studied were obtained from the median portion of the leaf. The materials were decolourised by boiling in 90 % ethyl alcohol at 20 °C for about 10 - 15 minutes, then washed in 3-4 changes of water to remove all traces of alcohol. The portions were then transferred into 5 % Sodium Hydroxide and boiled for 20 minutes for further decolourization. The partially cleared leaves were further cleared in 5 % domestic bleach (sodium hypochlorate) for 20 - 30 minutes under the sunlight. The portions were again washed in 3-4 changes of water, stained in Safranin O solution and counter stained in Alcian blue (to enhance contrast), rinsed with water (to remove excess stain) before being mounted in 25 % glycerol containing thymol crystals to prevent fungal attack on a clean glass slide for examination under a light microscope (Akinsulire et al. 2018b, Jainab and Kensa 2018 Priya and Hari 2018, Sonibare et al. 2014). Qualitative assessments and terminologies were documented following Metcalfe and Chalk (1979) as well as Manual of Leaf Architecture by the Leaf Architecture Working Group (1999). All quantitative parameters were measured (per field of view with Leica Galen III microscope) using ocular micrometre while the measurements were converted to microns using the stage micrometre with respect to ocular constant and the objective with which the measurements



**Figure 1:** Map of Nigeria showing the sites of collection of plant specimens in southwest (Oladipo et al. 2016)  
**Slika 1:** Zemljevid Nigerije z označenimi mesti vzorčenja na jugovzhodu (Oladipo et al. 2016)

(readings) were taken. Quantitative data were further subjected to One Way Analysis of Variance while means were separated using Duncan Multiple Range Test to show the significant differences within each groups or genera as well as among members of the family.

## Results

Overall result of the qualitative and quantitative leaf epidermal micro-morphological and venational characters of the eleven species showed that the characters examined vary significantly ( $p < 0.05$ ) among the taxa while great affinities were also revealed (Tables 1 to 4). A list of the qualitative features are given in Tables 1 and 3 while Tables 2 and 4 shows the dimensions of leaf epidermis and venation in the eleven species as Figs. 2-4 provide photomicrographs of characteristic cells and tissues structures of the species. Spot

characters, diagnostic characters as well as other anatomical characters useful in the classification and identification of the taxa and which are good tools in the systematic assessment of members of the family Combretaceae investigated were all presented. Stomata in the family vary from anomocytic to anisocytic or staurocytic. There are variations in the sizes of stomata as well as lengths and widths of epidermal cells. The groupings and delimitation of members of the family agrees with most previous researches.

### *Combretum platypterum*

**Adaxial and abaxial leaf surfaces:** On the adaxial leaf surface, epidermal cells are polygonal with straight anticlinal walls, size vary between 15.0-27.5  $\mu\text{m}$  long and 7.5-17.5  $\mu\text{m}$  wide, 180-221 cells per field of view, periclinal walls striated, stomata absent. The leaf indumentum shows the pres-

ence of simple unicellular uniseriate non-glandular trichomes, sparsely distributed, frequency 0-4 per field of view (Fig. 2A) while on the abaxial leaf surface, epidermal cells are also polygonal but anticlinal walls ranges between straight to sinuous, size ranging between 12.50-30.00  $\mu\text{m}$  long and 7.50-20.00  $\mu\text{m}$  wide, 100-128 cells per field of view, periclinal walls striated, stomata anomocytic, sometimes staurocytic. Stomatal frequency about 14-43 per field of view, mean stomatal size up to  $20.75 \pm 0.34 \mu\text{m}$  long and  $14.50 \pm 0.29 \mu\text{m}$  wide, mean stomatal index 19.98%, simple unicellular uniseriate non-glandular trichomes are present, sparsely distributed, frequency 0-1 per field of view (Figs. 3A and A<sub>2</sub>).

**Venation pattern:** Venation is regular polygonal reticulate with well-developed areoles enclosing the veinlets. Areolar shape is triangular to hexagonal (3 to 6 - sided); size ranges between 250.00-580.00  $\mu\text{m}$  long and 180.00-400.00  $\mu\text{m}$  wide, veinlet endings are simple linear, branched or occasionally furcate, 0 - 2 per areole, druses are present in the areoles (Fig. 4A).

#### *Combretum zenkeri*

**Adaxial and abaxial leaf surfaces:** Epidermal cells are largely polygonal, anticlinal walls straight to undulating on the adaxial leaf surface while on the abaxial surface; the cells are irregular and largely covered with epidermal striations with undulating anticlinal walls. Cell size ranges between 10-30  $\mu\text{m}$  long and 7.5-17.5  $\mu\text{m}$  wide, 218-236 cells per field of view on the adaxial leaf surface but 89-118 cells per field of view, 12.50-30.00  $\mu\text{m}$  long and 10.00-20.00  $\mu\text{m}$  wide on the abaxial leaf surface. On the adaxial surface, periclinal walls are not striated, stomata are absent, simple unicellular non-glandular trichomes are present and trichomes frequency about 0-5 per field of view (Fig. 2B). However, on the abaxial leaf surface, periclinal walls are striated, stomata are anomocytic, stomatal frequency 19-36 per field of view, mean stomatal size up to  $14.25 \pm 0.26 \mu\text{m}$  long and  $7.00 \pm 0.23 \mu\text{m}$  wide, mean stomatal index is 21.83%, simple unicellular non-glandular trichomes are present, frequency 0-6 per field of view (Fig. 3B).

**Venation pattern:** Venation is regular polygonal reticulate, areoles are moderately developed and enclosing the veinlets, size ranging from 140.00-360.00  $\mu\text{m}$  long to 120.00-280.00  $\mu\text{m}$  wide, areolar shape triangular to hexagonal (3 to 6-sided), veinlet endings mostly simple linear, unbranched, 0 to 1 per areole, druses absent (Fig. 4B).

#### *Combretum racemosum*

**Adaxial and abaxial leaf surfaces:** The epidermal cells on adaxial surface are generally polygonal-with straight to slightly undulating anticlinal walls, size ranges between 12.5-35.0  $\mu\text{m}$  long and 10.0-22.5  $\mu\text{m}$  wide, cell number about 168-204 cells per field of view, periclinal walls not striated, stomata are absent, simple unicellular non-glandular trichomes present, frequency 0-1 per field of view (Fig. 2C), whereas on the abaxial leaf surface, epidermal cells are polygonal, anticlinal walls straight to slightly undulating, size ranging between 10.00-32.50  $\mu\text{m}$  long and 7.50-20.00  $\mu\text{m}$  wide, 115-161 cells per field of view, periclinal walls not striated, stomata anomocytic, stomata frequency 18-31 per field of view, mean stomata size up to  $16.50 \pm 0.28 \mu\text{m}$  long and  $9.38 \pm 0.25 \mu\text{m}$  wide, mean stomata index 16.57%, simple unicellular non-glandular trichomes are present, trichome frequency 0-4 cells (Fig. 3C).

**Venation pattern:** Venation is regular polygonal reticulate, areoles moderately developed, shape triangular to hexagonal (3 to 6-sided), and size varies from 450.00-840.00  $\mu\text{m}$  long and 150.00-630.0 0  $\mu\text{m}$  wide. Veinlet endings mostly linear occasionally branched or forked; number range from 1-3 per areole, druses absent (Fig. 4C).

#### *Combretum dolichopetalum*

**Adaxial and abaxial leaf surfaces:** On the adaxial lamina, epidermal cells are generally polygonal, anticlinal walls wavy to sinuous, size ranging between 20.0 – 35.0  $\mu\text{m}$  long and 10.0 – 22.5  $\mu\text{m}$  wide, 208 - 281 cells per field of view, periclinal walls not striated, stomata present, stomata anomocytic, stomata frequency

0 – 2, mean stomatal size  $12.88 \pm 2.42$   $\mu\text{m}$  long and  $7.75 \pm 1.48$   $\mu\text{m}$  wide, mean stomata index is 0.38%, simple unicellular non-glandular trichomes present, few or sparsely distributed, frequency 0 – 6 per field of view (Fig. 2D). Whereas on the abaxial lamina, epidermal cells are generally polygonal with sinuous anticlinal walls (sometimes straight), size ranging between 10.00 – 32.50  $\mu\text{m}$  long and 7.50 – 15.00  $\mu\text{m}$  wide, 206 – 245 cells per field of view, periclinal walls striated, stomata anomocytic, stomata frequency 7 – 66 per field of view, mean stomatal size is  $18.64 \pm 0.29$   $\mu\text{m}$  long and  $11.00 \pm 0.28$   $\mu\text{m}$  wide, mean stomata index is 13.01%, simple unicellular non-glandular trichomes present and are uniformly distributed, frequency 4 – 28 per field of view (Fig. 3D).

**Venation pattern:** Venation is regular polygonal reticulate, areoles moderately developed or fairly pixilate and random in arrangement, triangular to pentagonal in shape (3 to 5-sided), size ranges between 180.00 – 410.00  $\mu\text{m}$  long and 120.00 – 310.00  $\mu\text{m}$  wide, veinlet endings are mostly linear, occasionally branched, 0 to 3 per areole (Fig. 4D).

#### *Terminalia catappa*

**Adaxial and abaxial leaf surfaces:** On the adaxial lamina surface, epidermal cells are polygonal (triangular to pentagonal), sometimes irregular, anticlinal walls are straight to wavy, periclinal walls not striated, size ranges between 17.50–30.00  $\mu\text{m}$  long and 12.50–20.00  $\mu\text{m}$  wide, 186–226 cells per field of view, periclinal walls not striated, stomata anisocytic, stomata frequency 0–62 per field of view, mean stomata size up to  $10.25 \pm 2.15$   $\mu\text{m}$  long and  $6.25 \pm 1.31$   $\mu\text{m}$  wide, mean stomata index is 3.54% (Fig. 2E). On the abaxial leaf surface, epidermal cells are polygonal to irregular, size variable, ranging from 10.00–30.00  $\mu\text{m}$  long and 7.50–12.50  $\mu\text{m}$  wide, 196–305 cells per field of view, anticlinal walls largely wavy, sometimes sinuous, stomata anisocytic, 18–66 cells per field of view, mean stomatal size is  $17.50 \pm 0.48$   $\mu\text{m}$  long and  $8.50 \pm 0.28$   $\mu\text{m}$  wide, mean stomatal index is 11.06% (Fig. 3E).

**Venation pattern:** Venation in this taxa is dichotomous, areoles well developed and oriented in arrangement, size variable, ranging from 240.00–730.00  $\mu\text{m}$  long and 150.00–370.00  $\mu\text{m}$  wide, areolation shape triangular to pentagonal (3 to 3-sided). Veinlet endings are simple linear and branched or forked; 0–5 per areole, druses present in the areolar region, sparsely distributed (Fig. 4E).

#### *Terminalia superba*

**Adaxial and abaxial leaf surfaces:** On the adaxial, epidermal cells are irregular on with variable sizes ranging between 15.00–25.00  $\mu\text{m}$  long and 5.00 – 17.50  $\mu\text{m}$  wide, 116–248 cells per field of view, anticlinal walls straight to undulating, periclinal walls not striated stomata absent (Fig. 2F). On the abaxial, epidermal cells are irregular, anticlinal walls wavy to sinuous, cells variable in size, ranging from 12.50–32.50  $\mu\text{m}$  long and 7.50–15.00  $\mu\text{m}$  wide, 110–228 cells per field of view, stomata anomocytic, stomata frequency 18–52 per field of view, mean stomatal size  $17.88 \pm 0.42$   $\mu\text{m}$  long and  $9.63 \pm 0.38$   $\mu\text{m}$  wide, mean stomata index is 16.61% (Fig. 3F).

**Venation pattern:** Venation is regular polygonal reticulate, areoles well developed with occasional incompletely closed meshes, areole size variable, ranging from 240.00–600.00  $\mu\text{m}$  long and 200.00–290.00  $\mu\text{m}$  wide, triangular to hexagonal areolation shape. Veinlet endings largely linear or simple, occasionally branched or forked, 1 to 3 per areole, druses present in the areole but scanty (Fig. 4F).

#### *Terminalia ivorensis*

**Adaxial and abaxial leaf surfaces:** Epidermal cells are largely irregular on the adaxial surface, anticlinal walls sinuous, periclinal walls not striated, size ranges between 10.00–25.00  $\mu\text{m}$  long and 7.50–15.00  $\mu\text{m}$  wide, 206–292 cells per field of view, stomata absent (Fig. 2G). On the abaxial surface, the epidermal cells largely irregular, size ranges between 10.00–30.00  $\mu\text{m}$  long and 7.50–20.0  $\mu\text{m}$  wide, 201–289 cells per

field of view, anticlinal walls sinuous, periclinal walls not striated, stomata anomocytic, stomatal frequency 34–56 per field of view, mean stomatal size up to  $17.75 \pm 0.31$   $\mu\text{m}$  long and  $10.25 \pm 0.48$   $\mu\text{m}$  wide, mean stomatal index is 16.37%, simple unicellular non-glandular trichomes present, trichomes few or sparsely distributed, frequency 0–1 cell per field of view, trichomes occur only on the main vein epidermis (Fig. 3G)

**Venation pattern:** Venation in *T. ivorensis* is regular polygonal reticulate, areoles moderately developed and variable in size; ranges between 130.00–420.00  $\mu\text{m}$  long and 100.00–350.00  $\mu\text{m}$  wide, pentagonal to hexagonal in shape (4 to 6-sided), veinlet endings simple, linear, or occasionally branched, 0 to 2 per areole, druses absent (Fig. 4G).

#### *Terminalia mantaly*

**Adaxial and abaxial leaf surfaces:** The adaxial surface has epidermal cells that are largely polygonal with variable size, ranging between 20.00–40.00  $\mu\text{m}$  long and 10.00–22.50  $\mu\text{m}$  wide, 202–228 cells per field of view, anticlinal walls straight to undulating, periclinal walls not striated. Stomata anisocytic, stomata frequency 4–9 cells per field of view with more or less isodiametric,  $18.75 \pm 0.29$   $\mu\text{m}$  long and  $13.25 \pm 0.26$   $\mu\text{m}$  wide, mean stomatal index up to 2.92% (Fig. 2H). On the abaxial leaf surface, epidermal cells are mostly polygonal with straight to undulating anticlinal walls, size ranges between 15.00–37.50  $\mu\text{m}$  long and 7.50–17.50  $\mu\text{m}$  wide, 201–260 cells per field of view, periclinal walls not striated. Stomata anisocytic, 2–10 cells per field of view, size range ranges between  $20.25 \pm 0.44$   $\mu\text{m}$  long and  $12.88 \pm 0.42$   $\mu\text{m}$  wide, mean stomatal index up to 2.41% (Fig. 3H)

**Venation pattern:** Venation is dichotomous, areoles well developed, size ranges between 300.00–580.00  $\mu\text{m}$  long to 160.00–360.00  $\mu\text{m}$  wide, triangular to hexagonal (3 to 6-sided), veinlet endings linear, branched or occasionally furcated, 1 to 3 per areole, druses absent (Fig. 4H).

#### *Terminalia avicennioides*

**Adaxial and abaxial leaf surface:** Epidermal cells largely irregular to polygonal with varying sizes ranging from 10.00–30.00  $\mu\text{m}$  long and 7.50–20.00  $\mu\text{m}$  wide, 125–225 cells per field of view on the adaxial surface. Anticlinal walls are wavy, sometimes undulating, periclinal walls not striated. Stomata and trichomes are absent (Fig. 2I). Whereas, on the abaxial surface, epidermal cells are mostly polygonal with wavy anticlinal walls, size ranges between 12.50–30.00  $\mu\text{m}$  long and 7.50–20.00  $\mu\text{m}$  wide, 90–112 cells per field of view, periclinal walls not striated. Stomata anomocytic, stomatal frequency 51–69 cells per field of view, size ranges between  $16.75 \pm 0.26$   $\mu\text{m}$  long and  $8.00 \pm 0.23$   $\mu\text{m}$  wide, mean stomatal index is 37.86%. Simple, unicellular non-glandular trichomes present, sparsely distributed; trichome frequency 0–8 cells per field of view (Fig. 3I).

**Venation pattern:** Venation is regular polygonal reticulate, areoles well developed, triangular to hexagonal in shape (3 to 6-sided), and size ranges between 190.00 – 430.00  $\mu\text{m}$  long and 110.00 – 350.00  $\mu\text{m}$  wide. Veinlet endings mostly simple and linear, sometimes branched, 0 to 3 per areole, druses absent (Fig. 4I).

#### *Anogeissus leiocarpus*

**Adaxial and abaxial leaf surfaces:** Epidermal cells on the adaxial surface are largely polygonal, anticlinal walls undulating or wavy, size ranging between 10.00–25.00  $\mu\text{m}$  long and 5.00–12.50  $\mu\text{m}$  wide, 228–341 cells per field of view, periclinal walls not striated. Stomata generally absent, simple unicellular non-glandular trichomes present, abundant and uniformly distributed, trichomes frequency 7–20 per field of view (Fig. 2J), meanwhile on the abaxial surface, epidermal cells are generally polygonal, mostly hexagonal, anticlinal walls sinuous, cells vary in size, from 20.00–30.00  $\mu\text{m}$  long to 10.00–15.00  $\mu\text{m}$  wide, 124–158 cells per field of view, periclinal walls not striated, stomata anomocytic, stomatal frequency 36–51 per field of view of view, mean stomatal size  $14.13 \pm 0.27$   $\mu\text{m}$  long and  $7.50 \pm 0.00$   $\mu\text{m}$  wide, mean stomatal index is 22.84%, long simple unicellular



non-glandular trichomes present, frequency 1-7 per field of view (Fig. 3J).

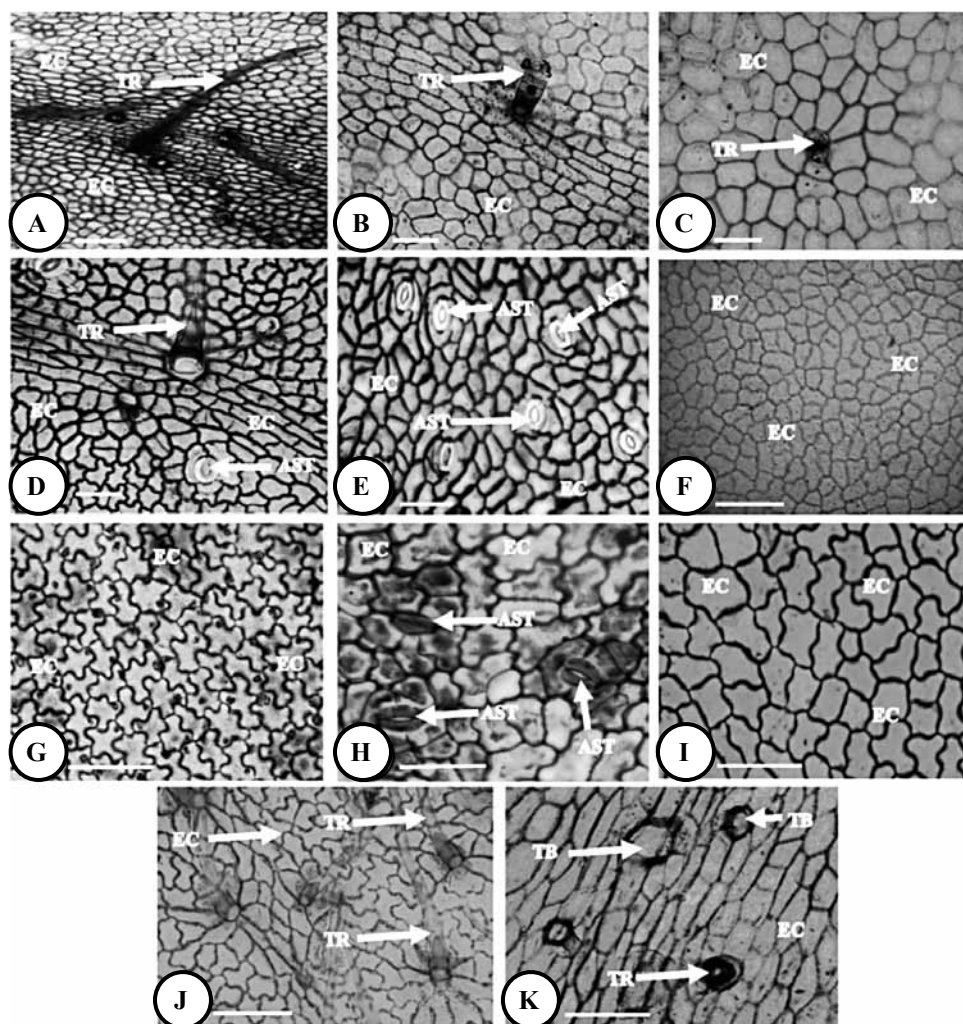
**Venation pattern:** Venation is alternate percurrent or regular polygonal reticulate, areole imperfectly formed, shape rectangular to hexagonal (4 to 6-sided), size ranges between 270.00-650.00  $\mu\text{m}$  long and 150.00-350.00  $\mu\text{m}$  wide. Veinlet endings mostly simple and linear, occasionally branched, 0 to 2 per areole, druses absent (Fig. 4J).

### *Quisqualis indica*

**Adaxial and adaxial leaf surfaces:** On the adaxial surface, the epidermal cells are polygonal, largely rectangular, anticlinal walls straight, rarely undulating, size ranges between 20.00-32.50  $\mu\text{m}$  long and 12.50-22.50  $\mu\text{m}$  wide, 126-150 cells per field of view, periclinal walls not striated. Stomata absent, simple unicellular non-glandular trichomes present, few or sparsely distributed and

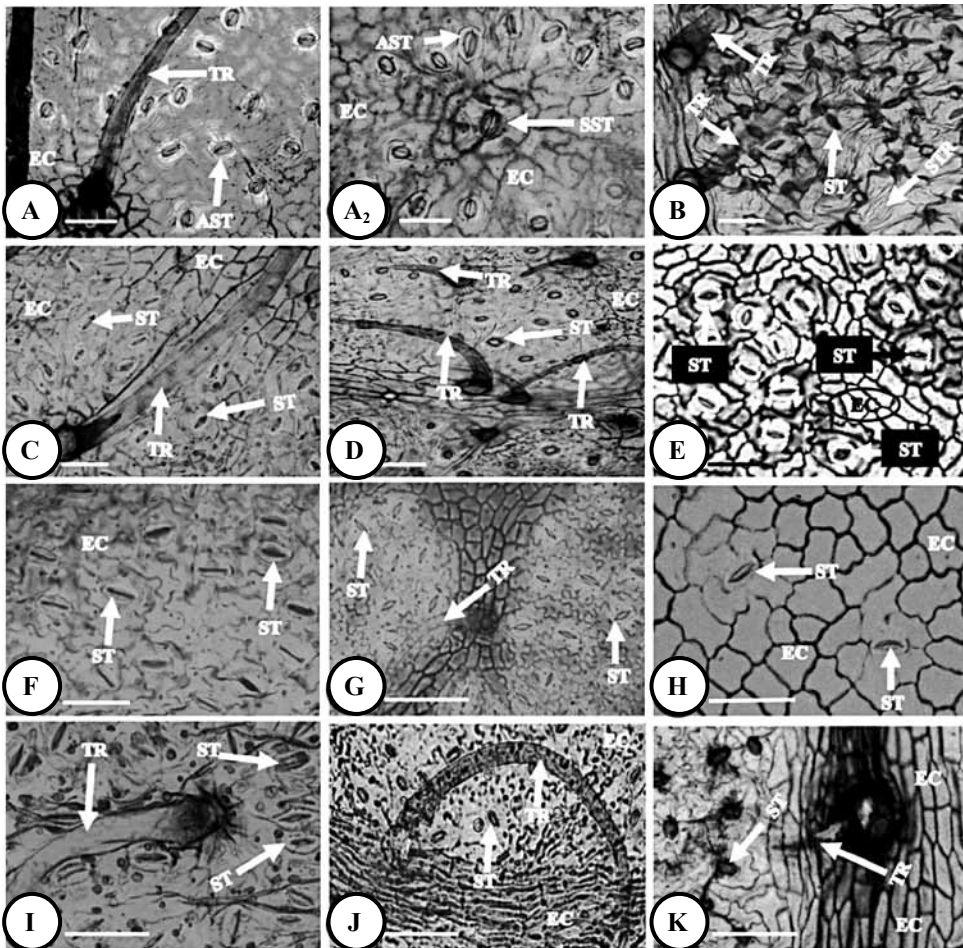
occur only on the main veins, trichome frequency 0-2 per field of view (Fig. 2K) whereas epidermal cells on the abaxial surface are largely polygonal, anticlinal walls slightly sinuous or straight, size ranges between 15.00-30.00  $\mu\text{m}$  long and 12.50-20.00  $\mu\text{m}$  wide, 128-164 cells per field of view, periclinal walls not striated. Stomata anomocytic, stomatal frequency 40-48, mean stomatal size is  $15.63 \pm 0.25$   $\mu\text{m}$  long and  $8.25 \pm 0.26$   $\mu\text{m}$  wide, mean stomatal index up to 23.07%, simple unicellular non-glandular trichomes present, frequency 0-2 cells field. (Fig. 3K)

**Venation pattern:** Venation is regular polygonal reticulate, areoles imperfectly formed, variable in shape, generally triangular to pentagonal (3 to 6-sided), size ranges between 200.00-550.00  $\mu\text{m}$  long and 130.00-370.00  $\mu\text{m}$  wide. Veinlet endings are simple and linear, sometimes branched, 0 to 3 per areole, druses present within the areoles but scanty (Fig. 4K)



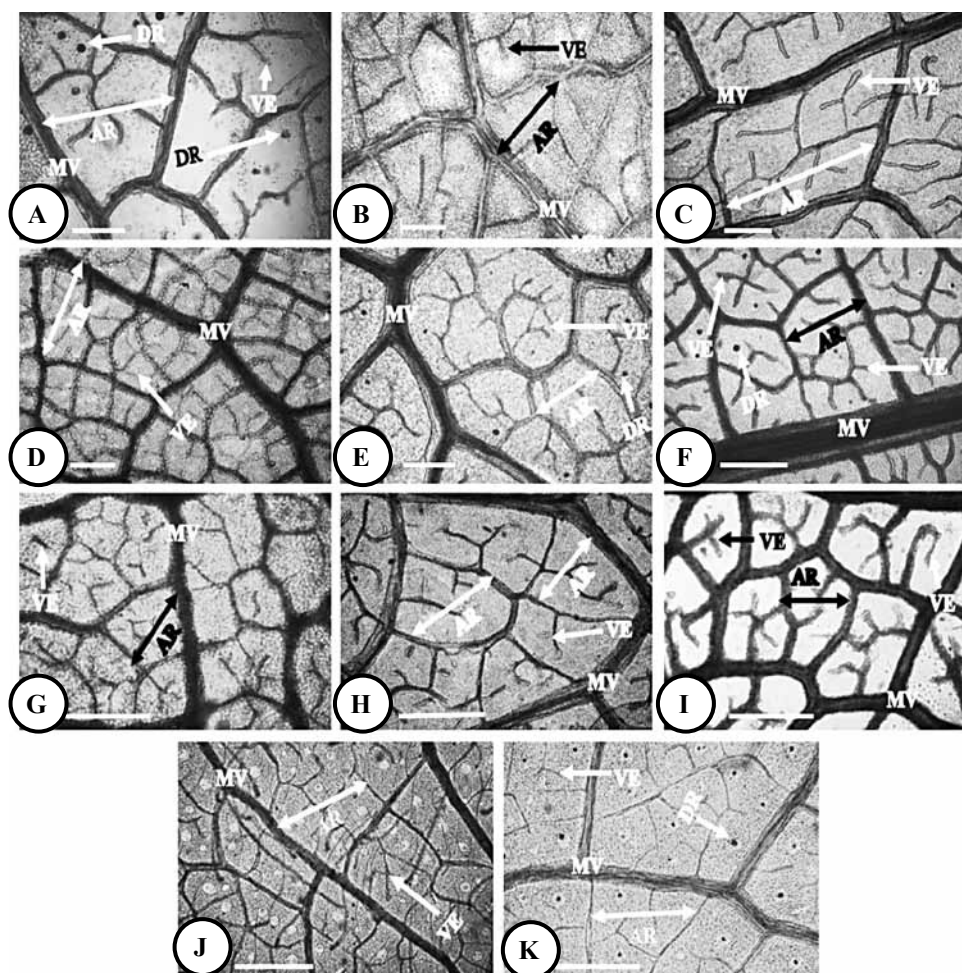
**Figure 2:** Leaf epidermal micro-morphology of the adaxial leaf surface of eleven species of Combretaceae. (A) *Combretum platypterum*, (B) *C. zenkeri*, (C) *C. racemosum*, (D) *C. dolichopetalum*, (E) *Terminalia catappa*, (F) *T. superba*, (G) *T. ivorensis*, (H) *T. mantaly* (I) *T. avicennioides*, (J) *Anogeissus leiocarpus*, (K) *Quisqualis indica*. Abbreviations: ST – stomata, TB - trichome base, AST - anomocytic stomata; EC - epidermal cell, TR – trichome, DR - druse.

**Slika 2:** Mikromorfologija adakksialne listne povrhnjice pri enajstih vrstah iz družine Combretaceae. (A) *Combretum platypterum*, (B) *C. zenkeri*, (C) *C. racemosum*, (D) *C. dolichopetalum*, (E) *Terminalia catappa*, (F) *T. superba*, (G) *T. ivorensis*, (H) *T. mantaly* (I) *T. avicennioides*, (J) *Anogeissus leiocarpus*, (K) *Quisqualis indica*. Okrajšave: ST – listna reža, TB – baza trihoma, AST – anomocitna reža; EC – celica povrhnjice, TR – trihom, DR - drus.



**Figure 3:** Leaf epidermal micro-morphology of the abaxial leaf surface of eleven species of Combretaceae. (A and A<sub>2</sub>) *Combretum platypterum*, (B) *C. zenkeri*, (C) *C. racemosum*, (D) *C. dolichopetalum*, (E) *Terminalia catappa*, (F) *T. superba*, (G) *T. ivorensis*, (H) *T. mantaly* (I) *T. avicennioides*, (J) *Anogeissus leiocarpus*, (K) *Quisqualis indica*. Abbreviations: ST – stomata, TB - trichome base, AST - anomocytic stomata; EC - epidermal cell, TR – trichome, DR - druse.

**Slika 3:** Mikromorfologija abaksialne listne povrhnjice pri enajstih vrstah iz družine Combretaceae. (A in A<sub>2</sub>) *Combretum platypterum*, (B) *C. zenkeri*, (C) *C. racemosum*, (D) *C. dolichopetalum*, (E) *Terminalia catappa*, (F) *T. superba*, (G) *T. ivorensis*, (H) *T. mantaly* (I) *T. avicennioides*, (J) *Anogeissus leiocarpus*, (K) *Quisqualis indica*. Okrajšave: ST – listna reža, TB – baza trihoma, AST – anomocitna reža; EC – celica povrhnjice, TR – trihom, DR - drus.



**Figure 4:** Venation patterns of eleven species of Combretaceae. (A) *Combretum platypterum*, (B) *C. zenkeri*, (C) *C. racemosum*, (D) *C. dolichopetalum*, (E) *Terminalia catappa*, (F) *T. superba*, (G) *T. ivorensis*, (H) *T. mantaly* (I) *T. avicennioides*, (J) *Anogeissus leiocarpus*, (K) *Quisqualis indica*. Abbreviations: MV - main vein, VE - veinlet ending, AR - areole.

**Slika 4:** Žilnatost listov pri enajstih vrstah iz družine Combretaceae. (A) *Combretum platypterum*, (B) *C. zenkeri*, (C) *C. racemosum*, (D) *C. dolichopetalum*, (E) *Terminalia catappa*, (F) *T. superba*, (G) *T. ivorensis*, (H) *T. mantaly* (I) *T. avicennioides*, (J) *Anogeissus leiocarpus*, (K) *Quisqualis indica*. Okrajšave: MV – glavna žila, VE – konec žile, AR - areola.

## Discussion

Carlquist (1961) cited in Illoh (1995) has stated that leaf provides variety of anatomical features that are of taxonomic importance. Metcalfe (1968) pointed out that certain characters of the epidermis such as shape of subsidiary cells of the stomata, micro hairs, trichomes and prickles are of systematic importance. Akinsulire et al. (2018b) also stated that data recorded in leaf and petiole studies are sufficient for the taxa to be distinguished from one another taxonomically. In this study, the shapes of epidermal cells are generally polygonal, ranging from rectangular to octagonal except on the abaxial leaf surface of *C. zenkeri* which has irregular epidermal cells and possesses numerous epidermal striations (Fig. 3B). This easily separates the species from other taxa investigated in the family. In the genus *Combretum*, *C. dolichopetalum* is demarcated from other species of the genus by the possession of straight, undulating, wavy or sinuous anticlinal walls on the adaxial leaf surface (Fig. 2D). However, anticlinal walls on the abaxial leaf surfaces were found to be wavy or occasionally sinuous in *C. platypterum* (Figs. 3A and 3A<sub>2</sub>), straight or occasionally undulating in *C. racemosum* (Fig. 3C), sinuous in *C. dolichopetalum* (Fig. 3D), while *C. racemosum* is quite distinct on the abaxial lamina surface view being a taxon without epidermal striations (Fig. 3C). Sinuous anticlinal walls on both surfaces of *C. dolichopetalum* and *T. ivorensis* (Figs. 2D and 3D; 2G and 3G) separate the two species from others in their respective genera and among other members of the family Combretaceae studied.

Other taxonomically useful characters recorded in this study include the stomatal distribution which is largely hypostomatous though sometimes amphistomatous as documented in *C. dolichopetalum*, *T. catappa* and *T. mantaly* (Plate 2 and 3). Anomocytic stomata are largely prevalent in the family but anisocytic stomata also occur on the adaxial lamina surface of *T. catappa* and *T. mantaly*. The presence of epidermal striations is also a good taxonomic tool in classifying members of the genus *Combretum* and other genera studied. This was prominently observed on the abaxial leaf surface of *C. platypterum*, *C. zenkeri* and *C. dolichopetalum* but absent in other genera studied within the family and as

such a good character of systematic importance that delimits the genus from other genera of the family Combretaceae investigated. There are also marked differences in the stomatal frequency in all the species studied, although only three of the species possess stomata on the adaxial leaf surface. Stomatal frequency of 0–2 was reported for *C. dolichopetalum*, 4–9 for *T. mantaly* while the highest stomata frequency on the adaxial leaf surface was found in *T. catappa*. However, it was observed that the occurrence of several stomatal number or frequency even in the same taxon has been a subject of controversy and has subsequently made the use of stomatal number a less reliable character in taxonomic work (Esau 1962, Raju and Rao 1977). Anisocytic stomata are restricted to members of the genus *Terminalia* (*T. catappa* and *T. mantaly* are characterised by anisocytic stomata on both surfaces of the leaf). The rest of the species have anomocytic stomata. This implies that members of the genus *Terminalia* (except *T. superba*, *T. ivorensis* and *T. avicennioides*) can be separated from other genera in the family on account of the presence of anisocytic stomata. This corroborates the classification and grouping earlier documented by Akinsulire et al. (2018b) in the genus *Terminalia*, as well as Akinsulire et al. (2018a) in the family Combretaceae. The presence of two types of stomata on the epidermal surface can as well be useful in the delimitation of the taxa studied. Among all the species, *C. platypterum* is quite distinct owing to the presence of staurocytic stomata in addition to the prevalent anomocytic or anisocytic stomata found in all the species (Table 1). This is a spot character for the species and according to Illoh (1998) cited in Chappet (1969), the trend of possessing more than one stomata type has been shown in *Vicia faba*. Patet and Inamdar (1971) also reported such taxonomic character in some Polemoniales as well as Akinsulire et al. (2018c) in their investigation into some species of *Diospyros* L. in Nigeria.

**Table 1:** Qualitative and quantitative foliar micro-morphological features of eleven species of Combretaceae (n=30). Adaxial leaf surface – upper line, adaxial leaf surface – lower line.**Tabela 1:** Kvalitativni i kvantitativni mikromorfološki znaci listov (adaksialna in abaksialna površina) pri enajstih vrstah iz družine Combretaceae (n=30). Adaksialna površina lista – zgornja vrstica, abaksialna površina lista – spodnja vrstica.

Species	Epidermal cell shape	Anticlinical wall	Periclinical wall	ECL (µm)	ECW (µm)	Stomata type	Stomata frequency	Trichome type	Trichome frequency
<i>C. platypterum</i>	Polygonal	Straight	Not striated	12.50 - 27.50	7.50 - 17.50	-	-	SUNT	0 - 4
	Polygonal	Wavy/ Sinuous	Striated	12.50 - 30.00	7.50 - 20.00	Anom & Staur	14 - 43	SUNT	0 - 1
<i>C. zenkeri</i>	Polygonal	Wavy	Not striated	10.00 - 30.00	7.50 - 17.50	-	-	SUNT	0 - 5
	Irregular	Wavy	Striated	12.50 - 30.00	10.00 - 20.00	Anomocytic	19 - 36	SUNT	0 - 6
<i>C. racemosum</i>	Polygonal	Straight/ Undul.	Not striated	12.50 - 35.00	10.00 - 22.50	-	-	SUNT	0 - 1
	Polygonal	Straight/ Undul.	Not striated	10.00 - 32.50	7.50 - 20.00	Anomocytic	18 - 31	SUNT	0 - 4
<i>C. dolichopetalum</i>	Polygonal	Wavy/ Sinuous	Not striated	20.00 - 35.00	10.00 - 22.50	Anomocytic	0 - 2	SUNT	0 - 6
	Polygonal	Sinuous	Striated	10.00 - 32.50	7.50 - 12.50	Anomocytic	7 - 66	SUNT	4 - 28
<i>T. catappa</i>	Polygonal	Straight/ Undul.	Not striated	7.50 - 30.00	12.50 - 20.00	Anisocytic	0 - 62	-	-
	Polygonal	Wavy/ Sinuous	Not striated	10.00 - 30.00	7.50 - 12.50	Anisocytic	18 - 66	-	-
<i>T. superba</i>	Polygonal	Straight/ Undul.	Not striated	15.00 - 25.00	5.00 - 17.50	-	-	-	-
	Polygonal	Wavy/ Sinuous	Not striated	12.50 - 32.50	7.00 - 15.00	Anomocytic	18 - 52	-	-
<i>T. ivorensis</i>	Polygonal	Sinuous	Not striated	10.00 - 25.00	7.50 - 15.00	-	-	-	-
	Polygonal	Sinuous	Not striated	10.00 - 30.00	7.50 - 20.00	Anomocytic	34 - 56	SUNT	0 - 1
<i>T. mantaly</i>	Polygonal	Undul./ Wavy	Not striated	20.00 - 40.00	10.00 - 22.50	Anisocytic	4 - 9	-	-
	Polygonal	Straight/ Undul.	Not striated	15.00 - 37.50	7.50 - 17.50	Anisocytic	3 - 14	-	-
<i>T. avicennioides</i>	Polygonal	Wavy/ Undul.	Not striated	10.00 - 30.00	7.50 - 20.00	-	-	-	-
	Polygonal	Wavy	Striated	12.50 - 30.00	7.50 - 20.00	Anomocytic	51 - 69	SUNT	0 - 8
<i>A. leiocarpus</i>	Polygonal	Undul./ Wavy	Not striated	10.00 - 25.00	5.00 - 12.50	-	-	SUNT	7 - 20
	Polygonal	Sinuous	Not striated	20.00 - 30.00	10.00 - 15.00	Anomocytic	36 - 51	SUNT	0 - 2
<i>Q. indica</i>	Polygonal	Straight	Not striated	20.00 - 32.50	12.50 - 22.50	-	-	SUNT	0 - 2
	Polygonal	Straight/ Sinuous	Not striated	15.00 - 30.00	12.50 - 20.00	Anomocytic	40 - 48	SUNT	0 - 1

Abbreviations: - absent, + present, SUNT - simple unicellular non-glandular trichome, NEC - number of epidermal cells, ECL - epidermal cell length, ECW - epidermal cell width, NTR - number of trichomes, Undul. - undulating, Anom. - anomocytic, Staur - staurocytic.

**Table 2:** Quantitative foliar micro-morphological features of eleven species of Combretaceae (Duncan's Multiple Mean Separation analysis - DMMS). Adaxial leaf surface – upper line, adaxial leaf surface – lower line. Values are expressed as mean ± standard error (n = 30). Values in each column with different superscripts are significantly different (p < 0.05).

**Tabela 2:** Kvantitativni mikromorfološki znaki listov pri enajstih vrstah iz družine Combretaceae (analiza DMMS). Adaksialna površina lista – zgornja vrstica, abaksialna površina lista – spodnja vrstica. Prikazane so povprečne vrednosti ± standardna napaka (n = 30). Vrednosti v vsaki koloni z različnimi črkami v nadpisu so signifikantno različne (p < 0,05).

Species	Stomata density	Stomata length (µm)	Stomata width (µm)	Stomata width (%)	Stomata index	NEC	ECL (µm)	ECW (µm)	NTR
<i>C. platypterum</i>	28.75 ± 1.79 <sup>bc</sup>	20.75 ± 0.37 <sup>g</sup>	14.50 ± 0.29 <sup>g</sup>	19.98	-	199 ± 2.91 <sup>bc</sup>	20.88 ± 0.88 <sup>b</sup>	13.50 ± 0.69 <sup>cde</sup>	0.85 ± 0.27 <sup>ab</sup>
<i>C. zenkeri</i>	28.30 ± 1.03 <sup>bc</sup>	14.25 ± 0.26 <sup>g</sup>	7.00 ± 0.23 <sup>a</sup>	21.83	-	225 ± 1.29 <sup>ef</sup>	20.75 ± 1.28 <sup>b</sup>	12.63 ± 0.69 <sup>bcd</sup>	1.30 ± 0.31 <sup>b</sup>
<i>C. racemosum</i>	26.20 ± 0.81 <sup>b</sup>	16.50 ± 0.28 <sup>bc</sup>	9.38 ± 0.25 <sup>d</sup>	16.57	-	189 ± 2.42 <sup>ab</sup>	24.75 ± 1.51 <sup>c</sup>	14.50 ± 0.69 <sup>def</sup>	0.25 ± 0.10 <sup>a</sup>
<i>C. dolichopetalum</i>	0.90 ± 0.20 <sup>a</sup>	12.88 ± 2.42 <sup>a</sup>	7.75 ± 1.48 <sup>a</sup>	0.38	0.38	238 ± 4.78 <sup>f</sup>	27.50 ± 0.99 <sup>e</sup>	17.13 ± 0.73 <sup>g</sup>	0.95 ± 0.15 <sup>ab</sup>
<i>T. catappa</i>	7.50 ± 3.38 <sup>b</sup>	10.25 ± 2.1 <sup>a</sup>	6.25 ± 1.31 <sup>a</sup>	3.54	3.54	221 ± 2.03 <sup>de</sup>	22.00 ± 1.35 <sup>ab</sup>	10.50 ± 0.53 <sup>ab</sup>	10.40 ± 1.47 <sup>d</sup>
<i>T. superba</i>	31.80 ± 3.06 <sup>cd</sup>	17.50 ± 0.48 <sup>de</sup>	8.50 ± 0.28 <sup>e</sup>	11.06	11.06	255 ± 9.66 <sup>f</sup>	20.00 ± 1.20 <sup>a</sup>	9.63 ± 0.42 <sup>a</sup>	-
<i>T. ivorensis</i>	39.95 ± 2.28 <sup>d</sup>	17.88 ± 0.42 <sup>ef</sup>	9.63 ± 0.38 <sup>d</sup>	16.61	16.61	182 ± 8.72 <sup>a</sup>	21.00 ± 0.66 <sup>b</sup>	12.00 ± 0.72 <sup>bc</sup>	-
<i>T. mantaly</i>	45.80 ± 1.68 <sup>e</sup>	17.75 ± 0.31 <sup>ef</sup>	10.25 ± 0.48 <sup>de</sup>	16.37	16.37	180 ± 10.87 <sup>c</sup>	21.75 ± 1.38 <sup>ab</sup>	11.75 ± 0.48 <sup>bc</sup>	-
	6.50 ± 0.30 <sup>b</sup>	18.75 ± 0.29 <sup>b</sup>	13.25 ± 0.26 <sup>b</sup>	2.92	2.92	233 ± 4.87 <sup>f</sup>	16.75 ± 0.01 <sup>a</sup>	11.13 ± 0.67 <sup>b</sup>	-
	5.30 ± 0.73 <sup>a</sup>	20.25 ± 0.44 <sup>g</sup>	12.87 ± 0.42 <sup>f</sup>	2.41	2.41	233 ± 6.86 <sup>e</sup>	21.13 ± 1.31 <sup>ab</sup>	10.50 ± 0.74 <sup>ab</sup>	0.45 ± 0.11 <sup>a</sup>
<i>T. avicennioides</i>	60.80 ± 1.19 <sup>f</sup>	16.75 ± 0.26 <sup>cd</sup>	8.00 ± 0.23 <sup>bc</sup>	37.86	-	215 ± 1.84 <sup>de</sup>	27.75 ± 1.40 <sup>e</sup>	14.88 ± 0.86 <sup>ef</sup>	-
<i>A. leiocarpus</i>	41.45 ± 0.89 <sup>e</sup>	14.13 ± 0.27 <sup>a</sup>	7.50 ± 0.00 <sup>ab</sup>	22.84	-	215 ± 3.10 <sup>d</sup>	22.88 ± 1.23 <sup>ab</sup>	12.88 ± 0.61 <sup>cd</sup>	-
<i>Q. indica</i>	43.00 ± 0.63 <sup>e</sup>	15.63 ± 0.25 <sup>b</sup>	8.25 ± 0.26 <sup>bc</sup>	23.87	-	185 ± 8.03 <sup>ab</sup>	21.38 ± 1.17 <sup>b</sup>	12.00 ± 0.74 <sup>bc</sup>	-
	-	-	-	-	-	99 ± 1.45 <sup>a</sup>	23.25 ± 1.22 <sup>ab</sup>	15.00 ± 0.81 <sup>ef</sup>	2.35 ± 0.50 <sup>bc</sup>
	-	-	-	-	-	273 ± 7.26 <sup>g</sup>	16.75 ± 0.89 <sup>a</sup>	9.00 ± 0.53 <sup>a</sup>	12.55 ± 0.88 <sup>e</sup>
	-	-	-	-	-	140.00 ± 2.38 <sup>b</sup>	24.13 ± 0.82 <sup>b</sup>	12.63 ± 0.42 <sup>cd</sup>	3.15 ± 0.37 <sup>c</sup>
	-	-	-	-	-	174 ± 2.73 <sup>a</sup>	26.38 ± 1.11 <sup>c</sup>	16.50 ± 0.73 <sup>fg</sup>	0.65 ± 0.13 <sup>ab</sup>
	-	-	-	-	-	143 ± 2.93 <sup>b</sup>	21.75 ± 1.12 <sup>ab</sup>	15.88 ± 0.64 <sup>f</sup>	0.70 ± 0.16 <sup>a</sup>

The values of stomatal index are also important in separating members of this family. Another character of identification and systematic significance was found to be present on the abaxial leaf surfaces of the eleven taxa where stomatal occurrence and indices were general. *T. avicennioides* has the highest stomata index (37.86%) while the least was observed in *T. mantaly* (2.41%) (Tab. 2). The fact that stomatal index is constant for any taxon delimits the taxa. The variability observed in the stomatal index of members of this family aligns with the work of Olatunji (1983) who posited that stomatal index is constant for a given species and as such, it is useful in delimiting species.

In this study, leaf indumentum on the adaxial leaf surface reveal the preponderance of simple unicellular non-glandular trichome in all the genera studied except in the genus *Terminalia* (Table 1 and 2). This indicates that the absence of simple unicellular trichome on the adaxial leaf surface is a generic feature for members of the genus *Terminalia* and also delimits the genus, thereby serving as a character of identification useful in the taxonomy of the genus. However, *T. ivorensis* and *T. avicennioides* are separated from other species in the genus *Terminalia* and among other genera studied by the possession of simple unicellular non-glandular trichomes on their abaxial leaf surfaces (Table 1 and 2). This grouping greatly agrees with recent investigations into the genus *Terminalia* by Akinsulire et al. (2018b) who grouped *T. avicennioides* and *T. ivorensis* based on a number of leaf and petiole anatomical parameters. These findings also corroborate Akinsulire et al. (2018a) who classified the species using their vegetative and reproductive morphological attributes. Meanwhile, Adedeji et al. (2007) has earlier reported the importance of trichome types in different organs of plant body in the delimitation of genera and species within the family Solanaceae. Rammaya and Rao (1976) as well as Rao and Rammaya (1977) also emphasised the taxonomic importance of trichomes. Therefore, the result of this study aligns with that of Stace (1981) who reported a significant influence of trichomes in the classification of genera in the family Combretaceae.

Foliar venation, though an underutilised and neglected character, has proven to be useful in

delimitation of species of Combretaceae investigated. Studies such as of Levin (1986), Provance and Sanders (2006), Akinsulire et al. (2018c) have revealed the significance of foliar venation characters in the delimitation of several plant taxa. Regular polygonal reticulate venation and triangular to pentagonal (3 to 5-sided, or 6-sided) areolation seem to be generic for members of the genus *Combretum*. This generic classification also is in conformity with previous studies (Oladipo et al. 2016; Akinsulire et al. 2018a, b) for which this paper serves to be a follow-up and probably a conclusion. Dichotomous venation groups *T. catappa* and *T. mantaly* while alternate percurrent/regular polygonal reticulate venation as well as imperfect areolation (Table 3 and Figs. 4J and 4K) can be used to classify *A. leiocarpus* and *Q. indica* - the two West African monotypic genera in the family Combretaceae investigated. Simple linear or forked/branched veinlets dominate the family except in *C. zenkeri* (Fig. 4B), which is a spot character for the taxa. However, this study has greatly supported the placement of each of the species in their respective genera (Hutchinson and Dalziel, 1958). Meanwhile, the general absence of druses within the areoles except in *C. platypterum*, *T. catappa*, *T. superba* and *Q. indica* (Figs. 4A, 4E, 4F and 4K, respectively) placed the eleven species into two groups. This is a spot character that delimits each of the four species from others in their respective genera and from all other species studied within the family.

Critical examination of quantitative attributes of venation pattern reveals significant intra- and intergeneric differences among all the species studied. In the genus *Combretum*, *C. racemosum* has a significantly longer areole length, width and more veinlet endings than other species within the genus (Tab. 4), this also delimits the species. Furthermore, the similarity observed in the number of veinlet endings can be used in grouping *C. zenkeri*, *C. platypterum* and *C. dolichopetalum* (Tab. 3). Longer areole and higher number of veinlet endings were found in *T. mantaly* while *T. catappa* had a wider areole (Tab. 2). However, the occurrence of highest number of veinlet endings separates *T. mantaly* from all other species of the family Combretaceae studied (Tab. 3).



**Table 3:** Micro-morphological characters of veins of eleven species of Combretaceae.**Tabela 3:** Mikromorfološki znaki žilnatosti listov pri enajstih vrstah iz družine Combretaceae.

Species	Venation	Areole		Vein ending	Vein	
		development	Shape/side		density	Druses
<i>C. platypterum</i>	RPR	Well	3 - 6 sided	Linear/forcated	0 – 2	+
<i>C. zenkeri</i>	RPR	Moderate	3 - 6 sided	Linear/unbranched	0 – 1	-
<i>C. racemosum</i>	RPR	Moderate	3 - 6 sided	Linear/forcated	1 – 3	-
<i>C. dolichopetalum</i>	RPR	Moderate FP	3 - 5 sided	Linear/branched	0 – 3	-
<i>T. catappa</i>	D	Well dev.	3 - 5 sided	Linear/forcated	0 – 3	+
<i>T. superba</i>	RPR	Well dev.	3 - 5 sided	Linear/forcated	1 – 3	+
<i>T. ivorensis</i>	RPR	Moderate	4 - 6 sided	Linear/branched	0 – 2	-
<i>T. mantaly</i>	D	Well	3 - 6 sided	Linear/branched	1 – 3	-
<i>T. avicennioides</i>	RPR	Well	3 - 6 sided	Linear/forcated	0 – 3	-
<i>A. leiocarpus</i>	AP/RPR	Imperfect	4 - 6 sided	Linear/forcated	0 – 2	-
<i>Q. indica</i>	PRP/AP	Imperfect	3 - 6 sided	Linear/branched	0 – 3	+

Abbreviations: RPR - regular polygonal reticulate, D – dichotomizing, AP - alternate percurrent, FP - fairly paxillate.

**Table 4:** Analysis of quantitative features of the veins with Duncan's multiple range test. Values are expressed as mean  $\pm$  standard error (n = 30). Values in each column with different superscripts are significantly different (p < 0.05).**Tabela 4:** Analiza kvantitativnih znakov žilnatosti listov (Duncanov test rangov). Prikazane so povprečne vrednosti  $\pm$  standardna napaka (n = 30). Vrednosti v vsaki koloni z različnimi črkami v nadpisu so signifikantno različne (p < 0,05).

Species	Areole length ( $\mu$ m)	Areole width ( $\mu$ m)	Number of veinlet endings
<i>C. platypterum</i>	417.00 $\pm$ 21.52 <sup>d</sup>	282.50 $\pm$ 14.76 <sup>f</sup>	0.60 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>
<i>C. zenkeri</i>	241.00 $\pm$ 12.71 <sup>a</sup>	175.00 $\pm$ 9.61 <sup>a</sup>	0.55 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>
<i>C. racemosum</i>	658.50 $\pm$ 23.94 <sup>e</sup>	394.00 $\pm$ 25.07 <sup>g</sup>	1.50 $\pm$ 0.20 <sup>cd</sup>
<i>C. dolichopetalum</i>	278.50 $\pm$ 14.75 <sup>ab</sup>	202.50 $\pm$ 10.68 <sup>ab</sup>	0.55 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>
<i>T. catappa</i>	411.00 $\pm$ 26.34 <sup>d</sup>	276.00 $\pm$ 13.56 <sup>ef</sup>	1.65 $\pm$ 0.17 <sup>d</sup>
<i>T. superba</i>	369.00 $\pm$ 23.12 <sup>cd</sup>	247.50 $\pm$ 5.61 <sup>cdef</sup>	1.35 $\pm$ 0.17 <sup>cd</sup>
<i>T. ivorensis</i>	321.50 $\pm$ 16.36 <sup>bc</sup>	224.00 $\pm$ 15.40 <sup>bc</sup>	1.15 $\pm$ 0.17 <sup>bc</sup>
<i>T. mantaly</i>	429.50 $\pm$ 18.01 <sup>d</sup>	272.50 $\pm$ 11.14 <sup>def</sup>	2.10 $\pm$ 0.12 <sup>c</sup>
<i>T. avicennioides</i>	328.00 $\pm$ 15.90 <sup>bc</sup>	236.00 $\pm$ 17.13 <sup>bcde</sup>	1.25 $\pm$ 0.16 <sup>bed</sup>
<i>A. leiocarpus</i>	393.50 $\pm$ 23.26 <sup>d</sup>	264.50 $\pm$ 9.42 <sup>cdef</sup>	0.80 $\pm$ 0.12 <sup>ab</sup>
<i>Q. indica</i>	329.50 $\pm$ 21.26 <sup>bc</sup>	229.00 $\pm$ 13.59 <sup>bcd</sup>	1.30 $\pm$ 0.22 <sup>cd</sup>

## Conclusions

Investigations of leaf epidermal micro-morphology and venation characters of members of the family Combretaceae as carried out in this study can successfully be employed in the identification, classification and delimitation of members of the family Combretaceae while the evidences should be used as basis for taxonomy. This research and previous investigations (Oladipo et al. 2016, Akinsulire et al. 2018a, b) for which this study serves as a follow-up, has revealed several micro-morphological characters of taxonomic delimitations and great affinities in the selected members of the family. It is therefore concluded that the placement of the 11 species in their respective genera (Hutchinson and Dalziel 1958) should be maintained.

## Acknowledgement

We acknowledge Obafemi Awolowo University (OAU) for providing facilities and equipments for the research. Thanks to Mr Bernard Omomoh (Department of Forestry and Wood Technology, FUTA) for his efforts in plant collection. We appreciate Dr K. F Adelalu (CAS, Wuhan Botanical Garden, China) for his efforts towards a successful foliar epidermal investigation as well as Mr Abiodun Omole (Department of Botany, OAU) for the technical supports in slide preparation and photomicrography. Anonymous reviewers are also greatly appreciated for providing valuable and constructive comments on the manuscript.

## References

- Adedeji, O.A., Ajuwon, O.Y., Babawale, O., 2007. Foliar epidermal studies, organographic distribution and taxonomic importance of trichomes in the family Solanaceae. *International Journal of Botany*, 3(3), 276-282.
- Akinsulire, O.P., Oladipo, O.T., Illoh, H.C., Mudasiru, O.M., 2018a. Vegetative and reproductive morphological study of some species in the family Combretaceae in Nigeria. *Ife Journal of Science*, 20(2), 371-389. <https://dx.doi.org/10.4314/ij.s.v20i2.18>
- Akinsulire, O.P., Oladipo, O.T., Illoh, H.C., Akinloye, A.J., 2018b. Structure, distribution and taxonomic significance of leaf and petiole anatomical characters in five species of *Terminalia* (L.) (Combretaceae: Magnoliopsida). *Brazilian Journal of Biological Sciences*, 5(10), 515-528. <https://doi.org/10.21472/bjbs.051027>
- Akinsulire, O.P., Oladipo, O.T., Abdulraheem, O.A., Akinloye, A.J., Illoh, H.C., 2018c. Taxonomic significance of epidermal and venation characters in the genus *Diospyros* L. (Ebenaceae) in Nigeria. *Brazilian Journal of Biological Sciences*, 5(10), 499-514. <https://doi.org/10.21472/bjbs.051026>
- Baba-Moussa, F., Akpagana, K., Bouchet, P., 1996. Antifungal activities of seven West African Combretaceae used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 66, 335-338.
- Batawila, K., Kokou, K., Koumaglo, K., et al., 2005. Antifungal activities of five Combretaceae used in Togolese traditional medicine. *Fitoterapia*, 76, 264-268.
- Carlquist, S., 1961. *Comparative plant anatomy*. Holt, Rinehart and Winston. New York.
- Carlquist S., 1988. *Comparative wood anatomy: Systematic, ecological and evolutionary aspects of dicotyledon wood*. Springer Verlag, Berlin.
- Chappet A., 1969. *The biology and systematics*. Edited by D'Arcy W. G. Columbia University Press, New York.
- Couliati, T.H., Millogo-Kone, H., Lamien-Meda, A., Lamien, C., Lompo, M., 2009. Antioxidant and antibacterial activities of *Combretum niroense* Aubrev. ex Keay (Combretaceae). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12, 264-269.
- Ekeke, C., Agbawa, I. O., Okoli, B.E., 2014. Numerical taxonomy of *Combretum* Loefl. from South-eastern Nigeria. *Journal of Plant Sciences*, 9, 25-31.
- Esau, K., 1962. *Anatomy of seed plants*. John Wiley and sons Inc., New York.

- Fyhrquist, P., Mwasumbi, L., Haeggstrom, C.A., Vuorela, H., Hiltunen, R., Vuorela, P., 2002. Ethnobotanical and antimicrobial investigation on some species of *Terminalia* and *Combretum* (Combretaceae) growing in Tanzania. *Journal of Ethnopharmacology*, 79, 169-177.
- Gill, L.S., 1988. Taxonomy of flowering plants. Africana-FEP Publishers Ltd., Ibadan, Nigeria.
- Hutchinson, J., Dalziel, J.M., 1958. Flora of west tropical Africa. Crown Agents for Overseas Government and Administration Nill Bank London Vol. 1.
- Illoh, H.C., Inyang, U.E., 1998. Foliar epidermis and petiole anatomy in some Nigerian *Solanum* Linn. species in the sub-genus *Leptostemon* (Bitt) Dun. *Glimpses in Plant Research*, 12, 73-86.
- Illoh, H.C., 1995. Foliar epidermis and petiole anatomy of four species of *Celosia* L. in Nigeria. *Feddes Repertorium*, 106, 1-2, 15 - 23.
- Jainab, S.I., Kensa, M.V. 2018. Morpho-anatomical studies on *Vitex negunlo* L. *International Journal of Botany Studies*, 3(2), 1-7.
- Jayeola, A.A., Aworinde, D.O., Folorunso, A.E., 2009. Use of wood characters in the identification of selected timber species in Nigeria. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 37(2), 28-32.
- Jordaan, M., Van Wyk, A.E., Maurin, O., 2001. Generic status of *Quisqualis* (Combretaceae), with notes on the taxonomy and distribution of *Q. parviflora*. *Bothalia*, 41(1), 161-169.
- Keay, R.W.J., 1989. Trees of Nigerian. Clarendon Press, Oxford, UK.
- Kishore, S.R., Rao, K.S., 1999. Nucleated wood fibres in some members of Combretaceae. *International Association of Wood Anatomy (IAWA) Journal*, 20(1), 79-83.
- Leaf Architecture Working Group (LAWG), 1999. Manual of leaf architecture: morphological and categorization of dicotyledonous and net-veined monocotyledonous angiosperm, p. 65.
- Levin, G.A., 1986. Systematic foliar morphology of Phyllanthoideae (Euphorbiaceae). 1. *Conspectus Saint. Ann. Missouri Botanical Garden*, 73, 86-98
- Mabberley, D.J., 2008. The Plant Book: A portable dictionary of the vascular plants, 3rd edn. Cambridge University Press.
- Martini, N., Katerere, D.R.P., Eloff, J.N., 2004. Seven flavonoids with antibacterial activity isolated from *Combretum erythrophyllum* (Burch) Sond (Combretaceae). *South African Journal of Botany*, 70, 310-312.
- Metcalfe, C.R., 1968. Current development in systematic plant anatomy. In: Heywood, V.H. (ed.): *Modern methods in plant taxonomy*. Academy Press, London, New York, pp. 45-57.
- Metcalfe, C.R., 1979. The leaf: General topography and ontogeny of the tissues. In: Metcalfe, C.R. and Chalk, L.: *Anatomy of the dicotyledons*, Vol. I. Clarendon Press, Oxford, England, p. 63.
- Oladipo, O.T., Akinsulire, O.P., Illoh, H.C., 2016. Comparative systematic wood anatomical study of eleven species in four genera of the family Combretaceae in Nigeria. *Nigerian Journal of Botany*, 29(1), 43-57.
- Olatunji, O.A., 1983. Practical manual for plant anatomy. Obafemi Awolowo University, Ile-Ife, Nigeria (unpubl.), pp. 14-19.
- Patet, R.C., Inamdar, C., 1971. Structure and ontogeny of stomata in some Polemiales. *Annals of Botany*, 35, 389-409.
- Priya, C., Hari, N., 2018. A study on leaf and petiole anatomy of endemic and vulnerable species of *Garcinia*. *Journal of Emerging Technologies and Innovative Research*, 5(12), 509-512.
- Provance, M.C., Sanders, A.C., 2006. More American black sapotes: New *Diospyros* (Ebenaceae) for Mexico and Central America. *Sida*, 22, 277-304.
- Raju, V.S., Rao, P.N., 1977. Variation in the structure and development of foliar stomata in the Euphorbiaceae. *Botanical Journal of the Linnaean Society*, 75, 69-97.
- Rammaya, N., Rao, R.S., 1976. Morphology phylaxis and biology of the peltate scale, stellate and tufted hairs in some Malvaceae. *Journal of Indian Botanical Society*, 55, 75-79.
- Rao, R.S., Rammaya, N., 1977. Structure, distribution and taxonomic importance of trichomes in the Indian species of *Malvastrum*. *Phytomorphology*, 27, 40-44.

- Shirsagar, A.A., Vaikos, M.P., 2013. Foliar epidermal features and their taxonomic significance in *Rotala* L. (Lythraceae). *Asian Journal of Plant Science and Research*, 3(3), 117-120.
- Simon, G., Dewelle, J., Nacoulma, O., et al., 2003. Cytotoxic pentacyclic triterpenes from *Combretum nigricans*. *Fitoterapia*, 74, 339-34.
- Sonibare, M.A., Oke, T.A., Soladoye, M.O., 2014. A pharmacobotanical study of two medicinal species of Fabaceae. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(2), 131-136.
- Stace, C.A., 1981. The significance of the leaf epidermis in the taxonomy of the Combretaceae: conclusions. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 81, 327-339.
- Stace, C.A., 2007. Combretaceae. In: Kubitzki, K. (ed.): *The families and genera of vascular Plants* 9. Springer Verlag, Berlin, pp. 67-82.
- Thiombiano, A., Schmidt, M., Kreft, H., Guinko, S., 2006. Influence of the climatic gradient on the distribution of Combretaceae species in Burkina Faso (West Africa). *Candollea*, 61, 189-213.
- Thiombiano, A., 2005. Les Combretaceae du Burkina Faso: Taxonomie ecologie et regeneration des especes. These d'Etat, Universite de Ouagadougou, pp. 290.
- Tilney, M.P., 2002. A contribution to the leaf and young stem anatomy of the Combretaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 138, 163-196.
- Wilkinson, H.P., 1979. *The Plant Surface (mainly leaf) Part 1: Stomata* In: Metcalfe, C.R and L. Chalk (eds): *Anatomy of the dicotyledons*, Vol. 1, 2<sup>nd</sup> ed. Clarendon Press, Oxford, pp. 113.



**Preliminary experiments into colonization of microorganisms from activated sludge on different types of plastics**

Preliminarni poskusi kolonizacije različnih tipov plastike z mikroorganizmi iz aktivnega blata

Tjaša Matjašič<sup>a,d\*</sup>, Tanja Dreo<sup>a</sup>, Zoran Samardžija<sup>b</sup>, Oliver Bajt<sup>c</sup>, Tjaša Kanduč<sup>b</sup>,  
Tatjana Simčič<sup>a</sup>, Nataša Mori<sup>a</sup>

<sup>a</sup>National Institute of Biology, Večna pot 111, 1000 Ljubljana, Slovenia

<sup>b</sup>Jožef Stefan Institute, Jamova cesta 39, 1000 Ljubljana, Slovenia

<sup>c</sup>National Institute of Biology, Marine Biology Station Piran, Fornace 41, 6330 Piran, Slovenia

<sup>d</sup>Jožef Stefan International Postgraduate School, Jamova cesta 39, 1000 Ljubljana, Slovenia

\*correspondence: tjas.matjasic@nib.si

**Abstract:** The presence of plastics in the environment is currently one of the most pressing global environmental problems. Microorganisms start to form biofilms on plastic surfaces when they first come in contact with the biosphere; however, these interactions and processes are little understood, especially in freshwaters. This study aimed to better understand the colonization process of microorganisms from activated sludge on plastic materials exhibiting different surface characteristics. We inoculated synthetic fabric (PET), water bottles (PET), and plastic bags for packing vegetables and fruits (HDPE) with microorganisms from activated sludge. Mixtures of plastics and activated sludge, as well as the control, were incubated at 22–24°C in Bushnell Haas (BH) liquid medium and shaken at 120 rpm for two months. The mixtures were sub-sampled weekly and seeded into fresh BH medium with test plastic materials to avoid feeding microorganisms on dead biomass. The colonization was followed by measuring optical density ( $OD_{600}$ ) of liquid medium, by measurements of isotopic composition of carbon ( $\delta^{13}C$ ) in untreated and treated plastic materials and, with inspecting the plastics surface with scanning electron microscopy (SEM). Overall, the study confirmed differences between colonizing microorganisms on different plastic material when comparing SEM micrographs of materials from the flasks inoculated with activated sludge. The texture of the HDPE bag changed during the experiment in both, control and inoculated flasks, but it is not clear whether the observed changes were due to abiotic or biotic factors. We concluded that microorganisms from activated sludge are capable of colonizing both PET and HDPE materials, and biofilm formation is most probably influenced by the chemical composition of plastics and their surface characteristics.

**Keywords:** biofilm, plastics, SEM, isotopic composition of carbon, co-cultivation, UV sterilization

**Izvleček:** Prisotnost plastike v okolju postaja eden izmed največjih globalnih problemov. Prvi stik plastike z biosfero je običajno s kolonizirajočimi mikroorganizmi, ki tvorijo biofilm, vendar je ta interakcija dokaj neznana, še posebej v celinskih vodah. Cilj študije je bil bolje razumeti proces mikrobovne kolonizacije različnih plastičnih materialov z različnimi površinskimi lastnosti. Uporabili smo sintetična vlakna blaga (PET), plastenke za vodo (PET) in plastične vrečke za pakiranje zelenjave in sadja (HDPE) ter jih zmešali z okoljskim vzorcem aktivnega blata. Erlenmajerica z mešanico različnih plastik, inokulirana z vzorcem aktivnega blata v Bushnell Haas (BH) tekočem gojišču, ter negativna kontrola (mešanica plastik v sterilnem BH gojišču) so bile 2 meseca inkubirane na 22-24°C in stresane s 120 rpm. Vzorce smo tedensko predstavljali v sveža BH gojišča s testnimi plastičnimi materiali, da smo izključili rast na odmrli biomas. Proces smo spremljali z merjenjem  $OD_{600}$  v tekočem mediju, z meritvami izotopske sestave ogljika ( $\delta^{13}C$ ) v plastiki, in z opazovanjem površine plastike z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM). S študijo smo potrdili različno rast mikroorganizmov na različnih materialih. V primeru HDPE vrečke se je spremenila tekstura tako v sterilnem kontrolnem gojišču kot v gojišču z mikroorganizmi iz aktivnega blata, vendar ni jasno, če zaradi abiotičnih ali biotičnih faktorjev. Zaključili smo, da so bakterije iz aktivnega blata zmožne kolonizacije plastike, ki je v vsakdanji uporabi, in da je pestrost in struktura biofilma odvisna od kemične sestave in površinskih lastnosti plastičnih materialov.

**Ključne besede:** biofilm, plastika, SEM, izotopska sestava ogljika, ko-kultivacija, UV sterilizacija

## Introduction

Continuous increase in the production of synthetic or semi-synthetic organic compounds (plastics) and its wide use in every aspect of human life has led to increasing occurrence of plastic waste in freshwater environments (Li et al. 2018). During its time in the environment, larger plastic debris undergoes fragmentation due to weathering processes generating secondary microplastics (MP) (i.e. particles <5 mm). MP can also be manufactured as such and used as resin pellets to produce larger items or used directly (primary MP), as used in cosmetic products (Wagner and Lambert 2018). In concordance with global production rates most commonly found polymers in the environment are high- and low-density polyethylene (HD/LD-PE), polyethylene terephthalate (PET), polypropylene (PP), polystyrene (PS), and polyvinyl chloride (PVC). They occur mostly as fragments (rounded, angular), pellets (cylinders, disks, spherules), filaments (fibres), and granules (Wagner et al. 2014).

The presence of MP in the environment, as a new type of emerging contaminant, has become an issue of great concern and has drawn the attention of public and government authorities (Li et al. 2018). The main concerns are that MP particles can be easily ingested throughout the food chain; MP is a vector for toxic contaminants including metals and persistent, bioaccumulative and toxic compounds such as pharmaceuticals and endocrine-disrupting compounds; and MP can act as a vector for waterborne (human) pathogens influencing the hygienic water quality (Wagner et al. 2014, Eckert et al. 2018). There are many sources of MP for freshwater systems, with the largest portion from wastewater treatment plants (WWTP) (Li et al. 2018). When entering the environment, the plastic is exposed to physical factors (temperature, UV light, abrasion, etc.) and adsorbs organic and inorganic substances due to its high adsorptive properties (Rummel et al. 2017). After that, further colonization by bacteria, algae, fungi, and protozoa occur, which results in biofilm formation (McCormick et al. 2014, Rummel et al. 2017, Jemec Kokalj et al. 2019, Parrish and Fahrenfeld 2019).

The interaction between microorganisms and plastics occurring in freshwaters is not well known, even though these interactions and potential for biodegradation is a highly relevant topic in the field of environmental remediation (Wu et al. 2016). MP-associated microbial assemblages in forms of biofilms are likely to influence the distribution, impacts and fate of these pollutants, but most research has focused on marine environments (Harrison et al. 2018). Several researchers pointed out, that plastic particles are rapidly colonized once submerged in marine waters (Lobelle and Cunliffe 2011, Dang and Lovell 2016, Jacquin et al. 2019). In streams, biofilms are primary sites for carbon and nutrient transformations; thus they are also essential for pollutant biodegradation (Battin et al. 2016, Harrison et al. 2018). A recent study of Parrish and Fahrenfeld (2019) demonstrated that biofilm community structures varied as a function of source water and that PS spheres had different microbial community structures from PE microparticles indicating that the characteristics of plastics that is being colonized affects the biofilm structure.

Biofilm formation is composed of four distinct phases: (i) adsorption of dissolved organic molecules, (ii) attachment of bacterial cells, (iii) attachment of unicellular eukaryotes, and (iv) attachment of larvae and spores (Dobretsov 2010). Bacterial adhesion is divided into two stages, primary (docking) and secondary (locking) bacterial adhesion (Dunne 2002). Generally, plastics are first covered by inorganic and organic matter, referred to as “conditioning film” and shortly after by bacteria (mainly *Gammaproteobacteria* and *Alphaproteobacteria*) (Oberbeckmann et al. 2015). Microorganisms attach more firmly to hydrophobic materials, which is opposite to hydrophilic materials such as glass (Dobretsov 2010). The factors that affect the composition of microbial communities attached to artificial substrates are not well known (Caruso 2020), but they certainly gain advantages through surface colonization and biofilm formation, the most critical being better access to resources (Dang and Lovell 2016). Certain bacterial groups belonging to the phyla Proteobacteria, Bacterioidetes, Firmicutes, and Cyanobacteria are associated with plastic as colonizers more than others, suggesting an ecological niche for some taxonomic groups and indicating

metabolic adaptation (Roager and Sonnenschein 2019). However, more information is needed to better understand how bacteria are associating with different type of plastics and under what conditions. A study conducted by Khatoon et al. (2014) used activated sludge as seed in their experiments. Similarly, they used SEM to characterize biofilm and surface morphology, but of polypropylene (PP) balls. A study by Huang and Cui (2012) also used activated sludge but investigated poly(lactic acid) (PLA), poly(butylene succinate) (PBS) and poly(caprolactone) (PCL). Using SEM, they found that biodegradation of PCL is best, PLA follows, and lastly PBS. Although some papers study HDPE degradation using SEM, the bacterial seeds come mostly from plastic waste dumpsites’ soil or plastic samples and to lesser extent from activated sludge (Kowalczyk et al. 2016, Awasthi et al. 2017).

This study aimed to better understand the colonization process of microorganisms from activated sludge on plastics differing in chemical (PET and HDPE) and surface characteristics (textile fabric, thin plastic bags, thick plastic bottles). The colonization process and biofilm formation were observed on PET and HDPE materials, which are commonly present in treated wastewaters (Lv et al. 2019) and also occur as pollutants in freshwater environments (Koelmans et al. 2019) and, to our knowledge, have never been studied in a similar experiment. We hypothesized that the microorganisms from the activated sludge would be able to colonize and utilize carbon from experimental plastics in order to survive, that different biofilms would form on the PET textile, PET bottle, and HDPE bag, and that the thin plastic bag would reveal the greatest structural surface changes due to its thinness. Since scanning electron microscopy (SEM) enables visualization of bacterial colonization and biofilm architecture, including extracellular polymeric substance (EPS) deposits, we used it to investigate the colonization process by microorganisms from activated sludge, which are investigated less often than microorganisms from landfill and dump sites (Matjašič et al. in prep.). Moreover, we tested whether the measurements of the isotopic composition of carbon ( $\delta^{13}\text{C}$ ), as proposed by Lucas et al. (2008), can provide reliable information on microbial degradation of experimental plastics. This preliminary study

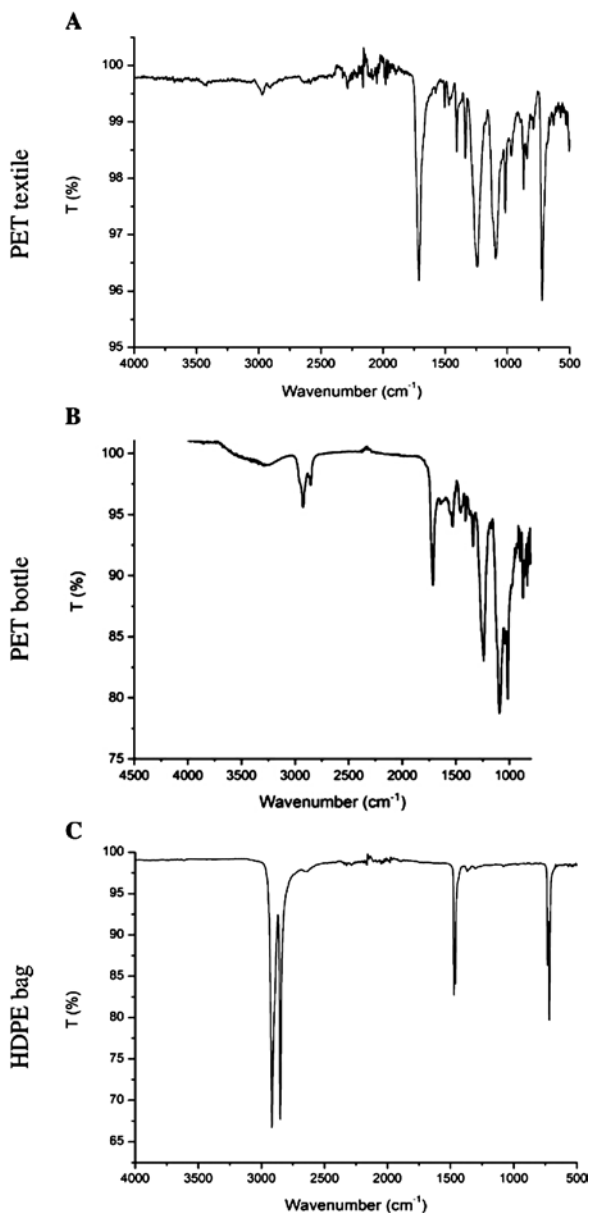


also identified methodological improvements necessary for further experiments where we will try to better understand the survival and colonization processes on plastic materials by microorganisms from different polluted sites. Our final, long term aim is to isolate environmental microorganisms capable of efficient biodegradation.

## Material and methods

### *Preparation of plastic materials*

We used three types of plastics in this study. The store-bought new materials consisted of synthetic fabric (textile for clothes), plastic water bottles (bottle), and plastic bags used for packing vegetables and fruits in grocery stores (bag). The determination of the chemical composition of the materials was carried out using Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) (Perkin Elmer Spectrum Two) in ATR mode. FTIR identifies the functional groups present in organic or inorganic compounds and characterizes covalent bonding information by measuring their absorption of infrared radiation over a range of wavelengths (Smith 2011). By FTIR, we can identify the analysed polymer, but cannot see the detailed chemical composition, including additives. The textile and water bottle were identified as polyethylene terephthalate (PET) and the bag as high-density polyethylene (HDPE), all with 98% similarity (Fig. 1).



**Figure 1:** FTIR spectra of PET textile (A), PET bottle (B) and HDPE bag (C).

**Slika 1:** FTIR spekter PET blaga (A), PET plastenke (B) in HDPE vrečke (C).

Usually, in colonization studies, sterilization with 70% of ethanol is applied (Arkatkar et al. 2009, Arkatkar et al. 2010, Francis et al. 2011, Mohanrasu et al. 2018) but, because treatment with ethanol was indicated not to be sporicidal (McDonnell and Russell 1999, Yoo 2018), we decided to expose plastic materials to UV light. The materials were first exposed to UV-A light (365 nm) for seven days (lamp Osram Ultra-Vitalux, 300 W) to partly mimic the exposure of materials to natural light present in the environment. Next, the plastics were cut into 2 x 2 cm squares and exposed to UV light (ozone free UV-C ( $\lambda = 253.7$  nm), with a UV radiation level of 15 mW/cm<sup>2</sup>/sec; (UVC/T-M-AR Cleaner Box, BioSan) for 30 minutes, turning the materials half-way through to sterilize them.

#### *Co-cultivation experiment*

Erlenmeyer flasks (100 mL) were sterilized (dry sterilization, 5h, 180 °C) twice within a two-day window. To each flask, 27 mL Bushnell Haas (BH; 1.0 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.0 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.0 g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0.2 g MgSO<sub>4</sub>, 0.05 g FeCl<sub>3</sub>, 0.02 g CaCl<sub>2</sub>, in 1000 mL of deionized water) liquid medium (Bushnell and Haas 1941) was added, together with two pieces (2 x 2 cm) of each type of plastic material. We used BH medium because it was designed as a medium for bacteria that degrade hydrocarbons (Bushnell and Haas 1941), and recent studies dealing with microbial plastic degradation used it as a suitable medium without added carbon (Mohan et al. 2016, Auta et al. 2017, Auta et al. 2018, Mohanrasu et al. 2018). We inoculated one flask with microorganisms from an activated sludge sample, and one flask was used as a negative control. We collected the environmental sample of activated sludge on June 17<sup>th</sup>, 2019, at the wastewater treatment plant (WWTP) Domžale-Kamnik, located near Ljubljana, Slovenia. The volume of inocula was 3 mL. The flasks were incubated for two months at room temperature (22-24 °C) with continuous shaking (120 rpm, HS 501 digital, IKA Labor Technik). The samples were shaken because the medium and the plastic were settling, and because we wanted to maximize the available surface for bacteria. Shaking also increased the probability of bacteria encountering

the plastic surface used in the experiments. During incubation, we carried out weekly subculturing to exclude growth on dead biomass, so that bacteria could use plastics as the sole carbon source. The first inoculation was conducted on June 18<sup>th</sup>, 2019. Then, regular weekly subculturing was carried out three times by transferring 3 mL of mixture from the inoculated flask and the negative control into flasks with fresh BH medium containing plastics. One and a half month after the last subculturing, OD<sub>600</sub> of liquid media was measured (Lambda UV/Vis spectrophotometer, PerkinElmer, Waltham, MA, USA) and samples for the SEM and isotopic analysis were taken.

#### *Characterization of biofilms on plastics*

We took pieces of plastics from the final subculturing where plastic was exposed to microorganisms for month and a half (treated plastics) and corresponding negative controls (control plastics) for further investigation of colonization by SEM. The biofilm growth was characterized by comparing the SEM micrographs of plastics from the mixture with activated sludge with those of negative control and plastics, both not exposed (untreated) and exposed to UV-C (UV exposed), in order to obtain information on their initial texture. The potential biofilms on plastics were fixed with 2.5 % glutaraldehyde and 0.4 % paraformaldehyde in a 0.1 M Phosphate Buffer, pH 7.4, for 2 hours and subsequently subjected to desiccation in sorted series of ethanol concentrations (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, 85%, 95%, 100%). The samples were coated using an ion-beam precision etching coating system (PECS 682, Gatan Inc. USA) with 5 nm thick conductive Au-Pd layer and observed at various magnifications under scanning electron microscope (SEM, JSM 7600F, JEOL, Japan) at SEM accelerating voltage of 10 or 5 kV. The whole surface of colonized plastic materials was systematically examined by using 5000 x magnification, and, in cases of indication on biofilm formation or microbial occurrence the selected area was inspected under 6000, 10 000 and 15 000 x magnifications. Highly indicative micrographs were extracted for this study. Due to space limitation, the presented micrographs (Fig. 2 – Fig. 6) are the most representative images.

### Isotopic analysis

Following the co-cultivation experiment, plastics were pre-prepared for isotope analysis. Materials were taken from the final subculturing, same as for OD<sub>600</sub>, submerged in deionized water separately, and rinsed two more times with fresh deionized water to remove the potential biofilm (treated material). Similarly treated were plastics from control flasks (control material) and material that was not incubated in the flask (untreated material). The isotopic composition of carbon in plastics was determined using a Europa 20-20 continuous flow IRMS ANCA-SL preparation module. Approximately 0.5 mg of plastics (textile - PET, bottle - PET, bag - HDPE) were weighed in a tin capsule for carbon analysis. The isotopic composition of carbon was determined after combustion of the capsules in a hot furnace (temperature 1000°C). Generated products were reduced in a Cu tube (600°C), where excess O<sub>2</sub> was absorbed. H<sub>2</sub>O was trapped on a drying column composed of MgClO<sub>4</sub>. Gases were separated on a chromatographic column and ionized. IAEA CH-3 (-24.724±0.041), CH-7 (-32.151±0.050), CH-6 (-10.449±0.033) reference materials were used to relate the analytical results to the VPDB standards. The sample reproducibility for carbon was ±0.2‰. The isotopic composition of carbon ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{sample}}$ ) is expressed in ‰ and was reported in the  $\delta$  notation:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{sample}} (\text{‰}) = \left( \frac{^{13}\text{C}/^{12}\text{C}_{\text{sample}}}{^{13}\text{C}/^{12}\text{C}_{\text{RM}}} - 1 \right) \times 1000 [\text{‰}]$$

with VPDB – Vienna Pee Dee Belemnite as the reference material (RM).

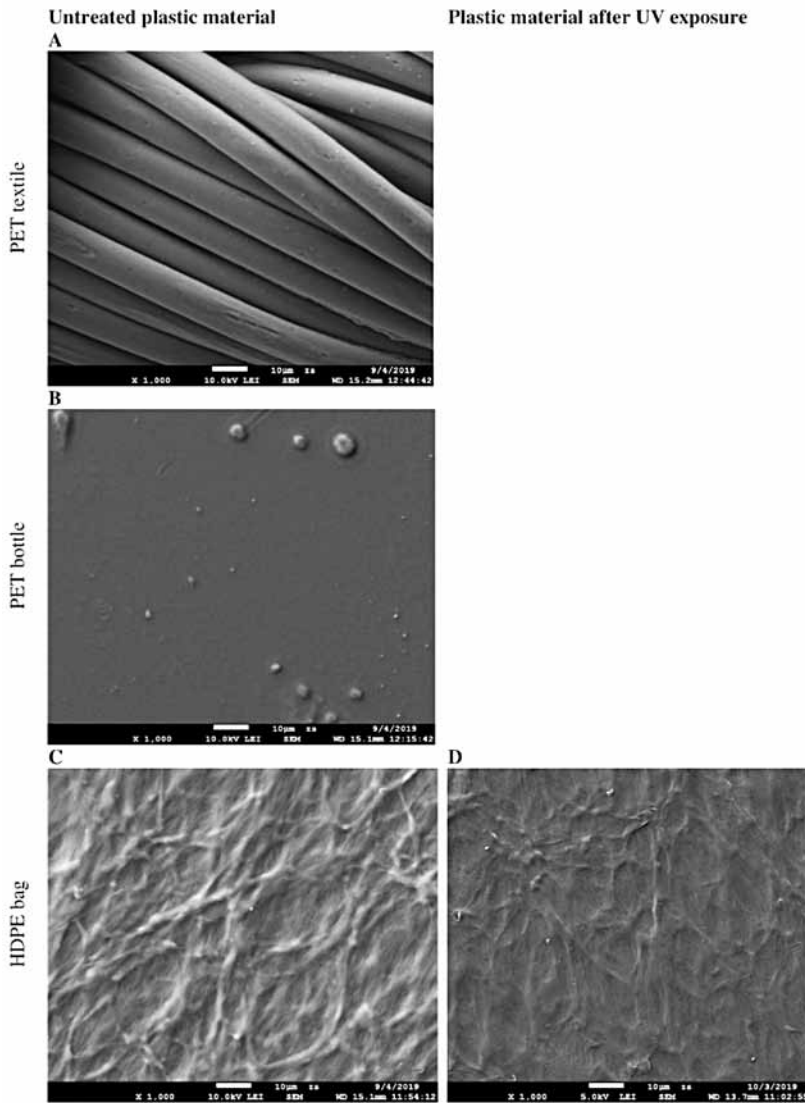
## Results and discussion

### Visual analysis of the surface of untreated and treated plastics

The surface of the three types of untreated plastics, as seen by SEM micrographs, was smooth and without any visible surface overgrowth (Fig. 2). Treatment of HDPE bag with UV-C resulted in a seemingly smoother surface (Fig. 2D).

During the two months incubation in sterilized liquid BH (negative controls), plastic pieces of PET textile (Fig. 3) and PET bottles (Fig. 4) did not show substantial textural changes. However, individual rod-shaped cells or coccoid microorganisms occurred on the plastics, mostly on PET bottles, indicating microbial contamination. On the contrary, changes in surface texture were obvious for HDPE bags in control flasks (Fig. 5), which at the end of experiments showed rougher texture with cracks. PET bottles, PET textile and HDPE bag materials from flask inoculated with activated sludge, differed in both density of microorganisms and biofilm development. The highest microbial diversity and the most developed biofilm was observed on material from the PET bottle, and the least or almost none was found on PET textile. Colonization on PET bottles included the formation of deposits of extracellular polymeric substance (EPS) and the presence of different types of cells (coccoid, rods, spirals, corkscrews) in the form of single cells, pairs, chains or clusters (Fig. 6). The low colonization rate on textiles may be due to impregnation with antimicrobial additives, physical characteristics of the material, or other factors, such as not suitable growth temperature. FTIR analysis did not indicate substantial differences in PET structure and composition between the PET bottle and PET textile. However, some antimicrobial additives could be present in the PET textile that were not detected by FTIR.

Antimicrobial additives are widely used in the production of polyester (PET) and polyamide (PA) fibres in order to avoid pathogenic microorganism infection, control microbe infestation, limit the deterioration of textiles, control the spread of disease, reduce the formation of odour by microbial metabolism, and protect the textile products from staining, discolouration, and quality deterioration (Al-Balakocy and Shalaby 2017). The plastics of PET bottles as substrate lead to the highest perceived variety of cell morphology and the most structured and mature biofilm (Fig. 6). Despite this high growth, no obvious textural changes in the plastics itself could be

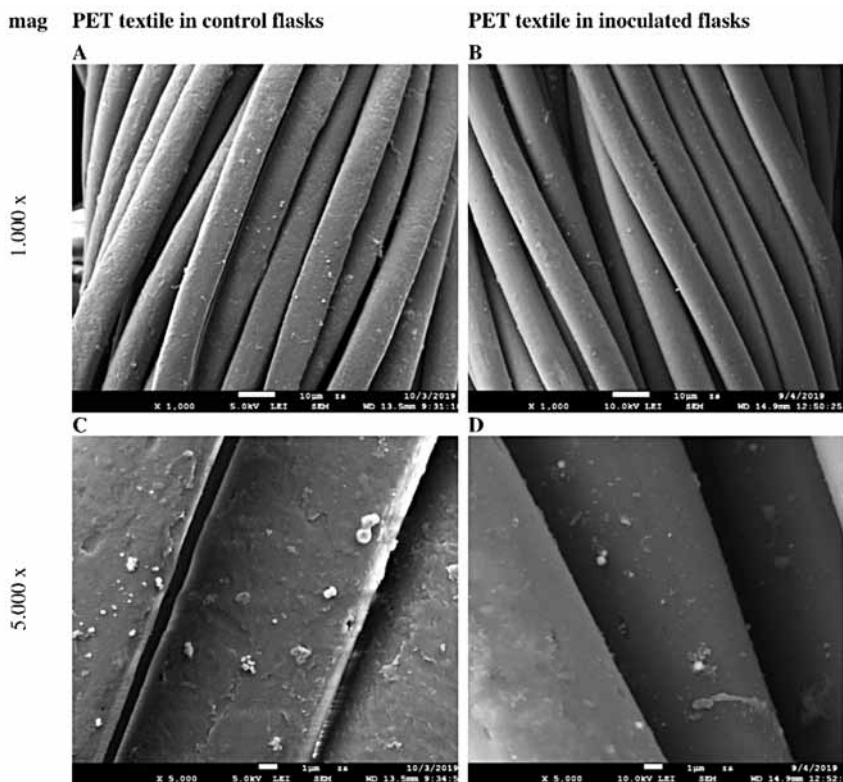


**Figure 2:** SEM micrographs of untreated PET textile (A), PET bottle (B) and HDPE bag (C) at 1000 x magnification and of HDPE bag (D) exposed for 7 days to UV light at 1000 x magnification.

**Slika 2:** SEM mikrograf neobdelanega PET blaga (A), PET plastenke (B), HDPE vrečke (C) in HDPE vrečke (D), 7 dni izpostavljeni UV svetlobi na 1000 x povečavi.

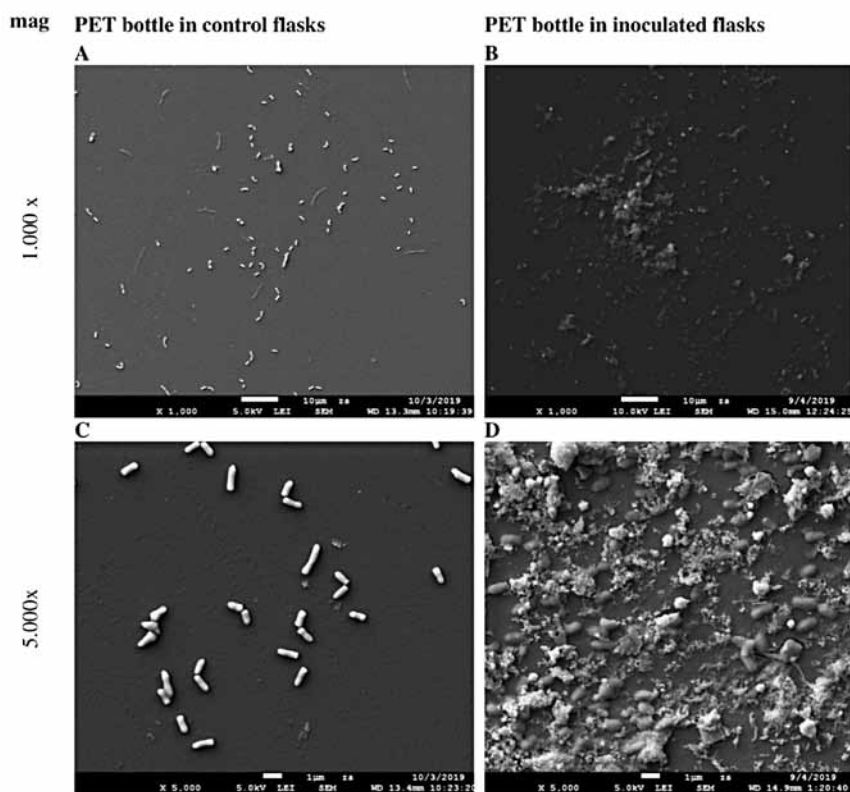
observed. The HDPE bag, a material successfully sterilized with UV-C, supported the growth of microorganisms from activated sludge (Fig. 5). As with the PET bottles, the microorganisms seem to form a biofilm with cells embedded in

the matrix. Contrary to PET plastics, the HDPE texture changed during the experiment; however, these changes were observed with and without activated sludge. Therefore, it is not clear whether the changes are due to abiotic or biotic factors.



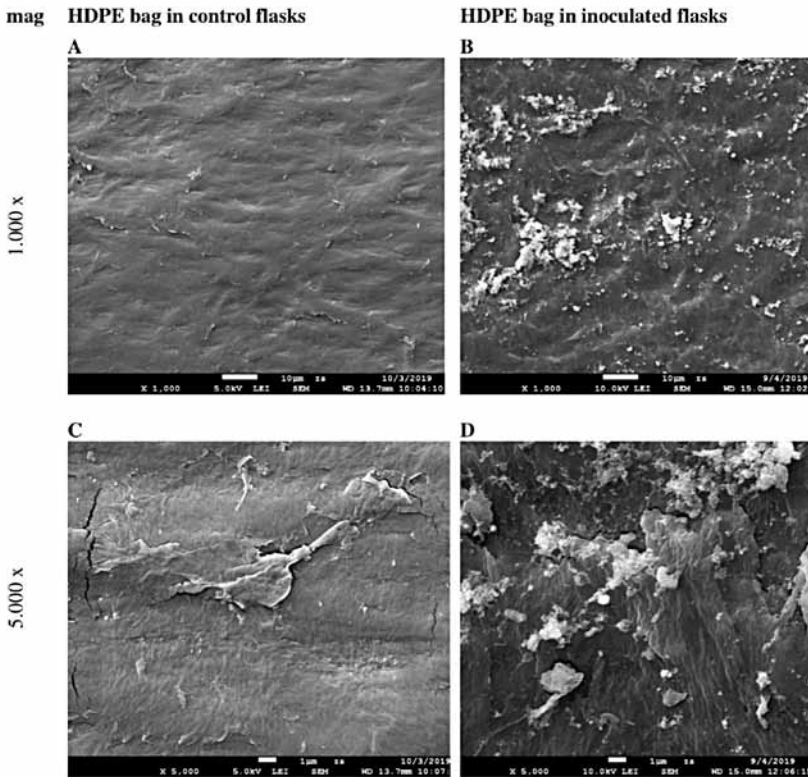
**Figure 3:** SEM micrographs of PET textile incubated for two months in sterilized media (A, C), and PET textile incubated in media with added microorganisms from activated sludge (B, D). Magnification (mag) showed left.

**Slika 3:** SEM mikrograf PET blaga, inkubiranega 2 meseca v steriliziranem gojišču (A, C) in PET blaga, inkubiranega v gojišču z dodanimi mikroorganizmi iz aktivnega blata (B, D). Povečava (mag) prikazana levo.



**Figure 4:** SEM micrographs of PET bottles incubated for two months in sterilized media (A, C), and PET bottles incubated in media with added microorganisms from activated sludge (B, D). Magnification (mag) showed left.

**Slika 4:** SEM mikrograf PET plastenk, inkubiranih 2 meseca v steriliziranem gojišču (A, C) in PET plastenk, inkubiranih v gojišču z dodanimi mikroorganizmi iz aktivnega blata (B, D). Povečava (mag) prikazana levo.



**Figure 5:** SEM micrographs of HDPE bag incubated for two months in sterilized media (A, C), and HDPE bag incubated in media with added microorganisms from activated sludge (B, D). Magnification (mag) showed left.

**Slika 5:** SEM mikrograf HDPE vrečk, inkubiranih 2 meseca v steriliziranem gojišču (A, C) in HDPE vrečk, inkubiranih v gojišču z dodanimi mikroorganizmi iz aktivnega blata (B, D). Povečava (mag) prikazana levo.

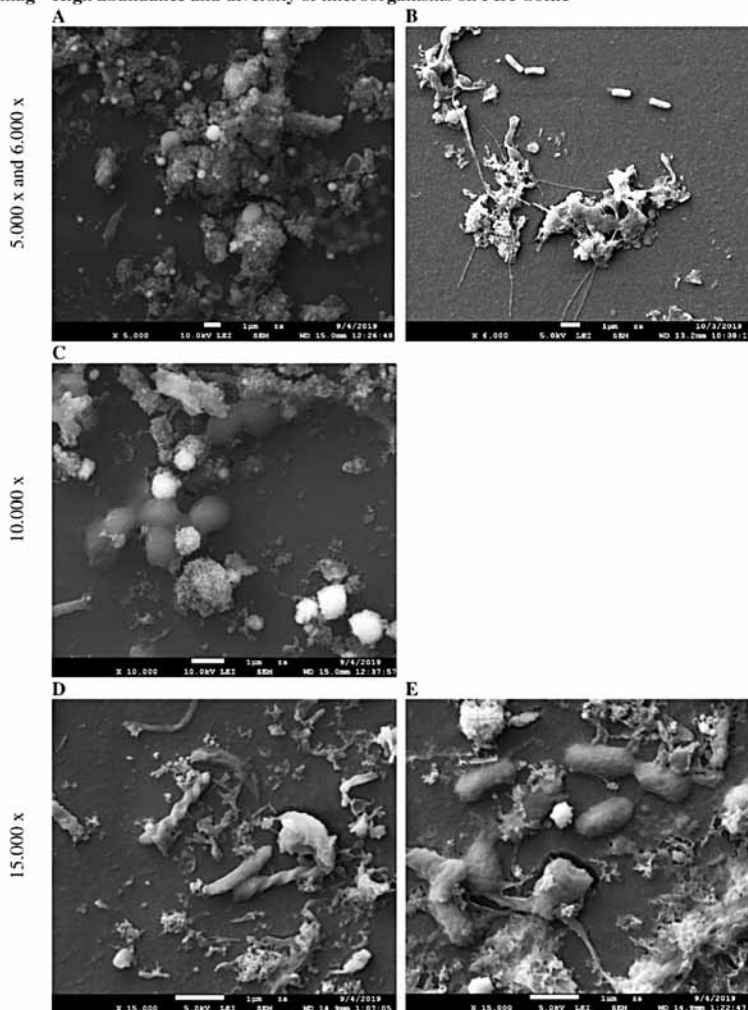
Overall, this study confirmed the capabilities of plastics to support growth of microorganisms and formation of biofilms from samples of activated sludge. An ecotoxicity study of primary MP by Jemec Kokalj et al. (2019) demonstrated that primary MP from cosmetic products became coated by organic/inorganic material and possibly microorganisms when incubated for three weeks in different environmental samples (spring water, river water, landfill leachate, WWTP effluent), as visualized by light microscopy. They observed the most pronounced overgrowth on MP incubated in the leachate collected from a landfill collection basin and the least in those from WWTP effluent (Jemec Kokalj et al. 2019). Since they did not use samples from activated sludge, a direct compari-

son with our study is not possible. Nevertheless, our observation of biofilm formation on plastics after exposure to activated sludge is in general agreement with their results. A study by Khatoun et al. (2014) revealed biofilm succession associated with degradative effects on plastic (PP) and contaminants in the sludge. Their surface analysis of plastics by SEM revealed the emergence of profound bacterial growth on the surface of PP beads. Biofilm development started after the third week of incubation. Six-week-old biofilm showed maximum growth and long chains of bacilli, which were succeeded by bacilli of larger sizes, followed after nine weeks by the predominance of mostly rod-shaped bacteria embedded in thick EPS. During biofilm formation they identified

13 microbial strains (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris*, *Alcaligenes faecalis*, *Shigella dysenteriae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus lactis*, and *Corynebacterium xerosis*) by biochemical

characterization. Since a global study by Wu et al. (2019) demonstrated that activated sludge over the globe has a small, core bacterial community (28 operational taxonomic units), we expect that strains from our samples, at least to some extent, coincide with the strains identified by Khatoon et al. (2014).

mag High abundance and diversity of microorganisms on PET bottle



**Figure 6:** SEM micrographs indicating high abundance and diversity of microorganisms growing on PET bottles. The magnification was 5.000 x (A), 6.000 x (B), 10.000 x (C), 15.000 x (D, E). Magnification (mag) showed left.

**Slika 6:** SEM mikrografi nakazujejo visoko abundanco in diverzitetu mikroorganizmov, rastočih na PET plastenkah. Povečava je 5.000 x (A), 6.000 x (B), 10.000 x (C), 15.000 x (D, E). Povečava (mag) prikazana levo.



Microbial diversity, based on observation of their cell morphology, was different on different types of plastics. We found the highest diversity of cell morphological diversity on PET water bottle and the lowest on PET textile fibres. PET water bottles are more closely regulated for any toxic compounds because they are used for storing drinking water consumed by humans, which may explain the highest cell morphological diversity found in them. Textile fibres, however, may be treated with different antimicrobial chemicals widely used in textile production (Al-Balakocy and Shalaby 2017). Parrish and Fahrenfeld (2019) found differences in biofilm composition between polystyrene (PS) and polyethylene (PE) microparticles that were exposed to environmental samples for only 48 hours. In their study, Deltaproteobacteria and Acidimicrobia (two classes common to wastewater), and Saprospirae of Bacteroidetes prevailed in wastewater PS and PE biofilms, and they observed elevated Gammaproteobacteria in PE microparticle biofilm and Betaproteobacteria in the PS biofilm in river water. They concluded that differences were due to the morphology/surface texture rather than polymer composition. They did not observe differences in biofilm due to particle size (particles smaller or larger than 250  $\mu\text{m}$ ), and they proved that biofilm microbial communities differed from communities in the surrounding water. Ogonowski et al. (2018) exposed ambient Baltic bacterioplankton to plastic substrates commonly found in marine environments (PE, PP, and PS) as well as native (cellulose) and inert (glass beads) particles for two weeks under controlled conditions. They found significant differences between plastics and non-plastic substrates in their community composition and diversity. Through operational taxonomic units (OTUs) data, the PE and PP communities were quite similar, whereas that on PS was more distinct. They determined that the observed differences were most probably due to surface hydrophobicity of the materials. Similarly, significantly different communities were observed on low density polyethylene (LDPE), polyethylene terephthalate (PET), and polypropylene (PP) materials from marine environments using denaturing gradient gel electrophoresis (DDGE) profiles (Oberbeckmann et al. 2014).

### *Microorganisms growth in liquid BH media*

After one and a half months, measurements of optical density ( $\text{OD}_{600}$ ) did not indicate microbial growth in the liquid medium. The  $\text{OD}_{600}$  of BH media was low (0.0603) and similar to the one in the control flask (0.0678). Optical density (OD) measurements of microbial growth are one of the most common techniques used in microbiology, including investigations of growth under different nutritional or stress environments, where the OD value obtained is assumed to be proportional to the cell number (Stevenson et al. 2016). For example, for *E. coli* cell cultures,  $\text{OD}_{600}$  of 1 corresponds to  $8 \times 10^8$  cells  $\text{mL}^{-1}$ . However, to be accurate, the OD method needs thorough calibration and depends on the type of instrument, size and shape of the cells, and changes in the refraction of medium or cells (Stevenson et al. 2016). Our results indicate no microbial growth in liquid media in comparison with the growth on plastics itself as seen by SEM. We speculate that the microbial growth was not present in liquid BH medium containing only minerals, because of nutrient limitations. The food was present only in the form of carbon bonded within synthetic polymers (i.e. particles of PET textile and bottle and HDPE bag) localizing at the bottom of the 250 mL flasks. In contrast, when comparing surrounding media and biofilm, the study of Eckert et al. (2018) demonstrated that after 15 days, the bacterial community composition was not different between biofilm and free-living communities in the 750 mL vessels with different concentrations of PS microparticles (sizes 4 mm x 4 mm x 0.1 mm). Nevertheless, their experiment aimed to demonstrate that microplastics can be a vector for microorganisms from the WWTPs, not a source of carbon. Consequently, they used liquid media with a carbon source in the form of chitin. Moreover, the plastic particles added to the experiment were continually floating in the water column enabling uniform distribution of microorganisms within the experimental vessels.

### *Isotopic analysis*

Values for  $\delta^{13}\text{C}$  in untreated and treated materials, incubated in liquid BH medium in this study are presented in Table 1. The comparison

of the  $\delta^{13}\text{C}$  values in treated and untreated materials, indicated that the  $\delta^{13}\text{C}$  value increased (enriched with heavy carbon isotope  $\delta^{13}\text{C}$ ) in both the control and inoculated flasks (Table 1). Berto et al. (2017) preliminary study reported on  $\delta^{13}\text{C}$  values for various plastic materials, including PET bottles for drinking water and HDPE bags. They characterized plastic polymers using EA/IRMS where mean  $\delta^{13}\text{C}$  for PET was  $-27.84 \pm 1.71$  ‰ as opposed to this study where  $\delta^{13}\text{C}$  for untreated PET was  $-29.0 \pm 0.2$  ‰. Mean  $\delta^{13}\text{C}$  value for HDPE bag was  $-33.97 \pm 0.70$  ‰ in the study of Berto et al. (2017) and we measured  $-30.2 \pm 0.1$  ‰ for untreated HDPE in this study. Plastics degraded in the marine environment showed an increase of  $\delta^{13}\text{C}$  values (Berto et al. 2017), which was also the case in our study. The shift of  $\delta^{13}\text{C}$  could be related to physical/chemical or biological degradation although it was not possible to evaluate the degradation rate. The results indicated that this method has the potential to be used in biodegradation studies but careful experimental design is needed.

### Critical evaluation of methodology

The chosen sterilization approach for plastics, namely UV-C, was found not to be totally efficient since microorganisms were detected on the plastics from control flasks. The UV-C sterilization was more suitable for thinner plastic bags of HDPE and less for PET textile and thicker plastic of PET water bottles. The morphology of microorganisms observed on the two materials from control flasks was different. Coccoid microorganisms were present in PET textile (Fig. 3), and rod-shaped cells were dominant in PET bottles (Fig. 4). This indicates that the contamination is not a consequence of an experimental error but instead is linked to the materials themselves. Most likely, the contamination is due to the limited penetration of UV-C through these materials. The results indicate that a combination of sterilization approaches may be required and will be used in further studies. The observations are in line with a previous study of Meechan and Wilson (2006) which shows that while UV-C is germicidal and virucidal, it does not penetrate well and will only disinfect the outer

**Table 1:** Isotopic composition of carbon ( $\delta^{13}\text{C}$ ) measured in plastic materials prior to the experiment (untreated material) and these incubated in control flask and flask inoculated with activated sludge (treated material). The average values and SD of the replicate measurements on the same sample are shown. Sign  $\epsilon$  (enrichment factor) represents the difference to respective untreated material.

**Tabela 1:** Izotopska sestava ogljika ( $\delta^{13}\text{C}$ ) merjena v plastičnih materialih pred poskusom (netretiran material) in po poskusu v kontrolni Erlenmajerici in Erlenmajerici z dodanim inoculum iz aktivnega blata (tertiran material). Prikazane so srednje vrednosti in SD zaporednih meritev istega vzorca. Znak  $\epsilon$  (obogatitveni faktor) predstavlja razliko do neobdelanega materiala.

	Untreated material $\delta^{13}\text{C}$	Treated material $\delta^{13}\text{C}$	
	[‰ $\pm$ s‰]	Control flask [‰ $\pm$ s‰]	Flask with activated sludge [‰ $\pm$ s‰]
Textile (PET)	$-28.9 \pm 0.1$	$-28.2 \pm 0.1$ $\epsilon = 0.7$	$-28.1 \pm 0.1$ $\epsilon = 0.8$
Bottle (PET)	$-29.0 \pm 0.2$	$-28.6 \pm 0.1$ $\epsilon = 0.4$	$-28.6 \pm 0.2$ $\epsilon = 0.4$
Bag (HDPE)	$-30.2 \pm 0.1$	$-29.7 \pm 0.1$ $\epsilon = 0.5$	$-29.8 \pm 0.2$ $\epsilon = 0.4$

surface of a material. Plastics of PET bottles were also not efficiently sterilized with UV-C before to the experiment and showed contamination (Fig. 4). However, the final abundance of microbial growth in control was far below that observed on plastics exposed to activated sludge.

## Conclusions

This study represents one of the rare insights into the differences in interactions between PET textile, PET bottle, and HDPE bag and microorganisms outside of the marine environments, namely with microorganisms from activated sludge. Through a combination of SEM and stable isotopic analyses, we demonstrated that the chemical composition of plastics and its surface characteristics (morphology, texture) play a significant role in biofilm development regarding both its diversity and complexity, presumably because of easier adhesion. The value of  $\delta^{13}\text{C}$  slightly increased in all tested materials compared to the source material suggesting certain level of degradation. The study results show that microorganisms are capable of colonizing plastics in environments without other carbon sources. Among the PET textile, PET bottles, and HDPE bags, the last two promoted the most abundant growth and seemingly more structured and mature biofilm as evidenced by SEM micrographs. Further studies with improved experimental design, including metagenomic approaches, which may be useful in identifying the microorganisms present in activated sludge that are more successful in the colonization of plastics. As potential bio-degraders, these microorganisms are of interest to isolate in pure cultures as well.

## Acknowledgements

The study was funded by the Slovenian Research Agency (research programs P1-0255, P4-0165, P1-0143 and Ph.D. fellowship awarded to TM). We extend thanks to the managers and employees of CČN Domžale-Kamnik d.o.o. for enabling access to the activated sludge samples. We also thank Sara Novak, PhD, for technical support during sample preparation for SEM.

## Povzetek

Posledica povečanja produkcije sintetičnih ali pol-sintetičnih organskih spojin (plastike) in njihove vse bolj razširjene uporabe je tudi povečano pojavljanje plastike v celinskih vodah. V okolju najdemo različne vrste plastičnih materialov (npr. polietilen visoke oz. nizke gostote (HD/LD-PE), ali polietilen tereftalat (PET)), ki se pojavljajo v različnih oblikah (npr. fragmenti, peleti, filamenti). Prvi stik plastike z biosfero so običajno kolonizacijski mikroorganizmi, vendar je ta interakcija v celinskih vodah slabo raziskana. V študiji smo poskušali bolje razumeti, kako poteka kolonizacijski proces mikroorganizmov iz aktivnega blata na različnih plastičnih materialih, prepoznali smo tudi nekatere metodološke izboljšave, ki jih bomo upoštevali v nadaljnjih eksperimentih.

V preliminarni raziskavi smo uporabili plastične materiale, ki so se razlikovali tako v kemični sestavi (PET in HDPE) kot tudi v površinskih lastnostih (blago, debelejšje platenke in tanjše plastične vrečke). Materiale smo najprej teden dni izpostavili UV-A, s čimer smo simulirali sončno svetlobo, nato smo ga pred vnosom v gojišče sterilizirali z UV-C. V erlenmajerice z BH gojiščem smo zraven različnih kosov plastike (2 x 2 cm) dodali še mikrobe iz vzorca aktivnega blata iz centralne čistilne naprave (CČN) Domžale-Kamnik, eno smo pustili ne-inokulirano kot negativno kontrolo. Erlenmajerice smo 2 meseca stresali na sobni temperaturi (22-24°C) in 120 rpm ter jih redno prestavljali v sveže gojišče s testnimi plastičnimi materiali, da bi bakterijam preprečili rabo ogljika, sproščenega iz odmrlih bakterij. Ob koncu eksperimenta smo v tekočih gojiščih izmerili  $\text{OD}_{600}$  ter izvedli analizo izotopske sestave ogljika ( $\delta^{13}\text{C}$ ) in vizualno analizo z uporabo vrstičnega elektronskega mikroskopa (SEM) vseh treh plastičnih materialov.

Ugotovili smo, da so mikroorganizmi iz aktivnega blata sposobni kolonizirati plastiko brez dodatnih virov ogljika in da kemijska sestava plastike najverjetneje vpliva na razvoj biofilma. Biofilm, ki se je tvoril na PET platenkah in HDPE vrečkah, je bil glede na SEM mikrofotografije bolj strukturiran in zrel, na kar najverjetneje vpliva kemična sestava plastike, aditivi in njene površinske lastnosti. Ugotovili smo tudi, da sterilizacija plastike z UV ni zadostna. Vrednost  $\delta^{13}\text{C}$  je bila

višja v materialih izpostavljenih mikroorganizmom v primerjavi z ne-tretiranim materialom, kar najverjetneje nakazuje degradacijo. V nadaljnjih eksperimentih bomo uporabili več različnih

okoljskih virov mikroorganizmov, izboljšan način sterilizacije in metagenomske pristope, s končnim ciljem izolirati seve, ki so sposobni razgrajevati težko razgradljive plastične materiale.

## References

- Al-Balakocy, N., Shalaby, S. E., 2017. Imparting antimicrobial properties to polyester and polyamide fibers-state of the art. *Journal of the Textile Association*, 78, 179-201.
- Arkatkar, A., Arutchelvi, J., Bhaduri, S., Uppara, P. V., Doble, M. 2009. Degradation of unpretreated and thermally pretreated polypropylene by soil consortia. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 63(1), 106-111.
- Arkatkar, A., Juwarkar, A. A., Bhaduri, S., Uppara, P. V., Doble, M., 2010. Growth of *Pseudomonas* and *Bacillus* biofilms on pretreated polypropylene surface. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 64(6), 530-536. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.06.002>
- Auta, H. S., Emenike, C. U., Fauziah, S. H., 2017. Screening of *Bacillus* strains isolated from mangrove ecosystems in Peninsular Malaysia for microplastic degradation. *Environmental Pollution*, 231, 1552-1559. doi: 10.1016/j.envpol.2017.09.043.
- Auta, H. S., Emenike, C. U., Jayanthi, B., Fauziah, S. H., 2018. Growth kinetics and biodeterioration of polypropylene microplastics by *Bacillus* sp. and *Rhodococcus* sp. isolated from mangrove sediment. *Marine pollution bulletin*, 127, 15-21. doi: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.11.036>
- Awasthi, S., Srivastava, P., Singh, P., Tiwary, D., Mishra, P. K., 2017. Biodegradation of thermally treated high-density polyethylene (HDPE) by *Klebsiella pneumoniae* CH001. *3 Biotech*, 7(5), 332. doi: 10.1007/s13205-017-0959-3
- Battin, T. J., Besemer, K., Bengtsson, M. M., Romani, A. M., Packmann, A. I., 2016. The ecology and biogeochemistry of stream biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 14(4), 251-263. doi: 10.1038/nrmicro.2016.15
- Berto, D., Rampazzo, F., Gion, C., Noventa, S., Ronchi, F., Traldi, U., Giorgi, G., Cicero, A. M., Giovanardi, O., 2017. Preliminary study to characterize plastic polymers using elemental analyser/isotope ratio mass spectrometry (EA/IRMS). *Chemosphere*, 176, 47-56. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.090>
- Bushnell, L. D., Haas, H. F., 1941. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. *Journal of Bacteriology*, 41(5), 653-673.
- Caruso, G., 2020. Microbial Colonization in Marine Environments: Overview of Current Knowledge and Emerging Research Topics. *Journal of Marine Science and Engineering*, 8(2), 78.
- Dang, H., Lovell, C. R., 2016. Microbial Surface Colonization and Biofilm Development in Marine Environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 91-138. doi: 10.1128/mubr.00037-15
- Dobretsov, S., 2010. Marine Biofilms. In: S., Dürr and J. C., Thomason (Eds.), *Biofouling* (pp. 123-136).
- Dunne, W. M., 2002. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 155-166. doi: 10.1128/cmr.15.2.155-166.2002
- Eckert, E. M., Di Cesare, A., Kettner, M. T., Arias-Andres, M., Fontaneto, D., Grossart, H.-P., Corno, G., 2018. Microplastics increase impact of treated wastewater on freshwater microbial community. *Environmental Pollution*, 234, 495-502. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.070>
- Francis, V., Subin, S. R., Bhat, S. G., Thachil, E. T., 2011. Characterization of Linear Low-Density Polyethylene/Poly(vinyl alcohol) Blends and Their Biodegradability by *Vibrio* sp. Isolated from Marine Benthic Environment. *Journal of Applied Polymer Science*, 124, 257-265. doi: 10.1002/app.34155

- Harrison, J. P., Hoellein, T. J., Sapp, M., Tagg, A. S., Ju-Nam, Y., Ojeda, J. J., 2018. Microplastic-Associated Biofilms: A Comparison of Freshwater and Marine Environments. In M. Wagner and S. Lambert (Eds.), *Freshwater Microplastics : Emerging Environmental Contaminants?* (pp. 181-201). Cham: Springer International Publishing.
- Huang, J. T., Cui, C. N., 2012. Study on Biodegradable Behavior of Polyesters in the Soil of FuJian Local. *Advanced Materials Research*, 472-475, 1881-1884. doi: doi.org/10.4028/www.scientific.net/amr.472-475.1881
- Jacquin, J., Cheng, J., Odobel, C., Pandin, C., Conan, P., Pujo-Pay, M., Barbe, V., Meistertzheim, A.-L., and Ghiglione, J.-F., 2019) Microbial Ecotoxicology of Marine Plastic Debris: A Review on Colonization and Biodegradation by the “Plastisphere”. *Frontiers in Microbiology*, 10(865). doi: 10.3389/fmicb.2019.00865
- Jemec Kokalj, A., Kuehnel, D., Puntar, B., Žgajnar Gotvajn, A., Kalčikova, G., 2019. An exploratory ecotoxicity study of primary microplastics versus aged in natural waters and wastewaters. *Environmental Pollution*, 254, 112980. doi: https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.112980
- Khatoun, N., Naz, I., Ali, M. I., Ali, N., Jamal, A., Hameed, A., Ahmed, S., 2014. Bacterial succession and degradative changes by biofilm on plastic medium for wastewater treatment. *Journal of Basic Microbiology*, 54(7), 739-749. doi: 10.1002/jobm.201300162
- Kowalczyk, A., Chyc, M., Rysza, P., Latowski, D., 2016. *Achromobacter xylosoxidans* as a new microorganism strain colonizing high-density polyethylene as a key step to its biodegradation. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(11), 11349-11356. doi: 10.1007/s11356-016-6563-y
- Li, J., Liu, H., Paul Chen, J., 2018. Microplastics in freshwater systems: A review on occurrence, environmental effects, and methods for microplastics detection. *Water Research*, 137, 362-374. doi: https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.12.056
- Lobelle, D., Cunliffe, M., 2011. Early microbial biofilm formation on marine plastic debris. *Marine Pollution Bulletin*, 62(1), 197-200. doi: https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.10.013
- Lv, X. Dong, Q., Zuo, Z., Liu, Y. Huang, X., Wu, W.-M., 2019. Microplastics in a municipal wastewater treatment plant: Fate, dynamic distribution, removal efficiencies, and control strategies. *Journal of Cleaner Production*, 225, 579-586. doi: https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.03.321
- McCormick, A., Hoellein, T. J., Mason, S. A., Schluep, J., Kelly, J. J., 2014. Microplastic is an Abundant and Distinct Microbial Habitat in an Urban River. *Environmental Science and Technology*, 48(20), 11863-11871. doi: 10.1021/es503610r
- McDonnell, G., Russell, A. D., 1999. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(1), 147-179. doi: 10.1128/cmr.12.1.147
- Meehan, P. J., Wilson, C., 2006. Use of Ultraviolet Lights in Biological Safety Cabinets: A Contrarian View. *Applied Biosafety*, 11(4), 222-227.
- Mohan, A. J., Sekhar, V. C., Bhaskar, T., Nampoothiri, K. M., 2016. Microbial assisted High Impact Polystyrene (HIPS) degradation. *Bioresource Technology*, 213, 204-207. doi: https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.021
- Mohanrasu, K., Premnath, N., Siva Prakash, G., Sudhakar, M., Boobalan, T., Arun, A., 2018. Exploring multi potential uses of marine bacteria; an integrated approach for PHB production, PAHs and polyethylene biodegradation. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 185, 55-65. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2018.05.014
- Oberbeckmann, S., Löder, M. G. J., Labrenz, M., 2015. Marine microplastic-associated biofilms – a review. *Environmental Chemistry*, 12(5), 551-562. doi: https://doi.org/10.1071/EN15069
- Oberbeckmann, S., Loeder, M. G. J., Gerds, G., Osborn, A. M., 2014. Spatial and seasonal variation in diversity and structure of microbial biofilms on marine plastics in Northern European waters. *FEMS Microbiology Ecology*, 90(2), 478-492. doi: 10.1111/1574-6941.12409
- Ogonowski, M., Motiei, A., Ininbergs, K., Hell, E., Gerdes, Z., Udekwu, K. I., Bacsik, Z., Gorokhova, E., 2018. Evidence for selective bacterial community structuring on microplastics. *Environmental Microbiology*, 20(8), 2796-2808. doi: 10.1111/1462-2920.14120

- Parrish, K., Fahrenfeld, N. L., 2019. Microplastic biofilm in fresh- and wastewater as a function of microparticle type and size class. *Environmental Science: Water Research and Technology*, 5(3), 495-505. doi: 10.1039/C8EW00712H
- Roager, L., Sonnenschein, E. C., 2019. Bacterial Candidates for Colonization and Degradation of Marine Plastic Debris. *Environmental Science and Technology*, 53(20), 11636-11643. doi: 10.1021/acs.est.9b02212
- Rummel, C. D., Jahnke, A., Gorokhova, E., Kühnel, D., Schmitt-Jansen, M., 2017. Impacts of Biofilm Formation on the Fate and Potential Effects of Microplastic in the Aquatic Environment. *Environmental Science and Technology Letters*, 4(7), 258-267. doi: 10.1021/acs.estlett.7b00164
- Smith, B. C., 2011. *Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy*: CRC press.
- Stevenson, K., McVey, A. F., Clark, I. B. N., Swain, P. S., Pilizota, T., 2016. General calibration of microbial growth in microplate readers. *Scientific Reports*, 6, 38828. doi: 10.1038/srep38828
- Wagner, M., Lambert, S., 2018. *Freshwater Microplastics* Springer International Publishing.
- Wagner, M., Scherer, C., Alvarez-Muñoz, D., Brennholt, N., Bourrain, X., Buchinger, S., Fries, E., Grosbois, C., Klasmeier, J., Marti, T., Rodriguez-Mozaz, S., Urbatzka, R., Vethaak, A. D., Winther-Nielsen, M., Reifferscheid, G., 2014. Microplastics in freshwater ecosystems: what we know and what we need to know. *Environmental Sciences Europe*, 26(1), 12. doi: 10.1186/s12302-014-0012-7
- Wu, L. Ning, D., Zhang, B. Li, Y., Zhang, P., Shan, X., Zhang, Q., Brown, M., Li, Z., Van Nostrand, J. D., Ling, F., Xiao, N., Zhang, Y., Vierheilig, J., Wells, G. F., Yang, Y., Deng, Y., Tu, Q., Wang, A., Acevedo, D., Agullo-Barcelo, M., Alvarez, P. J. J., Alvarez-Cohen, L., Andersen, G. L., de Araujo, J. C., Boehnke, K., Bond, P., Bott, C. B., Bovio, P., Brewster, R. K., Bux, F., Cabezas, A., Cabrol, L., Chen, S., Criddle, C. S., Deng, Y., Etchebere, C., Ford, A., Frigon, D., Gómez, J. S., Griffin, J. S., Gu, A. Z., Habagil, M., Hale, L., Hardeman, S. D., Harmon, M., Horn, H., Hu, Z., Jauffur, S., Johnson, D. R., Keller, J., Keucken, A., Kumari, S., Leal, C. D., Lebrun, L. A., Lee, J., Lee, M., Lee, Z. M. P., Li, Y., Li, Z., Li, M., Li, X., Ling, F., Liu, Y., Luthy, R. G., Mendonça-Hagler, L. C., de Menezes, F. G. R., Meyers, A. J., Mohebbi, A., Nielsen, P. H., Ning, D., Oehmen, A., Palmer, A., Parameswaran, P., Park, J., Patsch, D., Reginatto, V., de los Reyes, F. L., Rittmann, B. E., Robles, A. N., Rossetti, S., Shan, X., Sidhu, J., Sloan, W. T., Smith, K., de Sousa, O. V., Stahl, D. A., Stephens, K., Tian, R., Tiedje, J. M., Tooker, N. B., Tu, Q., Van Nostrand, J. D., De los Cobos Vasconcelos, D., Vierheilig, J., Wagner, M., Wakelin, S., Wang, A., Wang, B., Weaver, J. E., Wells, G. F., West, S., Wilmes, P., Woo, S.-G., Wu, L., Wu, J.-H., Wu, L., Xi, C., Xiao, N., Xu, M., Yan, T., Yang, Y., Yang, M., Young, M., Yue, H., Zhang, B., Zhang, P., Zhang, Q., Zhang, Y., Zhang, T., Zhang, Q., Zhang, W., Zhang, Y., Zhou, H., Zhou, J., Wen, X., Curtis, T. P., He, Q., He, Z., Brown, M., Zhang, T., He, Z., Keller, J., Nielsen, P. H., Alvarez, P. J. J., Criddle, C. S., Wagner, M., Tiedje, J. M., He, Q., Curtis, T. P., Stahl, D. A., Alvarez-Cohen, L., Rittmann, B. E., Wen, X., Zhou, J., *Global Water Microbiome*, C., 2019. Global diversity and biogeography of bacterial communities in wastewater treatment plants. *Nature Microbiology*, 4(7), 1183-1195. doi: 10.1038/s41564-019-0426-5
- Yoo, J.-H., 2018. Review of Disinfection and Sterilization – Back to the Basics. *Infection and Chemotherapy*, 50(2), 101-109. doi: doi.org/10.3947/ic.2018.50.2.101



**Design of species-specific primers for rapid detection and identification of  
*Candida parapsilosis sensu stricto***

Zasnova vrstno-specifičnih oligonukleotidnih začetnikov za hitro zaznavanje in identifikacijo kvasovke *Candida parapsilosis sensu stricto*

Monika Novak Babič\*, Nina Gunde-Cimerman

Department of Biology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, 1000 Ljubljana, Slovenia

\*correspondence: monika.novakbabic@bf.uni-lj.si

**Abstract:** *Candida* species are the cause of approximately two million cases of candidiasis yearly worldwide, and are frequently involved in life-threatening infections. After *Candida albicans*, the *Candida parapsilosis* complex is the second most common cause of *Candida* infections, particularly in patients in intensive care units and in neonates. Contrary to many *Candida* species, *C. parapsilosis sensu stricto* is frequently present in water, and on surfaces made of plastic, rubber, and silicone, where it acts as a primary coloniser for biofilm establishment. Identification methods for the *C. parapsilosis* complex include culture-dependent methods, MALDI-TOF, and multiplex PCR using ITS region, but remains amongst the most frequently misidentified species, due to the genetic similarity and lack of species-specific primers. In the present study, we developed novel species-specific primers for detection and identification of *C. parapsilosis sensu stricto* using locus CPAR2\_105320, as template for easily accessible and widely used conventional PCR method. Using these primers, we successfully detected and identified *C. parapsilosis sensu stricto* in pure cultures isolated from clinical specimens and indoor environments. Additionally, this method enables detection of *C. parapsilosis sensu stricto* in biofilms and tap water samples from which DNA was extracted, and directly from suspensions of washed swab samples. All positive cases showed single clear band with 574 base pairs. Sequencing of the amplicon proved designed primers to be species-specific. In the future, primers can serve as a tool for rapid detection of *C. parapsilosis sensu stricto* in the environment and clinical settings.

**Keywords:** *Candida parapsilosis*, detection methods, emerging pathogen, novel primers, conventional PCR, species specific

**Izveček:** Vrste rodu *Candida* so vzrok za približno dva milijona kandidiaz letno po vsem svetu in so pogosto povzročiteljice življenjsko nevarnih okužb. Po pogostosti so okužbe s kompleksom vrst *Candida parapsilosis* na drugem mestu, takoj za *Candida albicans*. Najpogostejše okužijo bolnike na oddelkih intenzivne nege in nedonošenčke. V nasprotju s številnimi vrstami iz rodu *Candida*, je vrsta *C. parapsilosis sensu stricto* pogosto prisotna v vodi in površinah iz plastike, gume in silikona, kjer se pojavlja tudi kot začetna naseljevalka pred vzpostavitvijo biofilma. Metode identifikacije te kvasovke vključujejo gojenje, MALDI-TOF in multipleks-PCR, vendar je ta vrsta



zaradi genetske sorodnosti znotraj kompleksa vrst in pomanjkanja vrstno specifičnih oligonukleotidnih začetnikov še zmeraj med najpogosteje napačno identificiranimi vrstami rodu *Candida*. V študiji smo na podlagi lokusa CPAR2\_105320 razvili nove, vrstno specifične oligonukleotidne začetnike za klasični PCR in hitro odkrivanje ter identifikacijo vrste *C. parapsilosis sensu stricto*. Z opisanimi oligonukleotidnimi začetniki smo uspešno zaznali in identificirali *C. parapsilosis sensu stricto* v čistih kulturah, pridobljenih iz kliničnega materiala in različnih okolij. Metoda dodatno omogoča odkrivanje te vrste v vzorcih celokupne DNA, ekstrahirane iz biofilmov in pitne vode ter direktno v vzorcih brisov površin, brez predhodne DNA ekstrakcije. Po sekvenciranju smo pri vseh pozitivnih vzorcih pridobili sekvenco dolžine 574 baznih parov, ki je bila tudi vrstno specifična. Novi oligonukleotidni začetniki lahko v prihodnosti služijo kot orodje za hitro odkrivanje *C. parapsilosis sensu stricto* v naravnem in kliničnem okolju.

**Ključne besede:** *Candida parapsilosis*, klasičen PCR, metode zaznavanja, novi oligonukleotidni začetniki, porajajoči patogen, vrstna specifičnost

## Introduction

Species of the genus *Candida* have been estimated to be responsible for more than two million cases of oral, esophageal, and vulvovaginal candidiasis yearly worldwide, and an additional ~400,000 cases of invasive life-threatening fungal infections, such as candidemia and peritonitis, which have mortalities of 30% to 55% (Brown et al. 2012). About 50% of all candidemia cases are caused by *Candida albicans*, with the rest associated with some so-called 'emerging species' (Trofa et al. 2008). Among these, the second most common cause of candidemia relates to the *Candida parapsilosis* species complex (Lass-Flörl 2009). Those at the highest risk of infection are intensive care and transplantation patients, neonates, and people with cystic fibrosis (Trofa et al. 2008, Sardi et al. 2013 Cortés et al. 2019). The *Candida parapsilosis* complex consists of three closely related species: *C. parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis*, with incidences in clinical specimens of 90.7%, 8.2%, and 1.1%, respectively (Cantón et al. 2011). In contrast to many *Candida* species that have been mainly related to humans and hospital environments (e.g., *C. albicans*, *Candida auris*), *C. parapsilosis sensu stricto* is widespread in nature (Novak Babič et al. 2017a, Cortés et al. 2019, Zupančič et al. 2019) and is frequently found in other organisms, in water sources (Novak Babič et al. 2017b), and on surfaces made of dif-

ferent natural and artificial materials. These last include, in particular, materials made of plastic, rubber, and silicone (Trofa et al. 2008, Pires et al. 2011, Novak Babič et al. 2017a, Zupančič et al. 2019), where *C. parapsilosis sensu stricto* acts as a primary colonizer, and thus represents one of the main building blocks for biofilm establishment (Raghupathi et al. 2018). The formation of stable biofilms by *C. parapsilosis sensu stricto* in patients is recognized as one of its main virulence factors, while artificial materials such as prosthetic devices and catheters represent the main route for its transmission to patients (Trofa et al. 2008, Cantón et al. 2011). The primary habitat of *C. parapsilosis sensu stricto*, has been linked to the skin and hands of health workers (Huang et al. 1998), although its increased incidence in human-made indoor environments connected to water sources, such as dishwashers, washing machines, kitchens, and bathrooms, suggest a possible route of infections in the home (Novak Babič et al. 2015, Novak Babič et al. 2016, Novak Babič et al. 2017, Zupančič et al. 2016, Zupančič et al. 2019). Rapid and accurate diagnostic tools and methods are of great importance for successful treatment and patient recovery (Liguori et al. 2010, Arastehfar et al. 2019). However, to minimize incidence of infections and prevent outbreaks, it is also important to determine the possible transmission routes of emerging pathogens that can originate from biological material and patient environments (e.g., tap water, surfaces, pros-

thetic material) (Liguori et al. 2010, Bloomfield et al. 2012).

One easily accessible and widely used diagnostic method for such detection and identification is conventional PCR. The method is amongst the fastest and cheapest of methods, and it can be carried out in Biosafety-1 laboratories, using DNA templates from pure cultures or mixed biofilms (Arastehfar et al. 2019). The aim of the present study was thus to develop novel species-specific oligonucleotides for conventional PCR to detect and identify the emerging pathogen *C. parapsilosis sensu stricto* not only in pure cultures, but also in total DNA extracted from tap water and biofilms. Additionally, we have modified the PCR cycling program to detect this yeast directly on swab samples taken from different artificial surfaces, without the need for prior culture or DNA extraction.

## Materials and methods

### *Sampling, isolation and cultivation of Candida species from environmental samples*

Samples of biofilm were obtained by sterile scrapping of a 1-cm<sup>2</sup> surface area of dishwasher rubber seals, and were placed in sterile 1.5-mL microcentrifuge tubes (Eppendorf, Germany). These samples were stored at -20 °C until further processing.

Five litres of groundwater and tap water samples were collected in sterile containers. These samples were kept refrigerated at 4 °C and processed within 24 hours. One litre of each groundwater and tap water sample was filtered through 0.45-µm pore diameter filters (Millipore). These filters were placed on Dichloran Rose Bengal agar prepared with chloramphenicol, to suppress the growth of filamentous fungi and bacteria. The plates were incubated at 30 °C for 3 days to 5 days.

The sampling of surfaces in bathrooms, kitchens, washing machines, dishwashers, and refrigerators was carried out using sterile cotton swabs (Golias, Slovenia) and sterile physiological saline (9% NaCl, w/v). These samples were stored at 4 °C and processed within 2 days. Swab samples of the bottom of a shower cabinet, a kitchen sink, a dish-drying rack, a washing machine rubber seal, and a refrigerator glass shelf were vortexed in 1 mL saline at maximum speed for 1 min. The resulting cell suspensions were transferred to sterile 1.5-mL microcentrifuge tubes (Eppendorf) and centrifuged at 14,000 rpm for 5 min. After discarding the supernatant, the pellet was resuspended in 50 µL TE buffer and stored at -20 °C until further use. The rest of the swab samples were wiped over the surface of malt extract agar with chloramphenicol, and incubated at 30 °C for 3 days to 5 days.

All of the yeast colonies that grew from this sampling were transferred onto malt extract agar and incubated at 30 °C for 3 days, to obtain pure cultures. The pure cultures have been deposited in the Ex Culture Collection of the Infrastructural Centre Mycosmo, of the Department of Biology, University of Ljubljana (MRIC UL) (Slovenia: <http://www.ex-genebank.com/>). The additional non-*C. parapsilosis* yeast strains used in this study (Tab. 1) were obtained from the Ex Culture Collection, and were also plated on malt extract agar and incubated at 30 °C for 3 days.

**Table 1:** Non-*Candida parapsilosis* strains and strains taxonomically related to *Candida* genus used as reference strains with their corresponding EXF numbers.

**Tabela 1:** Kvasovki *Candida parapsilosis* taksonomsko sorodne vrste uporabljene kot referenčni sevi in njihove EXF številke.

Genus	Species	EXF number*
<i>Candida</i>	<i>orthopsilosis</i>	8409
<i>Candida</i>	<i>metapsilosis</i>	9927
<i>Candida</i>	<i>intermedia</i>	8410
<i>Candida</i>	<i>albicans</i>	9090
<i>Candida</i>	<i>atlantica</i>	10733
<i>Candida</i>	<i>boidinii</i>	5115
<i>Candida</i>	<i>boleticola</i>	7973
<i>Candida</i>	<i>californica</i>	9219
<i>Candida</i>	<i>caryicola</i>	12358
<i>Candida</i>	<i>ethanolica</i>	4926
<i>Candida</i>	<i>friedrichii</i>	13549
<i>Candida</i>	<i>glabrata</i>	7104
<i>Candida</i>	<i>glabrosa</i>	11071
<i>Candida</i>	<i>haemulonis</i>	4875
<i>Candida</i>	<i>inconspicua</i>	8157
<i>Candida</i>	<i>intermedia</i>	9462
<i>Candida</i>	<i>kanchanaburiensis</i>	8534
<i>Candida</i>	<i>norvegica</i>	6311
<i>Candida</i>	<i>pseudointermedia</i>	9894
<i>Candida</i>	<i>pseudolambica</i>	7966
<i>Candida</i>	<i>railenensis</i>	6414
<i>Candida</i>	<i>saitoana</i>	10054
<i>Candida</i>	<i>sake</i>	13529
<i>Candida</i>	<i>sophiae-reginae</i>	7981
<i>Candida</i>	<i>tropicalis</i>	9247
<i>Candida</i>	<i>tsuchiyae</i>	11007
<i>Candida</i>	<i>vartiovaarae</i>	7970
<i>Candida</i>	<i>zemplinina</i>	5068
<i>Candida</i>	<i>zeylanoides</i>	11878
<i>Kluyveromyces</i>	<i>marxianus</i>	9072
<i>Meyerozyma</i>	<i>guilliermondii</i>	8448
<i>Pichia</i>	<i>fermentas</i>	8401
<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	9914
<i>Lodderomyces</i>	<i>elongisporus</i>	9536
<i>Debaryomyces</i>	<i>hansenii</i>	8416
<i>Peterozyma</i>	<i>toletana</i>	6840
<i>Priceomyces</i>	<i>carsonii</i>	6753
<i>Scheffersomyces</i>	<i>spartinae</i>	6323
<i>Schwanniomyces</i>	<i>vanrijiae</i>	12083
<i>Yamadazyma</i>	<i>triangularis</i>	8408
<i>Yarrowia</i>	<i>lipolytica</i>	8413

\*EXF number, Deposition number of fungal strains in the Ex Culture Collection of the Infrastructural Centre Mycosmo, MRIC UL, Slovenia.

### *Genomic DNA extraction from pure cultures, and from water and biofilm samples*

Reference strains isolated from clinical specimens (N=7; 17.5%), groundwater (N=2; 5%), tap water (N=5; 12.5%), bathrooms (N=5; 12.5%), washing machines (N=6; 15%), kitchen surfaces (N=6; 15%), dishwashers (N=5; 12.5%) and refrigerators (N=4; 10%) previously identified as *Candida parapsilosis sensu stricto* were taken from the IC Mycosmo Culture Collection, Ljubljana, Slovenia (Tab. 3). Additionally, 41 taxonomically close relatives of *C. parapsilosis* were used as reference strains (Tab. 1). DNA from the 3-day-old grown on malt extract agar was extracted using PrepMan Ultra reagent (Applied Biosystems), following the manufacturer instructions. Three-liter water samples were filtered through 0.45-mm filters (Millipore, Merck), and total environmental genomic DNA was extracted using PowerWater DNA isolation kits (MO BIO Laboratories Inc.), according to the manufacturer instructions. Total environmental genomic DNA from biofilm samples was obtained from 1 g biofilm mass and extracted using PowerBiofilm DNA isolation kits (MO BIO Laboratories Inc.), according to the manufacturer instructions. Concentrations of DNA were measured with the use of Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific). All of the DNA samples obtained were stored at -20 °C until further processing.

### *Design of species-specific primers*

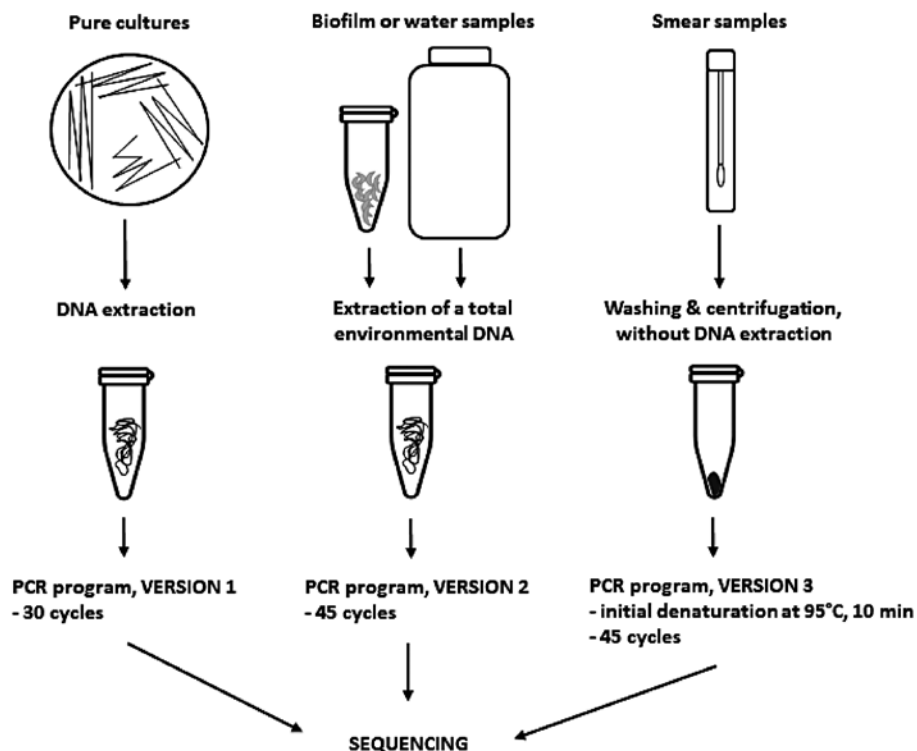
The annotated contig 005569 of the whole genome of *C. parapsilosis sensu stricto* strain CDC317, locus CPAR2\_105320 (putative *URA6* gene, an ortholog of the *Saccharomyces cerevisiae* protein *URA6*, involved in for *de-novo* synthesis of pyrimidines), with a length of 843 base pairs (Guida et al. 2011) was obtained from the NCBI website and was used as the template for designing the novel species-specific primers. These were designed using the online bioinformatics tools Primer3 (Koressaar and Remm 2007, Untergasser et al. 2012) and Primer-BLAST (Ye et al. 2012), and were obtained in a desalted form from Microsynth AG (Austria).

### *Development of the conventional PCR method for detection of Candida parapsilosis sensu stricto*

**Preparation of PCR mixture:** The *C. parapsilosis URA6* ortholog of all of the samples obtained was amplified with the use of conventional PCR. Each reaction had a final volume of 34 µL, and contained the following: 26.82 µL ultraclean water (MilliQ), 3.5 µL 10× Dream Taq buffer (Thermo Fisher Scientific), 0.7 µL 10 mM dNTP mix (AB, Warrington, UK), 1.4 µL of each oligonucleotide (CPAR2\_105320-F, CPAR2\_105320-R; Microsynth AG, Austria; final concentration, 10 pmol/µL), and 0.18 µL Dream Taq polymerase (Thermo Fisher Scientific, final concentration, 5 U/µL). Finally, 1 µL of each DNA sample was added to each reaction, with 1 µL MilliQ water added into the control reactions.

**Modifications of the PCR program:** Three different PCR programs were modified according to the origin of the DNA samples used as the matrix in the conventional PCR (Fig. 1, Tab. 2). PCR program #1 was developed for the genomic DNA matrix extracted from the pure yeast cultures, PCR program #2 was developed for the total environmental DNA matrix, and PCR program #3 was developed for the detection of *Candida parapsilosis sensu stricto* directly from swab samples without the need for prior DNA extraction.

**Visualization of PCR products:** The PCR products obtained were transferred to 1% (w/v) agarose (Sigma Aldrich) gels that had previously been stained with SYBR Safe (Thermo Fisher Scientific). GeneRuler DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) was used as the marker for comparison of base-pair lengths. The electrophoresis in 1X TAE buffer was run at 120 V for 20 min, with the products visualized using the G:BOX and Gene Tools software (Syngene, UK).



**Figure 1:** The three PCR programs for use of the novel primers, as designed according to the different DNA matrices. PCR program #1 is designed for DNA samples obtained from pure cultures; PCR program #2 is designed for total environmental DNA samples; and PCR program #3 is designed for swab samples, without the need for prior DNA extraction.

**Slika 1:** Programi za uporabo novih oligonukleotidnih začetnikov s klasičnim PCR glede na različne DNA matrice. Program #1 je zasnovan za DNA vzorce pridobljene iz čistih kultur, program #2 za vzorce celokupne DNA iz okolja in program #3 za vzorce brisov brez predhodne DNA ekstrakcije.

**Table 2:** Details of the three programs for the novel primers for conventional PCR detection of *Candida parapsilosis sensu stricto*.

**Tabela 2:** Podrobnosti programov za uporabo novih oligonukleotidnih začetnikov za hitro odkrivanje *Candida parapsilosis sensu stricto* z metodo PCR.

PCR step	PCR program		
	#1	#2	#3
Sample type	Pure cultures	Total DNA samples	Swab samples
Initial denaturation	95 °C, 2 min	95 °C, 2 min	95 °C, 10 min
Number of cycles	30	45	45
Denaturation	95 °C, 35 s	95 °C, 35 s	95 °C, 35 s
Annealing	55 °C, 35 s	55 °C, 35 s	55 °C, 35 s
Elongation	70 °C, 1 min	70 °C, 1 min	70 °C, 1 min
Final elongation	70 °C, 5 min	70 °C, 5 min	70 °C, 5 min

### *Identification of Candida parapsilosis sensu stricto strains*

The PCR products were further processed to obtain the DNA sequences of the fragments. These sequences were obtained through Microsynth AG (Austria) and assembled using FinchTV 1.4 (Geospiza, PerkinElmer Inc.). Additionally, the Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 software (Tamura et al. 2011) was used for the alignments. The strains were identified using the BLAST algorithm from the NCBI website (Altschul et al. 1990). The identified sequences were further processed with the DNA sequence submission tool Sequin, version 15.50 (NCBI, USA), for assignment of the GenBank numbers.

## Results

### *Specifics of the novel primers*

The newly designed primers had a length of 20 oligonucleotides and contain 55% guanine–cytosine (GC) nucleobases. The sequence of the forward primer (CPAR2\_105320-F: 5'-CAC CAC GCA AGC CAA TAC AC-3') starts at the 42nd base and ends at the 61st base, and the sequence of the reverse primer (CPAR2\_105320-R: 5'-GGC AAC AAC AGG GAT AGG GT-3') starts at the 615th base and ends at the 596th base of the putative *URA6* template sequence used. The PCR product has a predicted length of 574 base pairs.

### *Performance of designed PCR programs*

Three different programs for conventional PCR were designed to test the performance of the novel primers on different DNA templates.

PCR program #1 was developed for application to the DNA matrix extracted from pure yeast cultures where the concentrations of DNA were >50 ng/μL. The 30 cycles proposed are sufficient to obtain single-band products of predicted length and good quality for direct sequencing. PCR program #1 was used to test the species specificity of the novel primers on strains of *C. parapsilosis sensu stricto* obtained from clinical material, groundwater, tap water, and different indoor environments, all of which were particularly

related to water sources (Tab. 3). As the control groups, non-*C. parapsilosis* strains and strains taxonomically related to *Candida* genus were used (Tab. 1). Of these tested strains, all *C. parapsilosis sensu stricto* yielded single-band products of the predicted length, while the strains in the control group showed no bands of any size.

PCR program #2 was used to detect and amplify the possible present of *C. parapsilosis sensu stricto* in the total DNA matrix extracted from environmental samples (e.g., biofilm, tap water), where the DNA concentrations of the whole extracted biomass varied between 2–60 ng/μL. The only differences in comparison to PCR program #1 was in the number of cycles, which was set to 45 instead of 30 (Tab. 2). With PCR program #2 applied to these total environmental DNA samples, single-band products of the predicted length were successfully obtained in 50% (five out of 10) of the tap water samples and in 100% (five out of five) of the biofilm samples. *C. parapsilosis sensu stricto* was also confirmed in all of the positive environmental samples using culture-dependent methods, while *C. parapsilosis sensu stricto* was not isolated from the five tap water samples that showed negative PCR results.

PCR program #3 was developed for detection and identification of *C. parapsilosis sensu stricto* directly from swab samples, when only washed in physiological saline. This was carried out without previous DNA extraction, and was thus the most rapid and reliable indicator of the presence of *C. parapsilosis sensu stricto*. Instead of DNA extraction, the initial denaturation of the samples at 95 °C was prolonged to 10 min, and the number of cycles was extended to 45 (Tab. 2). All of the swab samples tested that were taken from plastic, rubber, metal, and glass surfaces yielded positive results here, which were also confirmed using culture-dependent methods.

**Table 3:** Details of *Candida parapsilosis sensu stricto* strains used in the present study, with corresponding EXF and GenBank numbers.**Tabela 3:** Podrobnosti sevov *Candida parapsilosis sensu stricto*, z EXF- in GenBank številkami.

<b>Sample source</b>	<b>Isolation method</b>	<b>DNA extraction</b>	<b>EXF* or sample number</b>	<b>PCR program</b>	<b>GenBank accession number (MK-)</b>
Clinical sample	Unknown	Pure culture – reference strains	EXF-10095	#1	782836
			EXF-10096		782837
			EXF-10097		782838
			EXF-10098		782839
			EXF-10099		782840
			EXF-10192		782841
			EXF-10193		782842
Groundwater	Filtration	Pure culture – reference strains	EXF-8460	#1	782843
			EXF-8247		782844
Tap water	Filtration	Pure culture – reference strains	EXF-10058	#1	782845
			EXF-10067		782846
			EXF-10048		782847
			EXF-5670		782848
			EXF-9623		782849
Bathroom	Swabbing	Pure culture – reference strains	EXF-9696	#1	782850
			EXF-12765		782851
			EXF-9692		782852
			EXF-6998		782853
			EXF-8149		782854
Washing machine	Swabbing	Pure culture – reference strains	EXF-5730	#1	782855
			EXF-5731		782856
			EXF-9782		782857
			EXF-9781		782858
			EXF-8239		782859
			EXF-6334		782860
Kitchen	Swabbing	Pure culture – reference strains	EXF-9952	#1	782861
			EXF-9955		782862
			EXF-9976		782863
			EXF-9925		782864
			EXF-12806		782865
			EXF-9928		782866
Dishwasher	Swabbing	Pure culture – reference strains	EXF-9112	#1	782867
			EXF-9092		782868
			EXF-9099		782869
			EXF-9088		782870
			EXF-9395		782871

Refrigerator	Swabbing	Pure culture – reference strains	EXF-9596	#1	782872
			EXF-11755		782873
			EXF-12203		782874
			EXF-12266		782875
Tap water	Filtration	Total environmental DNA	VOD-POM-3	#2	782821
			VOD-POM-30		782822
			VOD-KUH-5		782823
			VOD-KUH-10		782824
			VOD-KUH-12		782825
Biofilm (dishwasher rubber)	Scraping	Total environmental DNA	BF POM-3	#2	782826
			BF POM-13		782827
			BF POM-27		782828
			BF POM-30		782829
			BF POM-33		782830
Bottom of shower cabinet	Swabbing	Without prior DNA extraction	ShowerC-1	#3	782831
Kitchen sink	Swabbing	Without prior DNA extraction	KitchenS-1	#3	782832
Dish drying rack	Swabbing	Without prior DNA extraction	Dish-rack-1	#3	782833
Washing machine rubber	Swabbing	Without prior DNA extraction	WashingM-1	#3	782834
Glass shelf in refrigerator	Swabbing	Without prior DNA extraction	RefrigeratorS-1	#3	782835

\*EXF number, Number given to fungal strains for deposition in the Ex Culture Collection of the Infrastructural Centre Mycosmo, MRIC UL, Slovenia.

#### Identification of the sequences

PCR products were sequenced and the sequences obtained were clean and without superior signals and of the correct length. The sequences were genetically matching to the template locus CPAR2\_105320 of *C. parapsilosis sensu stricto* type strain CDC317 with 100% similarity.

However, the sequences obtained from single strains isolated from bathrooms (EXF-6998, EXF-8149), a washing machine (EXF-8239), a

kitchen (EXF-9925), a dishwasher (EXF-9099), and swab samples of plastic surfaces of a shower cabinet (ShowerC-1) and a dish-drying rack (Dish-rack-1) differed from the original template of the type strain by a single nucleotide. This difference was seen at the 574th nucleotide position, where the guanine (G) from the original template was replaced by an adenine (A). This difference was also reflected in the amino-acid sequences, where the valine (V) of the original type strain template was then read as isoleucine (I) in these samples.



## Discussion

Although the most frequent *Candida* species that causes disease in humans remains *C. albicans*, recent trends show a remarkable increase in non-*C. albicans* species worldwide. Many *Candida* species are a part of the human microbiota, and they are carried in the gastrointestinal and genital tracts, or other mucosal epithelia, of some 60% to 75% of people (Cortés et al. 2019). However, not all *Candida* species are related solely to humans or hospital environments, as many mainly non-*C. albicans* species have been isolated from natural environments, like fruit, vegetables, soil, sand, drinking water, and waste water (Shah et al., 2011, Novak Babič et al. 2016, Kulesza et al. 2018, de Hoog et al. 2019). Also, human-made indoor environments, such as refrigerators, washing machines, dishwashers, kitchens, and bathroom surfaces, are known to harbour a variety of *Candida* species. Consequently, these environments can represent reservoirs for the propagation and disseminations of these yeast (Novak Babič et al. 2015, Novak Babič et al. 2016, Novak Babič et al. 2017, Zupančič et al. 2016, Zupančič et al. 2019).

As an emerging pathogen, *C. parapsilosis sensu stricto* is also often involved in infections of neonates and in bloodstream infections through the use of intravenous catheters (Trofa et al. 2008, Sardi et al. 2013, Arastehfar et al. 2019, de Hoog et al. 2019). The regular presence of this yeast can even lead to outbreaks if the source of the primary contamination is not detected in good time (Bloomfield et al. 2012). The time for diagnosis or detection of a pathogen in the patient environment is thus crucial for rapid and correct treatment to achieve positive outcomes, or to adopt extra safety measures (Bloomfield et al. 2012). The additional consequence of slow diagnostic methods could lead to the increasing resistance of strains due to the continued use of broad-spectrum antifungals (Sardi et al. 2013). Current well-established methods for detection and identification of *Candida* in clinical and environmental samples include culture-dependent methods, biochemical assays, matrix-assisted laser desorption time of flight mass spectrophotometry (MALDI-TOF MS), and multiplex PCR amplifying ITS1 or ITS2 regions (Luo and Mitchell 2002,

Liguori et al. 2010, Taira et al. 2014, Arastehfar et al. 2019, Cortés et al. 2019).

Cultures can be grown on Sabouraud and on malt extract or yeast extract agar media, where *C. parapsilosis* colonies usually grow within 2-3 days at an incubation temperature from 25 °C to 37 °C. Here they grow as smooth, cratered, creped or concentric phenotypes with white or yellowish pigmentation (Cortés et al. 2019, Zupančič et al. 2019). However, when grown on standard media alone, this does not provide accurate identification. In addition, chromogenic agar can be used as a primary isolation medium, but it usually does not distinguish well between *C. parapsilosis* and *C. glabrata* (Cortés et al. 2019) 34]. Other culture-dependent methods for identification include commercial biochemical and phenotypic systems, like API 20 C AUX, Vitek2 and RapID yeast panel, which have been shown to provide 80% to 85% accuracy for species identification (Liguori et al. 2010, Posteraro et al. 2015). A more advanced methodologies based on pure cultures is seen for MALDI-TOF MS. The advantages here include easy preparation of the samples, broad applicability, and reproducibility (Croxatto et al. 2012). However, this technique has high costs and cannot be applied directly on clinical samples. Furthermore, the isolates tested can only be correctly identified if the reference spectra of the species are already included in the required database (Clark et al. 2013, Arastehfar et al. 2019), with the chance remaining that genetically closely related microorganisms with similar spectra might not be differentiated, as is frequently the case in differentiation of *Candida parapsilosis* species complex (Clark et al. 2013).

Growth-dependent methods remain the first choice for laboratories without specific molecular biology equipment. These methods are reliable, but they also require longer times for identification. If possible, the use of molecular methods is recommended, particularly with species-specific primers (Liguori et al. 2010). PCR of DNA barcodes is now recognised as one of the standards in laboratories worldwide due to its accessibility and reproducibility (WHO 2016), although further Sanger sequencing is still limited in developing countries (Arastehfar et al. 2019). A good alternative to culture dependent methods is seen in commonly used conventional or nested

multiplex PCR, which frequently does not require additional sequencing, and can provide rapid detection and identification of different *Candida* species. However, this method is usually carried out with primers designed on a template of ITS1 or ITS2 conserved regions, which cannot always provide optimal identification due to the genetic similarity of these *Candida* yeast. The lack of new species-specific primers designed on a template other than the ITS region is one of the pressing issues when using multiplex PCR (Luo and Mitchell 2002, Trofa et al. 2008, Liguori et al. 2010, Taira et al. 2014, Arastehfar et al. 2019). Although different methods for detection and identification have developed rapidly over the last 20 years, and sophisticated multiplex PCR is becoming a suitable solution, particularly in clinical settings (Arastehfar et al. 2019), *C. parapsilosis* still remains among the most frequently misidentified species, as it is still often mistaken for *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. metapsilosis*, or *C. orthopsilosis* (Luo and Mitchell 2002, Ghelardi et al. 2008, Trofa et al. 2008, Liguori et al. 2010, Taira et al. 2014, Arastehfar et al. 2019).

Sequencing of whole genomes provided the additional insight in housekeeping genes, enabling the design of new primers for conventional or multiplex PCR. One of them is locus CPAR2\_105320 used in the present study. The locus is encoding life-essential protein (an orthologue of the *Saccharomyces cerevisiae* protein *URA6*) which is one in the cascade for *de-novo* synthesis of pyrimidines. Pyrimidine biosynthesis includes the six enzymatic steps occurring nearly universally in all organisms (Hermansen et al. 2015). The enzymatic organisation, structure, localization, and regulation changes due to the evolution among different organisms (Hermansen et al. 2015). The DNA sequences of the locus thus differ among the species, enabling the use of the sequence as a template for novel species-specific primers, providing a unique barcode for certain species as already proved for *Saccharomyces cerevisiae* (Hermansen et al. 2015).

In the present study we used conventional PCR, which can be easily accessed and applied also in BSL-1 laboratories. These newly designed primers and the methods described here show the important advantages of this method: low cost, little time needed, and accurate identifica-

tion. The primers and programs can be applied in three different ways: to identify pure yeast cultures; to detect the yeast in the whole DNA extracted from various environments (e.g., tap water, biofilms); and to detect the yeast directly on swab samples taken from different surfaces (e.g., glass, plastic, rubber) without the need for prior cultivation. Among the three versions of the method described here, the process of species-specific identification from swab samples was the most rapid, altogether taking 3 h to 4 h, and providing 100% accuracy. To get the optimal results in further studies, we suggest the final volume of the PCR mixture being 34  $\mu$ l with the addition of 1  $\mu$ l DNA. Five microliters of the PCR product may be used for visualisation on the agarose gel and 30  $\mu$ l is the volume needed in cases of additional Sanger sequencing. However, the exact final concentrations of chemicals are provided in the result section, enabling the successful further replication studies even if using different final volumes.

For laboratories without possible access to the Sanger sequencing we recommend the use of the agarose gel electrophoresis to visualize the obtained PCR products. Agarose gel may be prepared in any concentration, ranging from 1% to 3% (w/v). However, the fastest method still enabling an accurate result included the use of 1% (w/v) agarose gel. In any case, only one band of the proper size (~570 bp) should be observed indicating the positive outcome of the PCR.

The advantage of this method is its complete complementarity with current tools, as it can be carried out in parallel with all of the culture-dependent methods, or with MALDI-TOF or multiplex PCR. To the best of our knowledge, these newly designed primers are the first primers that amplify only *C. parapsilosis sensu stricto*, and at the same time completely exclude the closely related species *C. metapsilosis* and *C. orthopsilosis* and other clinically relevant species, including *C. albicans*, *C. glabrata*, and *C. tropicalis*. Novel primers can be used as taxonomical barcode markers for *C. parapsilosis sensu stricto*, to resolve frequent misidentification with closely related species obtained from both clinical and environmental samples. Even when probed on a total DNA samples obtained from biofilms or tap water with total DNA concentrations below

2 ng/ $\mu$ l, the PCR product showed only one band here, and could thus be directly sequenced. The primers described here were successfully applied to pure cultures obtained from environmental and clinical samples, and to concentrated suspensions of washed swab samples, without prior DNA extraction. In the future, these could also be probed directly on clinical samples, like blood and sputum, to further demonstrate their efficiency for rapid diagnosis of *C. parapsilosis sensu stricto* also in clinical specimens.

## Povzetek

Obolevnost zaradi različnih glivnih okužb v svetu v zadnjih 20 letih strmo narašča. Med najpogostejšimi oblikami bolezni je kandidemija, ki jo povzročajo glive iz rodu *Candida*. Približno 50 % vseh primerov kandidemij povzroča vrsta *Candida albicans*, pri preostale pa so povzročiteljice tako imenovane porajajoče vrste (Trofa in sod. 2008). Med temi so najpogostejši vzrok kandidemije vrste iz *Candida parapsilosis* kompleksa vrst (Lass-Flörl 2009). Kompleks vrst sestavljajo tri, genetsko ozko sorodne vrste: *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis* in *Candida metapsilosis*. Iz kliničnega materiala je najpogosteje osamljena *C. parapsilosis sensu stricto* (90,7 %), sledi ji *C. orthopsilosis* (8,2 %), medtem ko se *C. metapsilosis* v kliničnem materialu pojavlja najredkeje (1,1 %) (Cantón in sod. 2011). Najvišje tveganje za okužbo z vrstami *C. parapsilosis* kompleksa je sicer prisotno pri bolnikih z oslabiljenim imunskim sistemom, pri nedonošenčkih in ljudeh s cistično fibrozo (Trofa in sod. 2008, Sardi in sod. 2013, Cortés in sod. 2019). Za razliko od mnogih vrst rodu *Candida*, ki so povezane predvsem s človekom in bolnišničnim okoljem (npr. *C. albicans*, *C. auris*), se *C. parapsilosis sensu stricto* pojavlja tudi v naravi, v drugih organizmih, v vodnih virih in na površinah iz različnih naravnih in umetnih materialov (Novak Babič in sod. 2017a,b, Cortés in sod. 2019, Zupančič in sod. 2019).

Za zmanjšanje pojavnosti okužb in preprečevanje izbruhov bolezni, je pri porajajočih patogenih pomembno določiti možne poti prenosa na človeka. Le-te lahko izvirajo iz biološkega materiala ali okolja v katerem se pacient nahaja (npr. voda iz

pipe, površine, protetični materiali) (Liguori in sod. 2010, Bloomfield in sod. 2012). V kolikor pa je pacient že okužen, so hitra in natančna diagnostična orodja ključnega pomena za uspešno zdravljenje in okrevanje (Liguori in sod. 2010, Arastehfar in sod. 2019). Trenutno uveljavljene metode za odkrivanje in identifikacijo *C. parapsilosis sensu stricto* v kliničnih in okoljskih vzorcih vključujejo kultivacijo, biokemijsko določanje profilov razgradnje različnih substratov, masno spektrometrijo (MALDI-TOF MS) in multipleks PCR. Naštete metode so pogosto nedostopne v manjših laboratorijih, zamudne in povezane z višjimi stroški. Naša raziskava se je zato osredotočila na uporabo klasične PCR metode, ki je dostopna tudi v večini laboratorijev z najnižjo stopnjo varnosti (Biosafety Level (BSL)-1).

Na novo opisani oligonukleotidni začetniki za določanje *C. parapsilosis sensu stricto* s klasičnim PCR pomnožujejo del regije CPAR2\_105320 v velikosti 574 baznih parov, ki kodira zapis za ortolog proteina *URA6* (kot je poimenovan pri *Saccharomyces cerevisiae*). Protein *URA6* je pomemben del kaskade pri *de-novo* sintezi pirimidinov (Hermansen in sod. 2015). Kljub temu, da je zapis v genomih prisoten univerzalno, se DNA zaporedje med organizmi dovolj razlikuje, da omogoča vrstno-specifično identifikacijo (Hermansen in sod. 2015). Metode in PCR programi opisani v naši študiji, so bili zasnovani tako, da omogočajo zaznavanje in identifikacijo kvasovke na podlagi DNA čiste kulture, celokupne DNA iz vzorcev okolja kot so biofilmi in pitna voda ter direktno v vzorcih brisov odvzetih iz različnih površin površin (npr. stekla, plastike in gume), brez predhodnega gojenja. Med temi različicami je bil postopek identifikacije iz vzorcev brisov najhitrejši, skupaj je trajal 3-4 ure in zagotavljal 100 % natančnost. Kvasovko smo zaznali tudi v vzorcih z vsebnostjo celokupne DNA < 2 ng /  $\mu$ l, hkrati pa pri nobeni izmed ozko sorodnih vrst nismo dobili pomnožka. S tem smo potrdili vrsto-specifičnost dobljenih produktov.

Novi oligonukleotidni začetniki se lahko uporabljajo kot taksonomski označevalci za *C. parapsilosis sensu stricto*, kar bi omogočilo odpravo pogosto napačne identifikacije s tesno sorodnimi vrstami, pridobljenimi tako iz kliničnih

kot iz okoljskih vzorcev. Opisane metode in programi uporabe imajo poleg natančnosti identifikacije tudi nekatere druge pomembne prednosti, kot so nizki stroški, hitrost in združljivost z že uveljavljenimi metodami identifikacije. V prihodnosti bi opisane metode lahko preizkusili vzporedno z že obstoječimi metodami neposredno na kliničnih vzorcih, kot sta kri in sputum, s čemer bi prispevali k hitrejši diagnostiki ob sumu na *C. parapsilosis sensu stricto* v kliničnih vzorcih.

## Acknowledgments

The authors thank Dr. Tadeja Matos for provision of the *Candida parapsilosis* strains from clinical material. The study was supported financially by the Infrastructural Centre Mycosmo MRIC UL (I0-0022), the Culture Collection of Extremophilic Fungi (EX), Ljubljana, Slovenia, and Research Programme P1-0198.

## References

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403-410.
- Arastehfar, A., Fang, W., Pan, W., Lackner, M., Liao, W., Badiee, P., et al. 2019. Yeast panel multiplex PCR for identification of clinically important yeast species: stepwise diagnostic strategy, useful for developing countries. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, doi: 10.1016/j.diag-microbio.2018.09.007
- Bloomfield, S. F., Exner, M., Nath, K. J., Signorelli, C., Scott, E. A. 2012: The chain of infection transmission in the home and everyday life settings, and the role of hygiene in reducing the risk of infection. *International Scientific Forum on Home Hygiene, United Kingdom*, 140 pp.
- Brown, G. D., Denning, D. W., Gow, N. A. R., Levitz, S., Netea, M., White, T., 2012. Human fungal infections: the hidden killers. *Science Translational Medicine*, 4 (165), 165rv13. doi: 10.1126/scitranslmed.3004404.
- Cantón, E., Pemán, J., Quindós, G., Eraso, E., Miranda-Zapico, I., Álvarez, M., et al. 2011. Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55, 5590-5596.
- Clark, A. E., Kaleta, E. J., Arora, A., Wolk, D. M., 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 26, 547-603.
- Cortés, J. A., Corrales, I. F., 2019. Invasive Candidiasis: Epidemiology and Risk Factors. In: Loreto, E. S., Simoni, M. T. J. (eds.): *Fungal Infection*. IntechOpen, London, pp. 33-56.
- Croxatto, A., Prod'hom, G., Greub, G., 2012. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*, 36 (2), 380-407. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x.
- de Hoog, G. S., Guarro, J., Gené, J., Ahmed, S., Al-Hatmi, A. M. S., et al., 2019. *Atlas of clinical fungi*. 3rd e-ed. Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht / Reus.
- Ghelardi, E., Pichierrri, G., Castagna, B., Barnini, S., Tavanti, A., Campa, M., 2008. Efficacy of chromogenic *Candida* agar for isolation and presumptive identification of pathogenic yeast species. *Clinical Microbiology and Infection*, 14 (2), 141-147.
- Guida, A., Lindstädt, C., Maguire, S. L., Ding, C., Higgins, D. G., Corton, N. J., et al., 2011. Using RNA-seq to determine the transcriptional landscape and the hypoxic response of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *BMC Genomics*, 12, 628. doi: 10.1186/1471-2164-12-628.
- Hermansen, R. A., Mannakee, B. K., Knecht, W., Liberles, D. A., Gutenkunst, R. N., 2015. Characterizing selective pressures on the pathway for de novo biosynthesis of pyrimidines in yeast. *BMC Evolutionary Biology*, 15, 232. doi: 10.1186/s12862-015-0515-x.

- Huang, Y. C., Lin, T. Y., Leu, H. S., Wu, J. L., Chang, H. Y., 1998. Yeast carriage on hands of hospital personnel working in intensive care units. *Journal of Hospital Infection*, 39, 47-51.
- Koressaar, T., Remm, M., 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*, 23 (10), 1289-1291.
- Kulesza, K., Biedunkiewicz, A., Nowacka, K., Glinka, P., 2018. Potentially pathogenic fungi of the *Candida* genus isolated from the Lyna River – a 20-year study. *Annals of Parasitology*, 64, 217-223. doi: 10.17420/ap6403.155.
- Lass-Flörl, C., 2009. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses*, 52 (3), 197-205. doi:10.1111/j.1439-0507.2009.01691.x.
- Liguori, G., Gallé, F., Lucariello, A., Di Onofrio, V., Albano, L., Mazzarella, G., et al., 2010. Comparison between multiplex PCR and phenotypic systems for *Candida* spp. identification. *New Microbiologica*, 33 (1), 63-67.
- Luo, G., Mitchell, T. G., 2002. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (8), 2860-2865. doi: 10.1128/jcm.40.8.2860-2865.2002.
- Novak Babič, M., Gunde-Cimerman, N., Vargha, M., Tischner, Z., Magyar, D., Verissimo, C., et al., 2017b. Fungal contaminants in drinking water regulation? A tale of ecology, exposure, purification and clinical relevance. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14 (6), 636. doi: 10.3390/ijerph14060636.
- Novak Babič, M., Zalar, P., Ženko, B., Schroers, H. J., Džeroski, S., Gunde-Cimerman, N., 2015. *Candida* and *Fusarium* species known as opportunistic human pathogens from customer-accessible parts of residential washing machines. *Fungal Biology*, 119 (2-3), 95-113. doi: 10.1016/j.funbio.2014.10.007.
- Novak Babič, M., Zalar, P., Ženko, B., Džeroski, S., Gunde-Cimerman, N., 2016. Yeasts and yeast-like fungi in tap water and groundwater, and their transmission to household appliances. *Fungal Ecology*, 20, 30-39. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.10.001>.
- Novak Babič, M., Zupančič, J., Gunde-Cimerman, N., Zalar, P., 2017a. Yeast in anthropogenic and polluted environments. In: Buzzini, P., Lachance, M. A., Yurkov, A. (eds.): *Yeasts in Natural Ecosystems: Diversity*. Springer, Switzerland, pp.145-169.
- Pires, H. R., dos Santos, M. J., Zaia, E. J., Gomes Martins, H. C., Mendes-Giannini, S. J. M., 2011. *Candida parapsilosis* complex water isolates from a haemodialysis unit: biofilm production and *in-vitro* evaluation of the use of clinical antifungals. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106 (6), 646-654.
- Posteraro, B., Efremov, L., Leoncini, E., Amore, R., Posteraro, P., Ricciardi, W., et al., 2015. Are the conventional commercial yeast identification methods still helpful in the era of new clinical microbiology diagnostics? A meta-analysis of their accuracy. *Journal of Clinical Microbiology*, 53 (8), 2439-2450. doi: 10.1128/JCM.00802-15.
- Raghupathi, P. K., Zupančič, J., Brejnrod, A. D., Jacquioid, S., Houf, K., Burmølle, M., et al., 2018. Microbial diversity and putative opportunistic pathogens in dishwasher biofilm communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 84 (5), e02755-17. doi: 10.1128/AEM.02755-17.
- Sardi, J. C. O., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A. M., Mendes Giannini, M. J. S., 2013. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology*, 62 (Pt 1), 10-24. doi: 10.1099/jmm.0.045054-0.
- Shah, A., Abdelzaher, A., Phillips, M., Hernandez, R., Solo-Gabriele, H., Kish, J., et al., 2011. Indicator microbes correlate with pathogenic bacteria, yeasts and helminthes in sand at a subtropical recreational beach site. *Journal of Applied Microbiology*, 110, 1571-1583.
- Taira, C. L., Okay, T. S., Delgado, A. F., Cecon, M. E., de Almeida, M. T., Del Negro, G. M., 2014. A multiplex nested PCR for the detection and identification of *Candida* species in blood samples of critically ill paediatric patients. *BMC Infectious Diseases*, 14, 406. doi: 10.1186/1471-2334-14-406.

- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1596-1599.
- Trofa, D., Gácsér, A., Nosanchuk, J. D., 2008. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 21 (4), 606-625. doi: 10.1128/CMR.00013-08.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., et al., 2012. Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40 (15), e115. doi: 10.1093/nar/gks596.
- WHO. 2016: Establishment of PCR laboratory in developing countries, 2nd ed. World Health Organization, Geneva, 96 pp.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T., 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13, 134. doi: 10.1186/1471-2105-13-134.
- Zupančič, J., Novak Babič, M., Gunde-Cimerman, N., 2019. High incidence of an emerging opportunistic pathogen *Candida parapsilosis* in water-related domestic environments. In: Loreto, É. S., Simoni, M. T. J. (eds.): *Fungal Infection*. IntechOpen, London, pp. 79-93.
- Zupančič, J., Novak Babič, M., Zalar, P., Gunde-Cimerman, N., 2016. The black yeast *Exophiala dermatitidis* and other selected opportunistic human fungal pathogens spread from dishwashers to kitchens. *PLoS ONE*, 11 (2), e0148166. doi:10.1371/journal.pone.0148166.



**Ob 100-letnici biologije na Univerzi v Ljubljani**

Centennial of biology at the University of Ljubljana

Uredila / Edited by Jasna Dolenc Koce  
correspondence: jasna.dolenc.koce@bf.uni-lj.si

**Izvleček:** Leta 1919 je bila ustanovljena Univerza v Ljubljani, v okviru katere sta delovala tudi Botanični in Zoološki inštitut. Ob praznovanju stoletnice je 21.11.2020 na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani potekal enodnevni simpozij z naslovom »100 let biologije na UL«. Na simpoziju so se predstavile raziskovalne skupine Oddelka za biologijo (Katedre za zoologijo, botaniko in fiziologijo rastlin, fiziologijo, antropologijo in etologijo, ekologijo in varstvo okolja, biokemijo, molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov, biološko izobraževanje, Botanični vrt Univerze v Ljubljani) in Nacionalnega inštituta za biologijo (Oddelki za biotehnologijo in sistemsko biologijo, za raziskave organizmov in ekosistemov, za genetsko toksikologijo in biologijo raka, Morska biološka postaja). V prispevku se predstavlja večina raziskovalnih skupin, ki poleg zgodovinskega orisa predstavljajo svojo pedagoško, znanstveno-raziskovalno in strokovno dejavnost v današnjem času.

**Ključne besede:** biologija, Univerza v Ljubljani, 100 let

**Abstract:** The University of Ljubljana was founded in 1919 including Botanical Institute and Zoological Institute. Among celebrations of their centennial, a one-day symposium entitled „100 Years of Biology at the University of Ljubljana“ was held on 21 November 2020 at the Department of Biology of Biotechnical Faculty of University of Ljubljana. The symposium presented the research groups of the Department of Biology (Chairs of Zoology, Botany and Plant Physiology, Physiology, Anthropology in Ethology, Ecology and Environment Conservation, Biochemistry, Molecular Genetics and Microbiology, Biological Education, University Botanic Garden Ljubljana) and National Institute of Biology (Departments of Biotechnology and Systems Biology, of Organisms and Ecosystems Research, of Genetic Toxicology and Cancer Biology, Marine Biology Station). The paper presents a majority of research groups that outline their historical background and pedagogical, scientific research and professional activities today.

**Keywords:** biology, University of Ljubljana, 100 years



V letu 2019 je minilo 100 let od ustanovitve ljubljanske univerze. Med drugimi sta bila takrat pod njenim okriljem ustanovljena tudi Botanični in Zoološki inštitut, zato lahko leto 1919 štejemo tudi za začetek študija biologije. Z namenom obeležitve stoletnice je 21. novembra 2019 na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani potekal enodnevni simpozij z naslovom »100 let biologije na UL«. Na simpoziju se je predstavilo sedemnajst raziskovalnih skupin šestih kateder in dveh samostojnih enot Oddelka za biologijo UL BF, ter štiri raziskovalne skupine Nacionalnega inštituta za biologijo, ki je izšel iz Inštituta za biologijo UL. Simpozij sta otvorila

dekan Biotehniške fakultete prof. dr. Emil Erjavec in direktor NIB izr. prof. dr. Matjaž Kuntner, udeležilo pa se ga je okoli 100 udeležencev iz različnih inštitucij, ki so aktivne na področju biologije v Sloveniji.

Vse predstavitve so kot izročki predavanj objavljene na spletni strani Oddelka za biologijo <http://www.bf.uni-lj.si/biologija/oddelek/predstavitvev/100-letnica-biologije/>. V nadaljevanju so zbrani prispevki večine raziskovalnih skupin. V njih so poleg zgodovinskega orisa predstavljene pedagoška, znanstveno-raziskovalna in strokovna dejavnost skupin v današnjem času.

## Oris zgodovine Oddelka za biologijo na Univerzi v Ljubljani – do konca tisočletja

Boris Sket

Zgodovina biologije na Univerzi v Ljubljani se začne z zgodovino same Univerze. Bralca vabim, da si jo v že močno skrajšani podobi prebere v predstavitvi na spletni strani oddelka [http://www.bf.uni-lj.si/fileadmin/users/1/biologija/100-letnica/1\\_Biologija\\_SKET.pdf](http://www.bf.uni-lj.si/fileadmin/users/1/biologija/100-letnica/1_Biologija_SKET.pdf).

V tej predstavitvi podajam le osnovne podatke. Časovni okvir obsega dogajanje na Univerzi in Oddelku za biologijo do upokojitve naše generacije, torej približno do konca tisočletja. Zaradi omejenega prostora omenjam večinoma le redne profesorje, ki so predstavniki raziskovalnih in pedagoških skupin. Povprečno skupino so do zadnjih desetletij sestavljali profesor (ki je najverjetneje začel kot docent), asistent in laborant. Tedanji asistenti so večinoma še aktivni na višji ravni. Navedeni znanstveni članki so v veliki meri pisani v soavtorstvu. Podatki o 'čisti' citiranosti so povzeti iz baze SICRIS ob koncu 2019. Ne pustite se številkam zavesti, so le za približen vtis, ne za ocenjevanje. Kot 'znanstveni članki' so združene obsežne študije in kratki povzetki ('abstrakti') kongresnih predavanj. Opisi novih vrst so lahko zelo rutinske zadeve ali pa resne študije. Število citatov je videti zelo eksakten podatek, a mu spet očitajo in dokazujejo zapleteno pristranskost. Botrstvo novim taksonom sploh ni delovni dosežek, je le zanimivost, ki pa jo redno navajajo. Zlasti ob osmrtnicah...

Zgodovina univerze se je začela leta 1919 kot **Univerza Kraljevine Srbov, Hrvatov in Slovencev / Universitas Labacensis**. Univerza je zamenjala vsega sedem imen, vključno z današnjim (od 1990) – **Univerza v Ljubljani**. Ustanovitev slovenske univerze v času Avstro-Ogrske je bojda zavirala predvsem graška univerza. Prvi rektor ljubljanske univerze je bil matematik prof. **Josip Plemelj**, čigar predavanja so bila prava umetnina, 'matematika v koncertni izvedbi', kot pravi prof. Križanič. Univerza v Ljubljani je bila večidel nameščena v Deželnem dvorcu. Med drugim je imela Filozofsko fakulteto s **stolico za zoologijo in stolico za botaniko**. Učni načrt Medicinske fakultete je vključeval še **anatomijo in biologijo**. V Univerzo so vključili tudi **Botanični vrt**, ustanovljen že leta 1810. Leta 1957 je bila ustanovljena Naravoslovna fakulteta z Biologijo, leta 1960 pa so Oddelek za biologijo pridružili biotehniškim vedam, katerim naj bi biologija služila kot osnova, kar pa se žal ni uresničilo. Ob koncu 50-ih let so oblasti zahtevale ločitev raziskovalnih dejavnosti od šolskih, posledica česar je bila ustanovitev Inštituta za biologijo (IB) na Biološkem oddelku (OB), nato leta 1994 Inštituta za biologijo Univerze (IBU), ta pa se je leta 1998 preimenoval v Nacionalni inštitut za biologijo (NIB). Ob začetku sta imela OB in IB praktično skupni kader. NIB je torej vegetativni potomec OB in UL.

V naslednjih desetletjih je biološki oddelek ,okostenele‘ univerze opravil kar nekaj temeljnih študijskih reform.

V poročilih ARRS o financiranju raziskovalne dejavnosti za leta 1954-1959 biologija sploh ni omenjena. V letih 1960-1961 je imel Inštitut 5 projektov, OB je imel v letu 1962 dva, IBU pa 12 projektov. V poznih 80-ih npr., je za objavljen članek univerzni raziskovalec iztržil 258, inštitutski pa 2087 raziskovalnih ur. Leta 1996 je imel OB ,že‘ enega ,čistega‘ raziskovalca, medtem ko so bili vsi drugi učitelji z več kot polno pedagoško obremenitvijo. Biologija je bila tako na psu, da smo lahko izsilili poseben finančni program za ,revitalizacijo biologije‘, ki je omogočil financiranje doktoranda, postavitve laboratorija za DNK in še nekaj opreme.

Konec 90-ih let smo se še borili proti davečemu sistemu ,dot‘, ki ga je postopoma verjetno končal dokaj nepravilno zmerjani ,sistem točkovanja‘ (vsaj od 1997).

Proti koncu stoletja je OB začel dobivati pravičnejši delež denarja za raziskovalne projekte zahvaljujoč ocenjevanju (ki se je res malce izrodilo v zloglasno ,točkovanje‘) publicistične produkcije. V 80-ih letih smo nabavili prve osebne računalnike (1993 opremili računalniško učilnico), v 90-ih se je uveljavila e-pošta, pozneje pa še internet, kar je neverjetno olajšalo in pospešilo izmenjavo podatkov in idej ter pripravo znanstvenih člankov. Še sredi moje kariere si lahko zaželeni članek dobil v najboljšem primeru v mesecu, danes to neredko opravimo v nekaj minutah. Podoba stanja na nekem raziskovalnem področju pa si lahko pridobiš v nekaj urah, namesto nekdanjih več mesecev.

Za organiziranje **Stolice za zoologijo** so iz Zagreba povabili profesorja, pozneje akademika **Jovana Hadžija** (1884-1972). Čeprav Balkanec/Panononec, je navezal stike s slovenskimi jamarji, reorganiziral Društvo za raziskovanje jam in svojo katedro močno usmeril v speleobiologijo. Objavil je 210 znanstvenih in kar 890 poljudnih člankov. Po njem so poimenovali nekaj vrst in več rodov: *Hadzia*, *Hadziana*, *Hadziella*, *Hadziina*, *Hadzinta*, morda še kaj. Objavil je revolucionarno teorijo o filogenezi nevretenčarjev (Turbelarijska teorija knidarijev), ki v obdobju analize DNA izgublja tla. Napisal je tudi številne taksonomske in biogeografske članke ter srednješolske učbenike. Bil

je prvi dekan Filozofske fakultete. Hadžiju se je pridružil prof. **Roman Kenk** (1898-1988), ki je 1983 odšel v ZDA. V 60 znanstvenih člankih je obravnaval predvsem taksonomijo vrtničarjev (Turbellaria: Tricladida). Po njem je imenovan rod *Kenkia* in nekaj vrst. Bil je tudi pomemben raziskovalec podzemlja. Hadžija je nasledil akademik **Janez Matjašič** (1921-1996), izjemno priljubljen predavatelj in pisec poljudnih knjig. Objavil je 23 znanstvenih člankov. Tudi njega je najbolj zanimalo jamsko živalstvo, najpomembnejše je odkritje cele favnule temnocefalov (Turbellaria: Temnocephalida) epizoičnih organizmov na dinarskih jamskih kozicah. Posebej koristna je bila njegova pobuda speleobioloških odprav na JV dinarskega krasa. Tudi po njem so poimenovali okoli 10 živalskih vrst. Nasledil ga je akademik **Boris Sket** (1936-), ki je uspel združiti manjšo speleobiološko raziskovalno skupino. Ukvarjal se je predvsem z ekologijo in biogeografijo podzemlja, določil biogeografske vzorce razširjenosti in odkril nova podzemeljska okolja. Raziskoval je tudi taksonomijo številnih skupin (od bakterij do dvoživk; opisal 117 novih vrst, par rodov in družin). Objavil je 350 znanstvenih člankov (z 2490 citati) ter približno 140 poljudnih člankov. Bil je pobudnik laboratorija in vpeljave DNK metod za filogenetske raziskave. Po njem je imenovanih približno 45 novih vrst in par rodov. Bil je rektor UL.

Predavanja iz zoologije vretenčarjev je prevzel prof. **Miroslav Zei** (1914-2006), ki je odkril menjavo spola pri giricah. Bil je pomemben popularizator, direktor Inštituta za morsko biologijo JAZU v Rovinju, bil je eden od ustanoviteljev Inštituta za biologijo, pozneje izvedenec pri FAO, UNDP ter projektih OZN. Za njim je Zoologijo strunarjev prevzela prof. **Lili Istenič** (1931-2020), ki je poglobila raziskave močerila, njegovih čutil in odnosa do pomankanja kisika; objavila je 10 znanstvenih člankov z 18 citati. Njeno delo je nadaljeval prof. **Boris Bulog** (1949-) s 33 znanstvenimi članki, ki se je posvetil tudi onesnaženosti podzemlja. Nekaj let je predaval tudi prof. **Boris Kryštufek** (1954-) iz Prirodoslovnega muzeja, ki je specialist za male sesalce.

Ob sistematski se je razvila splošna zoologija (splošna biologija), ki jo je prevzel prof. **Hubert Pehani** (1900-1994) na MF, za njim pa naš prof. **Pavel Ličar** (1935-2015). Ukvarjal se je predvsem

z biologijo rakov in objavil 12 znanstvenih člankov. Bil je zelo priljubljen predavatelj in dolgoletni predsednik študijske komisije, začel pa je tudi z uporabo elektronskega mikroskopa. Ob njem in za njim je splošno zoologijo in funkcionalno morfologijo predavala prof. **Jasna Štrus** (1953-), ki je objavila 289 znanstvenih člankov (citiranih 751-krat), od tega kar 186 kongresnih izvlečkov predvsem o mikro- in makroskopski funkcionalni morfologiji ter biologiji kopenskih rakov. Posebej je skrbela za modernizacijo opreme za zoološke raziskave in postavila laboratorij za elektronsko mikroskopijo.

Od zoologov naj omenimo še tehničnega sodelavca **Franceta Velkovrha** (1934-2009), izjemno prizadevnega v speleobiologiji, tudi avtorja malakoloških znanstvenih člankov (z 18 citati) z opisi novih vrst. Po njem so poimenovali trdoživa *Velkovrha* in nekaj drugih vrst.

**Stolica za botaniko** je začela s prof. **Franom Jesenkom** (1875-1932), ki se je ukvarjal predvsem z genetiko žitaric, s tritikalo ter s puščavskimi rastlinami. Do leta 1929 je objavil 8 znanstvenih člankov. Bil je eden od glavnih pobudnikov ustanovitve Triglavskega narodnega parka in soustanovitelj semenogojске postaje Beltinci. Po njem so poimenovana Jesenkova priznanja, ki jih podeljuje Biotehniška fakulteta. V Ljubljani sta tudi Učna pot in Ulica Frana Jesenka. Status prof. **Alfonza Paulina** (1853-1942), ki je izdal pomembno herbarijsko zbirko *Flora exiccata Carniolica*, ni povsem razjasnjen. Prof. **Jože Lazar** (1903-1975) je bil prvi slovenski algolog, opisal je nekaj novih vrst. Predaval je sistematiko nižjih rastlin in bil dolgoletni ravnatelj Botaničnega vrta. Prof. **Gabrijel Tomažič** (1899-1977) je bil fitocenolog in florist. Po vsej Jugoslaviji je bil visoko cenjen akademik **Ernest Mayer** (1920-2009), ki se je ukvarjal predvsem s fitogeografsko in taksonomsko opredelitvijo flore višjih rastlin. Raziskoval je endemizem in polimorfizem višjih rastlin na Balkanu in opisal 6 novih taksonov. Po njem so poimenovali okoli šest novih vrst. Objavil je 77 znanstvenih in 15 poljudnih člankov. Bil je gospodar ob izgradnji nove stavbe na Aškerčevi, kjer smo bili nato podnajemniki. Sistematsko in splošno botaniko je predaval tudi doc. **Vlado Ravnik** (1924-2017), sicer znan kot imeniten botanični ilustrator. Objavil je 26 znanstvenih in 99 strokovnih del. Prof. **Tone Wraber** (1938-

2010) se je ukvarjal s taksonomijo, floristiko, fitogeografijo in fitocenologijo. Ima zelo bogato bibliografijo, poleg 90 znanstvenih del (s 570 citati) je objavil kar preko 900 poljudnih člankov, v veliki meri z zgodovinsko tematiko. Po njem so poimenovali nekaj rastlinskih vrst (vsaj 3). Botanične vsebine je predaval tudi prof. **Viktor Petkovšek** (1908-1994), ki je odšel z aplikativno botaniko na oddelek za agronomijo.

Omeniti velja vsaj še dva tehnično-vodstvena sodelavca. Prizadevnemu vrtnarju in enemu največjih poznavalcev flore **Franču Juvanu** (1875-1960) v čast so poimenovali novo vrsto netreska. Pri delu v vrtu se je smrtno ponesrečil. Dr. **Vinko Strgar** (1928-1992) je bil dolgoletni vodja Botaničnega vrta, tudi predstojnik oddelka, posebej pa je zaslužen kot dolgoletni predsednik gradbenega odbora za Biološko središče. Bil je tudi taksonom in se je posvečal gojitvi naših endemnih rastlin.

S **splošno botaniko** je začel prof. **Franc Sušnik** (1930-1996), ki se je veliko ukvarjal s posodobitvijo pouka in z organizacijo, znanstveno pa s citologijo in citogenetiko naše flore. Njegova bibliografija je predvsem poljudna in učbeniška. Za njim sta nekaj let predavali prof. **Marina Dermastia** (1960-), ki se je ukvarjala z rastlinsko biokemijo in fiziologijo ter doc. **Barbara Vilhar**, ki je bila posebej prizadevna pri propagiranju darvinizma.

Z rastlinsko ekologijo je začel prof. **Andrej Martinčič** (1935-), ki se je ukvarjal predvsem z vegetacijo in ekologijo močvirskih združb, poleg tega pa tudi s floristiko in taksonomijo mahov. Objavil je 134 znanstvenih del (s 109 citati). Bil je dekan BF in prorektor UL.

Prof. **Božo Škerlj** (1904-1961) je začetnik biološke **antropologije** na UL. Objavil je preko 200 znanstvenih člankov. Izdajal je tudi revijo Evgenika. Ukvarjal se je predvsem z antropometrijo, somatologijo in etnično antropologijo. Bil je plodovit popularizator. Nasledila ga je prof. **Zlata Dolinar Osole** (1921-2007), ki je predavala človeško anatomijo in fizično antropologijo. V 31 znanstvenih člankih je objavila študije demografije, človeške genetike in etnične antropologije. Sodelovala je pri raziskavah nekropol po Jugoslaviji in raziskovala zaprto populacijo na otoku Susak. Njeno raziskovalno in pedagoško delo je nadaljevala prof. **Marija Štefancič** (1945-), ki

je objavila 55 znanstvenih člankov (z 31 citati). Anatomijo človeka je predavala tudi doc. **Tatjana Tomazo Ravnik** (1946-), ki je napisala 15 znanstvenih člankov.

Prof. **Kazimir Tarman** (1930-) je bil ustanovitelj skupine za **ekologijo**. Je popularizator ekologije in pisec učbenikov. Predaval je ekologijo živali, raziskoval pa je predvsem favno tal ter zgradbo in taksonomijo talnih pršic. Objavil je 30 znanstvenih in 217 strokovnih člankov in 13 knjig. Opisal je 4 nove vrste. Po njem so poimenovane vsaj 3 vrste. Nekaj časa je predaval ekologijo živali doc. **Stanko Červek** (1937-), ki je raziskoval favno skakačev ter njihovo dejavnost pri razkroju opada. Ekologijo voda oz. limnologijo je najprej kot gost predaval prof. **Marjan Rejic**, za njim pa prof. **Danijel Vrhovšek** (1943-). Ta je poleg ekoremediacij raziskoval floristiko sladkovodnih alg, a se je kmalu podal med podjetnike.

**Fiziologijo** živali je kot gost predaval prof. **Albin Seliškar** (1896-1973) z MF, domač laboratorij in raziskovalno skupino pa je oblikoval prof. **Štefan Sušec-Michieli** (1933-1968). Raziskoval je sezonsko spreminjanje barve žuželk in njihova čutila. Objavil je 34 znanstvenih in prav toliko poljudnih del. Bil je zelo prizadeven in uspešen mentor mladim entomologom – odtod, 'Slovensko entomološko društvo Štefana Michielija'. Za njim je katedro prevzel akademik **Matija Gogala** (1937-), ki je objavil 145 znanstvenih (603 citati) in le nekaj manj poljudnih in strokovnih del. Raziskoval je predvsem fiziologijo žuželčjih čutil ter vibracijsko komunikacijo pri žuželkah. Ugotovil je npr., da sta vretenčarski in askalafov rodopsin skoraj identična. Bil je direktor IBU, kasneje pa tudi direktor Prirodoslovnega muzeja. Po njem so poimenovali okoli 5 vrst. Izr. prof. **Kazimir Drašlar** (1941-) je predaval fiziologijo živali in fiziologijo človeka, raziskoval sluh in čutila žuželk ter pri nas vpeljal vrstično elektronsko mikroskopijo. Njegova dela so bila citirana 175-krat. Prof. **Tine Valentinčič** mi je prepovedal poročati o njem; je pa vpeljal etologijo. Prof. **Miran Vardjan** (1919-2005) je vpeljal rastlinsko fiziologijo in napisal približno 17 znanstvenih in prav toliko poljudnih oz. strokovnih člankov. Raziskoval je predvsem hormonsko regulacijo rasti in razvoja rastlin, na primer regulacijo dormantnosti in kalitve semen. Nasledila ga je prof. **Nada Gogala** (1937-2013), ki je poleg fiziologije rasti in razvoja raziskovala

interakcije med rastlinami in glivami, vključno z mikorizo. Objavila je 68 znanstvenih del (423 citatov).

Začetnik **biokemije** na oddelku je bil prof. **Drago Lebez** (1922-2015), mednarodno priznan toksinolog. Nadaljeval je s svojimi raziskavami, objavil 122 znanstvenih člankov (404 citatov), a tudi poljudne knjige. Nasledil ga je prof. **Peter Maček** (1952-), ki je raziskoval predvsem toksine v morskih živalih in objavil 119 znanstvenih del (s kar 3367 citati). Bil je zelo aktiven na UL in tudi sicer, bil je dekan BF ter prorektor UL.

**Molekularno biologijo** je po nabiranju izkušenj v ZDA v Sloveniji vpeljal prof. **Miklavž Grabnar** (1936-). Raziskoval je genetiko bakterij in s predavanji iz 'molekularne' genetike odločilno vplival na razvoj slovenske biologije. Objavil je 35 znanstvenih del, citiranih 712-krat. Študentom biologije in medoddelčnega študija mikrobiologije je predavala tudi doc. **Blagajana Herzog Velikonja** (1953-), ki je raziskovala genetiko bakterij in arhej, npr. biosintezo prolina pri halofilnih arhejah, ter biodiverzitetu arhej v solinah in kraških jamah. Objavila je 35 znanstvenih del, ki so citirana 341-krat. Prof. **Darja Žgur Bertok** (1954-) se je upokojila kot predstojnica Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov. Raziskovala je mehanizme izražanja genov, horizontalne prenose DNK, mikrobiota prebavnega trakta in drugo. Objavila je 66 znanstvenih člankov in dosegla 857 citatov. Iz kliničnih ustanov je prišel osnovatelj **mikrobiologije** prof. **Miha Janc** (1937-). Ukvarjal se je z ekologijo in toksinologijo bakterij. Objavil je okoli 50 znanstvenih člankov s 329 citati ter visokošolski učbenik.

Na OB imamo tudi katedro za **biološko didaktiko**, ki jo je zasnoval prof. **Brane Vesel** (1926-2017), sicer aktiven predvsem organizacijsko. Nasledila ga je prof. **Tatjana Verčkovnik** (1948-), ki je objavila 18 znanstvenih del. Bila je mentorica pri kar 117 diplomskih nalogah. Po uveljavitvi katedre za didaktiko se je študij biologije nekako razcepil v dve smeri, v raziskovalno-tehniško ter pedagoško smer.

Svoje čase so nas urili tudi v 'risanju bioloških objektov'. To poslanstvo sta opravljala akademska umetnika **Viktor Cotič** (1885-1955) in **Floris Oblak** (1924-2006).

Vprašljiva je pripadnost temu članku dveh zelo pomembnih učiteljev. Prvi je prof. **Andrej**

**Blejec** (1953-), ki je bil delno zaposlen na NIB in torej ne čisto naš, povrh vsega pa še ni upokojen. Je matematik, ki so ga k sodelovanju pritegnili ekologi, a je pozneje sodeloval pri najrazličnejših raziskavah. Predava statistiko, bioinformatiko in računalništvo. Objavil je 250 znanstvenih člankov z 917 citati. Drugi pa je že upokojeni akademik **Ivan Kreft** (1941-). Ta ni bil zaposlen na OB, vendar je kar 20 let biologom predaval genetiko evkariontov. Ukvarja se

predvsem z ajdo. Za 315 znanstvenih del je iztržil 2525 citatov.

Že dolga leta dejavnost oddelka pestri Biološki oktet s približno osmimi člani, ki so bili v začetku večinoma biologi. Mlajši in nežnejši je bil ženski zbor Andromeda.

Pregleda nad priznanji, ki so jih prejeli člani Oddelka za biologijo, žal nisem našel; izbrskal sem naslednje podatke (Tabela 1).

**Tabela 1:** Priznanja članom Oddelka za biologijo BF UL.

**Table 1:** Awards given to members of Department of Biology.

<b>Priznanje</b>	<b>Število</b>
<b>Mednarodno</b>	
predsednik mednarodnega združenja	vsaj 1
član tuje akademije	vsaj 2
<b>Državno (pred in po osamosvojitvi)</b>	
Red dela s srebrnim vencem	vsaj 1
Red dela z zlatim vencem	vsaj 1
Red republike s srebrnim vencem	vsaj 1
Zlati red za zasluge za življ. delo	vsaj 1
Red zaslug za ljudstvo s srebrno zvezdo	1
akademik	2 živa, 3 pokojni
nagrada AVNOJ-a	1
Prešernova nagrada (za znanost)	vsaj 1
Nagrada sklada Borisa Kidriča (1961-1991)	vsaj 6
Zoisova nagr. za vrhunske znan. dosežke (1988-)	1
<b>Univerzitetno (UL in UP)</b>	
častni doktor	2
častni senator	1
zaslužni profesor	2 živa, 3 pokojni
rektor	1
prorektor	3
manj bleščeča (ali bolj skrita) priznanja	<b>števila</b>

## Katedra za zoologijo

Rok Kostanjšek, Nada Žnidaršič, Lila Bizjak Mali, Anita Jemec Kokalj, Damjana Drobne

Zgodovina Katedre za zoologijo na UL svopada z njeno ustanovitvijo leta 1919, ko je bila v okviru Filozofske fakultete ustanovljena Stolica za zoologijo. Ob svoji stoletnici katedra vključuje več kot trideset sodelavcev in tvori največjo enoto Oddelka za biologijo. V okviru katedre delujejo tri raziskovalne skupine: »Skupina za funkcionalno morfologijo živali in razvojno biologijo«, »Skupina za speleobiologijo« in »Skupina za nanobiologijo in nanotoksikologijo«, ki je kot najmlajša skupina nedavno praznovala 10 obletnico svojega delovanja. Raziskovalno delo katedre poteka v treh tematskih sklopih. V sklopu »Organizem« obravnavamo biologijo živali, od molekulskega do organizemskega organizacijskega nivoja. Pri tem raziskujemo povezave med strukturo in funkcijo živali, zlasti v povezavi z njihovim razvojem, obnavljanjem tkiv, mikrobnimi interakcijami in prilagoditvami na okolje. V sklopu »Od populacij do združb« obravnavamo makroskopske procese, merljive na nivoju populacije in vrste. Glavno vprašanje je razumevanje biotske pestrosti skozi ekološke in evolucijske procese. V sklopu »Živali v antropocenu« obravnavamo interakcijo med človekom in živaljo. Sklopi se med seboj dopolnjujejo. Združevanje teorije in metod posameznih sklopov pa omogoča celostno razumevanje bioloških procesov.

Metodološko podporo raziskovalnemu in pedagoškemu delu katedre nudi sodobna infrastruktura za mikroskopske analize, ki deluje v okviru »Infrastrukturnega centra mikroskopija bioloških vzorcev«, laboratorij za gojenje celičnih kultur, sodobno opremljen laboratorij za molekulske in filogenetske raziskave, laboratorij za atomsko absorpcijsko spektrometrijo, speleokomora za gojenje jamskih živali, akvaterarij za gojenje rib, dvoživk in kopenskih nevretenčarjev.

Na pedagoškem področju sodelavci katedre sodelujemo pri 24 predmetih prvostopenjskih programov »Biologija«, »Mikrobiologija«, »Biotehnologija« in »Živilstvo in prehrana«, ter magistrskih programov »Molekulska in funkcionalna biologija«, »Ekologija in biodiverzitet«, »Biološko izobraževanje« in »Biotehnologija« na Biotehniški fakulteti. Poleg predmetov na med-

fakultetnem doktorskem programu Bioznanosti, pa sodelujemo tudi pri 12 predmetih drugih članic Univerze v Ljubljani, kot so Pedagoška fakulteta, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Fakulteta za gradbeništvo in geodezijo in Akademijo za likovno umetnost in oblikovanje.

### *Raziskovalna skupina za funkcionalno morfologijo živali in razvojno biologijo*

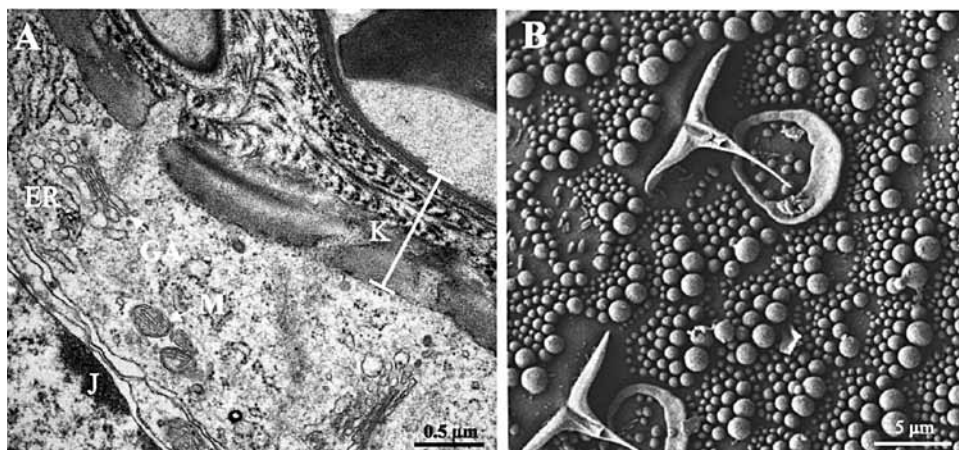
Združitev Raziskovalne skupine za funkcionalno morfološke in ekotoksikološke raziskave nevretenčarjev ter Skupine za funkcionalno-morfološke raziskave vretenčarjev je vodila do oblikovanja Raziskovalne skupine za funkcionalno morfologijo živali in razvojno biologijo v okviru iste katedre.

Na področju **Splošne zoologije** sta pedagoško in raziskovalno delo vodila prof. dr. Pavel Ličar in zasl. prof. dr. Jasna Štrus. S sodelavkama Mojco Godek in Olgo Urbanc Berčič sta razvijala tudi metodologijo za mikroskopske analize bioloških vzorcev, zlasti za elektronsko mikroskopijo. Področju razvoja mikroskopije so se kasneje pridruževali novi sodelavci, kar je vodilo v oblikovanje Infrastrukturnega centra 'Mikroskopija bioloških vzorcev', ki danes deluje na BF. Aktivnosti v tej skupini so bile ključne tudi za razvoj pedagoškega dela na oddelku. Profesor Ličar je bil dolgoletni predsednik študijske komisije, profesorica Štrus je bila pobudnica in vodilna organizatorica oblikovanja študijskega področja Znanosti o celici v doktorskem študiju Bioznanosti na Biotehniški fakulteti ter je s številnimi aktivnostmi in z vpetostjo v mednarodni prostor bistveno doprinesla k razvoju in prepoznavnosti študijskih programov in raziskovalnega dela Univerze v Ljubljani. Ožje raziskovalno področje profesorja Ličarja je bila funkcijska morfologija prebavnega sistema enakonožcev. Raziskovalno delo profesorice Štrus obsega široko področje zooloških raziskav, s poudarkom na raziskavah funkcijske morfologije in ultrastrukture nevretenčarjev. Del svojega raziskovalnega dela je posvetila študiju ultrastrukturne zgradbe in dinamike epidermisa

rakov. Drugo težišče njenega dela so raziskave anatomske, histološke in ultrastrukturne zgradbe prebavnega sistema, v zadnjem času pa je veliko pozornosti namenila raziskavam embrionalnega razvoja pri tej skupini organizmov. Širitev in nadgradnja teh raziskav je vodila v več smeri, v raziskave na področju ekotoksikologije (Drobne, Zidar, Malenšek), funkcijske ultrastrukture in razvoja (Žnidaršič, Mrak, Vittori, Bogataj, Milatovič, Murko Bulič) ter interakcij nevretenčarjev in mikrobov (Kostanjšek). Širitvam raziskav in povečevanju števila sodelavcev so sledile tudi spremembe v organizaciji dela in oblikovanje novih raziskovalnih skupin.

Osnovna področja pedagoškega, raziskovalnega in strokovnega dela skupine danes so celična biologija, funkcijska morfologija in razvoj živali. Razumevanje kompleksnosti in dinamičnosti zgradbe v povezavi z delovanjem tkiv in organov ter razumevanje morfogeneze tkiv in organov med embrionalnim in postembrionalnim razvojem je široko področje temeljnih znanj v biologiji in je osnova za uporabo na različnih področjih. Eden ključnih izzivov je analiza oblikovanja tkiv in organov *in situ*, torej v kontekstu celotnega

organizma in z integracijo ultrastrukturnega, histološkega in anatomskega nivoja. V naši skupini raziskujemo morfogenezo tkiv in organov v embrijih enakonožcev, s poudarkom na pojasnitvi ultrastrukturnih značilnosti diferenciacije epidermisa in črevesnega epitela. V zadnjem času je zelo izpostavljen tudi pomen poznavanja podrobne zgradbe in sestave živalskih tkiv z vidika razumevanja značilnosti in funkcionalnosti bioloških materialov. Del naših raziskav tako namenjamo pojasnitvi zgradbe, mineralne sestave in biomehanike skeleta rakov na mikrometrskem in nanometrskem nivoju, z namenom nadgradnje znanja o bioloških materialih. Kutikula rakov je kompleksen hierarhično organiziran biološki matriks iz hitinsko-proteinskega ogrodja, ki je mineraliziran z različnimi kalcijevimi minerali. V okviru študij biomineralizacije raziskujemo tudi kalcijeva telesca pri enakonožcih in vlogo bakterij v teh strukturah. Z morfološkimi in ultrastrukturnimi analizami, zlasti integumenta, se vključujemo tudi v študije prilagoditev organizmov na podzemna okolja Dinarskega krasa. Del raziskav pa je posvečenih študiju izogibnega vedenja in socialnih interakcij kopenskih rakov enakonožcev



**Slika 1:** (A) - Tvorba nove eksoskeletne kutikule pri enakonožcu vrste *Porcellio scaber* – posnetek s presevnim elektronskim mikroskopom. Razvidna je zgradba nastajajoče kutikule (K) in ultrastruktura epidermalne celice (J: jedro, M: mitohondrij, ER: endoplazemski retikulum, GA: Golgijev aparat). (B) - Epikutikularne strukture na telesni površini enakonožca vrste *Porcellionides pruinosus* – posnetek z vrstičnim elektronskim mikroskopom.

**Figure 1:** (A) - Formation of the new exoskeletal cuticle in isopod *Porcellio scaber* – TEM image. Structure of the forming cuticle (K) and epidermal cell ultrastructure is shown (J: nucleus, M: mitochondrion, ER: endoplasmic reticulum, GA: Golgi apparatus). (B) - Epicuticular structures on the body surface in isopod *Porcellionides pruinosus* - SEM image.

ter študiju vplivov različnih onesnažil (kovine, pesticidi) na izbrane talne živali (kopenski raki enakonožci, deževniki).

Pomembno področje našega strokovnega in raziskovalnega dela je razvoj in implementacija mikroskopskih tehnik za študij bioloških sistemov ter zagotavljanje delovanja laboratorijev za svetlobno in elektronsko mikroskopijo na našem oddelku. V okviru razvoja in uporabe različnih mikroskopskih metod za vizualizacijo makromolekul, živalskih in rastlinskih tkiv intenzivno sodelujemo z različnimi raziskovalnimi inštitucijami v Sloveniji in tujini.

Veliko pozornosti posvečamo tudi strokovnemu delu na področju vsebinske in didaktične nadgradnje poučevanja na vseh stopnjah univerzitetnega izobraževanja. Osredotočamo se zlasti na sodobne pristope za izboljšave na področju izvedbe laboratorijskih vaj, na alternativne načine ocenjevanja, na pristope za diferenciacijo in individualizacijo študija ter na uporabo različnih oblik e-poučevanja in kombiniranih metod v vlogi dopolnitve pedagoških procesov v vajalnici in predavalnici. Koordiniramo tudi program mednarodnih študentskih izmenjav Erasmus na Oddelku za biologijo.

### Izbrane reference

- Bogataj, U., Mrak, P., Štrus, J., Žnidaršič, N., 2019. Ultrastructural differentiation of plasma membrane and cell junctions in the hindgut cells is synchronized with key developmental transitions in *Porcellio scaber*. *Arthropod Structure and Development*, 50, 78-93.
- Kostanjšek, R., Vittori, M., Šrot, V., Aken, P., Štrus, J., 2017. Polyphosphate-accumulating bacterial community colonizing the calcium bodies of terrestrial isopod crustaceans *Titanethes albus* and *Hyloniscus riparius*. *FEMS Microbiology, Ecology*, 93 (6), 1-13.
- Ličar, P., Blejcek, A., Urbanc-Berčič, O., 1979. Mehanske lastnosti primarnega filtra v želodcu pri *Asellus aquaticus cavernicolus* (Isopoda, Asellota). *Biološki vestnik*, 27 (1), 33-48.
- Milatovič, M., Kostanjšek, R., Štrus, J., 2010. Ontogenetic development of *Porcellio scaber*: staging based on microscopic anatomy. *Journal of Crustacean Biology*, 30 (2), 225-234.
- Mrak, P., Bogataj, U., Štrus, J., Žnidaršič, N., 2017. Cuticle morphogenesis in crustacean embryonic and postembryonic stages. *Arthropod Structure and Development*, 46, 77-95.
- Štrus, J., Drobne, D., Ličar, P., 1995. Comparative anatomy and functional aspects of the digestive system in amphibious and terrestrial isopods (Isopoda: Oniscoidea). V: Alikhan, M.A. (ur.): *Terrestrial isopod biology*, Rotterdam, A.A. Balkema, 9, str. 15-23.
- Štrus, J., Žnidaršič, N., Mrak, P., Bogataj, U., Vogt, G., 2019. Structure, function and development of the digestive system in malacostracan crustaceans and adaptation to different lifestyles. *Cell and Tissue Research*, 377, 415-443.
- Vittori, M., Šrot, V., Bussmann, B., Predel, F., van Aken, P.A., Štrus, J., 2018. Structural optimization and amorphous calcium phosphate mineralization in sensory setae of a terrestrial crustacean (Isopoda: Oniscoidea). *Micron: The international research and review journal for microscopy*, 112, 26-34.
- Zidar, P., Kos, M., Vogel-Mikuš, K., Elteren, J. T. van, Debeljak, M., Žižek, S., 2016. Impact of ionophore monensin on performance and Cu uptake in earthworm *Eisenia andrei* exposed to copper-contaminated soil. *Chemosphere*, 161, 119-126.
- Žnidaršič, N., Mrak, P., Tušek-Žnidarič, M., Štrus, J., 2012. Exoskeleton anchoring to tendon cells and muscles in molting isopod crustaceans. *Advances in Terrestrial Isopod Biology, Zookeys*, 176, 39-53.



Začetki delovanja na področju **Funkcionalne morfologije vretenčarjev** segajo v zgodnja sedemdeseta leta. V njej so pod vodstvom prof. dr. Lili Istenič delovali asistent Aleš Sojar, raziskovalec Boris Bulog in tehnični sodelavec Danilo Musar, raziskave skupine pa so bile osredotočene na biološke prilagoditve človeške ribice (*Proteus anguinus*) na podzemno okolje (Slika 2) in v analizo hidrokemijskih lastnosti podzemne vode. Postavili so temelje funkcionalno-morfoloških raziskav te endemne dvoživke. Širok nabor raziskovanih tematik skupine je vključeval nova spoznanja s področij obremenjenosti podzemnih voda s težkimi kovinami, prilagoditev proteusa na anoksične razmere in dolgotrajno stradanje, larvalne značilnosti njegove kože s poudarkom na odzivu Leydigovih celic in kopicanju pigmenta riboflavina, prehrane, ter metabolizma kalcija vključno z mesti skladiščenja kalcijevih soli v prebavnem sistemu. Osrednja tematika raziskav pa so bile čutilne sposobnosti proteusa za učinkovito orientacijo in iskanje plena v popolni temi, v okviru katerih so bili raziskani gustatorni receptorji v ustno-žrelni sluznici in škržnih režah, elektroreptorni ampularni organi v koži glave, mehanoreptorni nevromasti in membranski labirint notranjega ušesa. (Bulog 1994, Bulog et al. 2000)

Z upokojitvijo prof. Istenič leta 1989 je vodenje skupine prevzel prof. dr. Boris Bulog in nadaljeval s svojo ekspertizo čutilnih sposobnosti proteusa. V skupini so delovali asistentka Lilijana Bizjak-Mali, mladi raziskovalci Marjanca Kos, Katarina Mihajl-Dobrovoljc in Petra-Maja Prelovšek, kot tehniška sodelavka pa se je skupini pridružila Katja Zdešar-Kotnik. Odkrita je bila sposobnost orientacije proteusa v magnetnem polju, raziskave notranjega ušesa pa so bile dopolnjene s fiziološkimi študijami. Potrjena je bila prisotnost vidnih pigmentov in funkcionalnost fotoreceptivnih



Slika / Figure 2: *Proteus (Proteus anguinus)*.  
(foto: Domin Dalessi)

celic mrežnice reduciranega očesa in pinealnega organa, opisana pa je bila tudi vloga jeter v daljših obdobjih stradanja, ter vloga metalotioneinov in ekstrakutaneusnih pigmentov v tem organu. Uspešno je bila vzpostavljena tudi primarna celična kultura jetrnih celic proteusa. Pomemben prispevek skupine k varstveni biologiji proteusa pa je vključeval spremljanje kopičenja onesnažil v okolju in tkivih proteusa za oceno stopnje njegove ogroženosti, s posebnim poudarkom na redki črni podvrsti proteusa (*P. a. parkelj*), v čigar tkivih so bile izmerjene izredno visoke koncentracije arzena in cinka, v tkivih proteusov iz reke Krupe pa tudi izjemno toksični poliklorirani bifenili (PCB). Prof. Bulog si je ves čas svojega delovanja prizadeval opozarjati na problematiko onesnaženja podzemnih voda plitkega Belokrajnskega krasa, po njegovi zaslugi je bila na edinem dostopnem nahajališču črnega proteusa, na Jelševniku pri Črnomlju, vzpostavljena raziskovalna in učna postaja za opazovanje črnega proteusa v naravnem habitatu. (Bizjak-Mali et al. 2013, Bizjak-Mali in Sket 2019, Bulog 1994, Bulog et al. 2000, 2002)

Od leta 2015 z raziskavami na proteusu nadaljujeta prof. dr. Rok Kostanjšek in doc. dr. Lilijana Bizjak Mali z mlado raziskovalko Tajdo Gredar in doktorandom Gregorjem Benkom ter strokovno sodelavko Katjo Zdešar Kotnik. Z namenom vzpostavitve vzdržnega programa vzreje proteusa v ex-situ pogojih so raziskave reproduktivne biologije proteusa usmerjene v razumevanje procesov gametogeneze, embrionalnega razvoja, citogenetskih in reproduktivnih anomalij ter razvoj nedestruktivnih metod za determinacijo spola. Z optimizacijo postopkov kultivacije celic in tkiv želimo vzpostaviti *in-vitro* sistem, ki bi omogočil študij biologije proteusa brez poseganja v naravne populacije. Z namenom sledenja zdravstvenega stanja populacij proteusov v naravi in ujetništvu vpeljujemo diagnostiko na podlagi hematoloških parametrov, prepoznavanje in zdravljenje okužb in bolezenskih stanj ter razumevanje simbioz. Slednje vključujejo študije in diagnostiko patogenov, analize mikrobioma kože in prebavila ter parazitološke študije. Pomemben prispevek k razumevanju biologije proteusa obeta projekt analize njegovega genoma, h kateremu smo v sodelovanju s kitajskimi in danskimi partnerji pristopili nedavno. (Bizjak-Mali 2017, Bizjak-Mali et al. 2018, Bizjak-Mali in Sket 2019, Gredar et al. 2019, Kostanjšek et al. 2017, 2019).

### Izbrane reference

- Bizjak-Mali, L., Sepčič, K., Bulog, B., 2013. Long-term starvation in cave salamander effects on liver ultrastructure and energy reserve mobilization. *Journal of Morphology*, 274 (8), 887–900.
- Bizjak-Mali, L., 2017. Variability of testes morphology and the presence of testis-ova in the European blind cave salamander (*Proteus anguinus*). *Acta Biologica Slovenica*, 60 (1), 53–74.
- Bizjak Mali, L., Zalar, P., Turk, M., Babič Novak, M., Kostanjšek, R., Gunde-Cimerman, N., 2018. Opportunistic fungal pathogens isolated from a captive individual of the European blind cave salamander *Proteus anguinus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 129, 1, 15-30.
- Bizjak-Mali, L., Sket, B., 2019. History and biology of the »black proteus« (*Proteus anguinus parkelj* Sket & Arntzen 1994; Amphibia: Proteidae): a review. *Folia Biologica et Geologica*, 60 (1), 5–37.
- Bulog, B., 1994. Dve desetletji funkcionalno-morfoloških raziskav pri močerilu *Proteus anguinus* (Urodela, Amphibia, Caudata). *Acta Carsologica*, 23, 248–263.
- Bulog, B., Bizjak-Mali, L., Kos, M., Mihajl, K., Prelovšek, P. M., Aljančič, G., 2000. Biology and functional morphology of *Proteus anguinus* (Amphibia, Caudata). *Acta Biologica Slovenica*, 43 (3), 85–102.
- Bulog, B., Mihajl, K., Jeran, Z., Toman, M. J., 2002. Trace element concentrations in the tissues of *Proteus anguinus* (Amphibia, Caudata) and the surrounding environment. *Water, Air, and Soil Pollution*, 136, 147–163.
- Gredar, T., Leonardi, A., Novak, M., Sepčič, K., Bizjak-Mali, L., Križaj, I., Kostanjšek, R. 2019. Vitellogenin in the European cave salamander, *Proteus anguinus*: Its characterization and dynamics in a captive female as a basis for nondestructive sex identification. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 235, 30–37.
- Kostanjšek, R., Gunde-Cimerman, N., Bizjak-Mali, L., 2017. Microbial and parasitic threats to proteus. *Natura Sloveniae*, 19 (1), 31–32.
- Kostanjšek, R., Prodan, Y., Stres, B., Trontelj, P., 2019. Composition of the cutaneous bacterial community of a cave amphibian, *Proteus anguinus*. *FEMS Microbiology Ecology*, 95, fiz007 doi: 10.1093/femsec/fiz007

### Raziskovalna skupina za nanobiologijo in nanotoksikologijo

Raziskovalno skupino za nanobiologijo in nanotoksikologijo je leta 2008 ustanovila prof. dr. Damjana Drobne z namenom vpeljave novega raziskovalnega področja nanotoksikologija ter predvsem poglobljenih študij interakcij nanomaterialov z različnimi *in vitro* ter *in vivo* testnimi sistemi (Drobne 2007, Jemec et al. 2008). Jedro raziskovalne skupine poleg vodje skupine predstavljajo še doc. dr. Anita Jemec Kokalj, doc. dr. Sara Novak in dr. Venko Kononenko, k raziskovalnemu delu pa ves čas obstoja skupine v veliki meri prispevajo tudi številni doktorski študent(je)/ke.

Prednost raziskovalne skupine je širok nabor testnih organizmov, saj le ti vključujejo različne sladkovodne, morske in kopenske nevretenčarje (Jemec et al. 2008, Kos et al. 2017, Novak et al. 2018, Golobič et al. 2012). Med bolj vidnimi dosežki skupine so ugotovitve, (i) da je kvarni

potencial nanomaterialov v veliki meri odvisen od tega, ali se z njega sproščajo kovinski ioni ter (ii) da imajo nanomateriali veliko sposobnost adsorpcije na telesne površine, kar lahko vodi v kvarni učinek (Novak et al. 2018). Bistveno smo prispevali k razumevanju usode nanomaterialov v organizmu, saj smo dokazali, da le-ti preko telesnih barrier ne prehajajo prosto, ampak se v organizem asimilirajo predvsem kovine, ki se raztopijo iz nanomaterialov (Golobič et al. 2012). V zadnjem obdobju se posvečamo zlasti študiji interakcij nanomaterialov z imunskim sistemom nevretenčarjev (Boraschi et al. 2020), s čimer smo odmevni tudi v mednarodnem prostoru (projekt H2020, MSCA-ITN Pandora 2016-2019). Velik prispevek skupine je bila ustanovitev celičnega laboratorija, kjer se izvajajo testi s celičnimi kulturami ter drugimi modelnimi sistemi, kot so krvne celice in encimi. V teh študijah smo testirali vrsto nanomaterialov s potencialno uporabo v biomedicini (Kononenko et al. 2017, 2019).

Skupina je objavila velik opus strokovnih in znanstvenih del. Velik dosežek skupine je vključenost v mnoge nacionalne ter EU projekte. Med slednjimi velja omeniti: EU FP7 NanoValid (2011-2015), EU FP7 NanoMILE (2013-2016), H2020 RIA NanoFASE (2015-2019), in H2020 RIA NanoRIGO (2019-2023), ter nemški projekt DaNa 2.0. S tem je skupina močno mednarodno vpeta in prepoznavna.

V prihodnosti je usmeritev naše skupine predvsem razvoj pristopov upravljanja s tveganji

povezanimi z nanomateriali oz. t.i. »Nanotechnology Risk Governance Framework«. Naš cilj ostaja poglobljeno razumevanje mehanizmov vzajemnega delovanja med (nano)materiali in biološkimi sistemi ter razvoj novih naprednih pristopov za proučevanje na različnih nivojih biološke organizacije. Stremimo tudi k razumevanju interakcij z novimi materiali, ki se pojavljajo v naši okolici, med slednjimi velja izpostaviti nano- in mikroplastike, hibridne ter napredne materiale (Jemec Kokalj et al. 2016).

### Izbrane reference

- Boraschi, D., Alijagic, A., Auguste, M., Barbero, F., et al., 2020. Addressing nanomaterial immunosafety by evaluating innate immunity across living species. *Small*, 2000598.
- Drobne, D., 2007. Nanotoxicology for safe and sustainable nanotechnology. *Arhiv za higijeno rada i toksikologiju*, 58, 471-478.
- Golobič, M., Jemec, A., Drobne, D., Romih, et al., 2012. Upon exposure to Cu nanoparticles, accumulation of copper in the isopod *Porcellio scaber* is due to the dissolved Cu ions inside the digestive tract. *Environmental Science and Technology* 46,12112-12119.
- Jemec, A., Drobne, D., Remskar, M., Sepcic, K., Tisler, T., 2008. Effects of ingested nano-sized titanium dioxide on terrestrial isopods (*Porcellio scaber*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27, 1904-1914.
- Jemec Kokalj, A., Horvat, P., Kunej, U., Bele, M., Kržan, A., 2016. Uptake and effects of microplastic textile fibers on freshwater crustacean *Daphnia magna*. *Environmental Pollution*, 219, 201-209.
- Kononenko, V., Erman, A., Petan, T., Križaj, I., et al., 2017. Harmful at non-cytotoxic concentrations: SiO<sub>2</sub>-SPIONs affect surfactant metabolism and lamellar body biogenesis in A549 human alveolar epithelial cells. *Nanotoxicology*, 11, 419-429.
- Kononenko, V., Warheit, D., Drobne, D., 2019. Grouping of poorly soluble low (cyto)toxic particles: example with 15 selected nanoparticles and A549 human lung cells. *Nanomaterials*, 9, 1-14.
- Kos, M., Jemec Kokalj, A., Glavan, G., et al., 2017. Cerium (IV) oxide nanoparticles induce sublethal changes in honeybees after chronic exposure. *Environmental science, Nano*, 4, 2297-2310.
- Novak, S., Jemec Kokalj, A., Hočevar, M., Godec, M., Drobne, D., 2018. The significance of nanomaterial post-exposure responses in *Daphnia magna* standard acute immobilisation assay : example with testing TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 152, 61-66.

## Katedra za botaniko in fiziologijo rastlin

Jasna Dolenc Koce, Nejc Jogan, Marjana Regvar

Katedra za botaniko ima stoletno tradicijo, njeno ime (Stolica za botaniko) se pojavi že v ustanovni listini Univerze v Ljubljani leta 1919, nato pa je bila del novoustanovljenega Inštituta za botaniko.

Razvoj pedagoškega in raziskovalnega dela na Univerzi v Ljubljani je podrobno predstavljen v Fotografskem zborniku o Ljubljanski univerzi in

njenih profesorjih 1919-1960. Po tem, ko je Alfonz Paulin (1853-1942) zaradi starosti zavrnil ponujeno mu redno profesuro, je bil za prvega profesorja s področja Botanike v letu 1921 imenovan Fran Jesenko (1875-1932), ki je predhodni dve šolski leti že poučeval kot izredni predavatelj s habilitacijo Zagrebske univerze. Predaval je Splošno botaniko (anatomija, morfologija, organografija,

fiziologija), Rastlinsko ekologijo ter Sistematsko botaniko, a mu je vsaj pri slednjem predmetu kar nekaj let izdatno pomagal s predavanji in vodenjem vaj tedanji direktor Botaničnega vrta A. Paulin. Jesenkova zgodnja usmeritev v raziskave fiziologije rastlin se odraža že v doktorski disertaciji z naslovom “Odnosi med jakostjo svetlobe in anatomsko zgradbo asimilirajočih rastlinskih organov”, ki jo je leta 1875 zagovarjal na Univerzi na Dunaju. Z objavami o izgubi turgorja pri rastlinah, počitku lesnih rastlin ter rasti in razvoju listopadnih dreves, objavljenimi v letih 1910-1913, je nadaljeval raziskave fizioloških procesov rastlin. Raziskovalno se je najbolj izpostavil s preučevanjem križanca med pšenico in ržjo, tritikalo. Zato ga za pomembnega moža v slovenskem univerzitetnem prostoru šteje tudi Biotehniška fakulteta, ki je po njem poimenovala svoja najvišja priznanja in nagrade.

O razvoju botanike na Oddelku za biologijo UL opisuje v uvodnem delu že prof. Sket. Dolga leta je katedro za botaniko vodil prof. Tone Wraber (1938-2010), ki je med letoma 1978 in 2003 poučeval Sistematsko botaniko in Biogeografijo in kot eden redkih s klasično izobrazbo tudi Osnove latinščine za biologe. Raziskovalno se je ukvarjal s fitocenologijo, kartiranjem flore, naravovarstvom in zgodovino botanike, bil pa je tudi zelo uspešen popularizator botanike. Katedro za fiziologijo rastlin je v 80. in 90. letih vodila zaslužna prof. Nada Gogala (1937-2013), ki je poučevala predmete Fiziologija rastlin, Rast in razvoj rastlin, Simbioze in parazitizem, raziskovalno pa se je usmerila na področje rastlinskih tkivnih kultur in hormonskega uravnavanja mikorizne simbioze. Katedri sta se leta 2008 združili v Katedro za botaniko in fiziologijo rastlin. Takrat je njeno vodenje prevzel izr. prof. Nejc Jogan, od 2013 do 2018 je bila predstojnica katedre prof. Marjana Regvar, danes pa doc. Jasna Dolenc Koce. Dodaten zgodovinski opis posameznega področja je vključen v nadaljevanju pri opisu posamezne raziskovalne skupine.

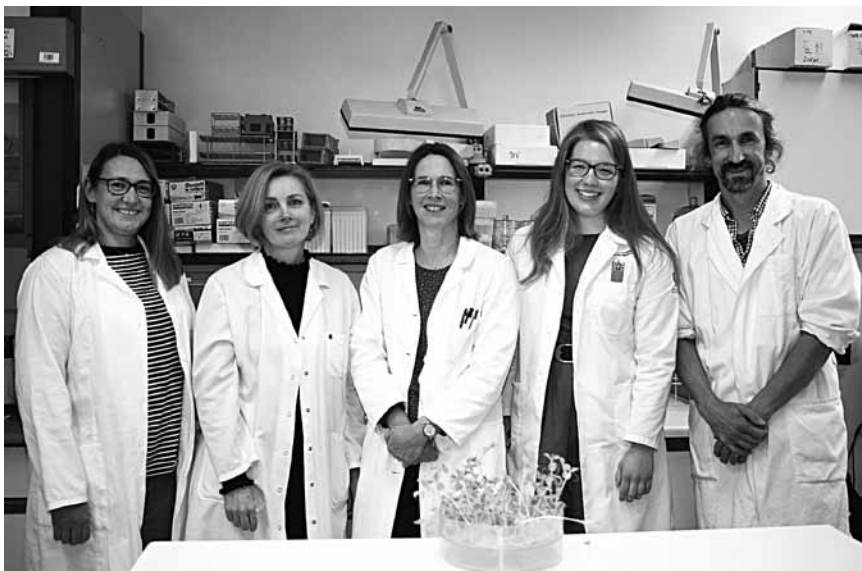
Sodelavci katedre smo močno vpeti v pedagoško delo od prvega do zadnjega letnika različnih študijev, povezanih z biologijo, ki potekajo na Biotehniški fakulteti in Pedagoški fakulteti UL, rastlinski svet pa približamo tudi študentom Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo. Skupno poučujemo 16 obveznih in

izbirnih predmetov na 1. stopnji univerzitetnih študijev Biologija, Mikrobiologija, Biotehnologija, Živilstvo in prehrana, Biokemija (predmeti Splošna botanika, Sistematska botanika, Terensko delo iz botanike in zoologije, Fiziologija rastlin, Biologija, Biologija večceličnih organizmov, Rastline in človek, Uvod v odnose med organizmi Naravovarstvena praksa, Slovenska flora in favna) in 10 na 2. stopnji magistrskih študijskih programov Molekulska in funkcionalna biologija ter Ekologija in biodiverzitetna (predmeti Funkcionalna biologija celice, Rast in razvoj rastlin, Biogeografija, Genetika v ekologiji in sistematiki, Okoljska biotehnologija, Biotske interakcije rastlin, Mikroskopija bioloških sistemov). Sodelujemo tudi na 3. stopnji doktorskega študija Bioznanosti (Fiziologija in morfologija – integrativni pristop, Ekologija).

Raziskovalna dejavnost vseh sodelavcev katedre poteka v okviru raziskovalnega programa ARRS Biologija rastlin (P1-0212). Formalno so v katedri organizirane tri raziskovalne skupine - za eksperimentalno botaniko, sistematsko botaniko in fiziologijo rastlin.

#### *Raziskovalna skupina za eksperimentalno botaniko*

Raziskovalna skupina za eksperimentalno botaniko (ali z imenom delovne skupine za za splošno botaniko) je ves čas svojega obstoja del Katedre za botaniko. Razdelitev poučevanja in raziskovanja med “splošnimi” in “sistematskimi” botaniki je bila le deloma razmejena. Prof. Franc Sušnik (1930-1996), ki je predaval Splošno botaniko do začetka 90. let, se je ukvarjal predvsem z uporabno botaniko (zdravilne rastline, fitokemija) in s posodabljanjem poučevanja biologije v srednjih šolah, bil pa je tudi začetnik kariologije in kariosistematike. V istem času je predaval tudi doc. Vlado Ravnik, ki se je posvetil nekaterim taksonomsko kritičnim skupinam in še posebej kukavičevkam, zlasti uspešno pa tudi botanični ilustraciji. Med drugim je opisal novo endemično vrsto kamniško murko. Njun asistent Boris Turk se je posvečal ruderalni in adventivni flori, pomemben pa je tudi njegov opis gozdne špajke. Nov veter je zavel l. 1994, ko je skupino prevzela prof. Marina Dermastia, ki je okrepila



**Slika 3:** Skupina za eksperimentalno botaniko leta 2020 (od leve proti desni): Simona Strgulc Krajšek, Sabina Anžlovar, Jasna Dolenc Koce, Katarina Šoln, Aleš Kladnik. (foto: Tjaša Pogačnik Lipovec)

**Figure 3:** Group of Experimental Botany in year 2020 (from left to right): Simona Strgulc Krajšek, Sabina Anžlovar, Jasna Dolenc Koce, Katarina Šoln, Aleš Kladnik.

skupino z mladimi asistentkami in raziskovalkami/ci (Barbaro Vilhar, Jasno Dolenc Koce, Sabino Anžlovar, Simono Strgulc Krajšek, Alešem Kladnikom in drugimi). Raziskave te skupine so bile sprva povezane z interakcijami rastlin z virusi in odzivi na patogene, l. 1999 pa se je laboratorij opremil za merjenje velikosti jedrnega genoma s slikovno citometrijo DNA (Vilhar et al. 2001). Mikroskopija in raziskave velikosti genoma so tudi danes še vedno pomemben segment našega raziskovalnega dela. Za kratko obdobje je prevzela skupino dr. Barbara Vilhar, od leta 2009 dalje pa jo vodi doc. Jasna Dolenc Koce.

Skupina od l. 2004 sodeluje v raziskovalnem programu Biologija rastlin (sprva pod vodstvom Marine Dermastia, danes je njena vodja Alenka Gaberščik). S svojim raziskavami je skupina vpeta v področja Biodiverziteta, Rast in razvoj ter Interakcije rastlin z okoljem. Velikost genoma smo izmerili za različne ekološko zaokrožene skupine, npr. morske trave in halofite, ter kot celične spremembe med razvojem tkiv in organov, npr. med zorenjem semen koruze (Vilhar et al. 2002), njenega prednika teozinta (Dermastia et al. 2009) in sirka (Kladnik et al. 2006). Z velikostjo genoma

in kariotipom smo tudi identificirali morfološko podobne vrste v taksonomsko zapleteni skupini bekič (*Luzula sect. Luzula*) (Bačič et al. 2007), pri tujerodnih dresnikih (*Fallopia*) (Strgulc Krajšek in Dolenc Koce 2015) in pri spominčicah. Svetlobna in fluorescentna mikroskopija je bila tudi osnovno orodje za preučevanje celičnih sprememb med abscizijo cvetov in listov pri paradižniku (Bardror et al. 2011, Dermastia et al. 2012). Pri tem smo prostorsko informacijo kombinirali z molekularnimi metodami za detekcijo programirane celične smrti.

Ves čas smo tudi nadaljevali z raziskavami rastlin z abiotskimi in biotskimi dejavniki v okolju. Ugotavljali smo toksičnost in inertnost nanodelcev bakrovega in titanovega oksida (Dolenc Koce 2017) ter mikroplastike. V zadnjem času se osredotočamo tudi na invazivne tujerodne rastline. Te negativno vplivajo na avtohtono floro, zato je pomembno, na kakšen način jih odstranjujemo in upravljamo z odpadnim materialom (Strgulc Krajšek et al., 2020). Po drugi strani pa njihova velika biomasa predstavlja potencialen vir snovi z biološko aktivnostjo. Zanima nas predvsem njihovo protimikrobno delovanje. S tovrstnimi

raziskavami sodelujemo v evropskem projektu Applause, ki ga koordinira Mestna občina Ljubljana in je namenjen prepoznavanju in odstranjevanju ali predelovanju invazivnih rastlin na območju MOL (<https://www.ljubljana.si/sl/moja-ljubljana/applause/>). V okviru tega projekta sodelujemo tudi pri kartiranju invazivnih vrst rastlin na območju Ljubljane in organizaciji delavnic o invazivnih rastlinah za meščane.

Sodelavci skupine za eksperimentalno botaniko smo strokovno dejavni v različnih društvih, ki delujejo na področju ved o rastlinah doma (Sloven-

sko društvo za biologijo rastlin, Botanično društvo Slovenije) in v tujini (The Federation of European Societies of Plant Biology, International Society for Stereology and Image Analysis). Od leta 2012 sodelujemo pri organizaciji in izvedbi Dneva očarljivih rastlin, ki je namenjen promociji znanosti o rastlinah in ga obišče tudi 1000 osnovnošolcev, zato se za podmladek ne bojimo. Za kakovostno delo in znanje mladih skrbimo tudi kot avtorji učbenikov za osnovne šole (Spoznavamo naravo 6 in 7, Naravoslovje), gimnazije (Biologija 1 in 2) in fakultete (Splošna botanika).

### Izbrane reference

- Bačič, M., Jogan, N., Dolenc Koce, J., 2007. *Luzula* sect. *Luzula* in the south-eastern Alps-karyology and genome size. *Taxon*, 56 (1), 129-136.
- Bar-Dror, T., Dermastia, M., Kladnik, A., Tušek-Žnidarič, M., Pompe Novak, M., Meir, S., Burd, S., Philosoph-Hadas, S., Ori, N., Sonogo, L., Dickman, M.B., Lers, A., 2011. Programmed cell death occurs asymmetrically during abscission in tomato. *The Plant Cell*, 23 (11), 4146-4163.
- Dermastia, M., Kladnik, A., Dolenc Koce, J., Chourey, P.S., 2009. A cellular study of teosinte *Zea mays* subsp. *parviglumis* (Poaceae) caryopsis development showing several processes conserved in maize. *American Journal of Botany*, 96 (10), 1798-1807.
- Dermastia, M., Kladnik, A., Bar-Dror, T., Lers, A., 2012. Endoreduplication preferentially occurs at the proximal side of the abscission zone during abscission of tomato leaf. *Plant Signaling and Behavior*, 7 (9), 1106-1109.
- Dolenc Koce, J., 2017. Effects of exposure to nano and bulk sized TiO<sub>2</sub> and CuO in *Lemna minor*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 119, 43-49.
- Kladnik, A., Chourey, P.S., Pring, D.R., Dermastia, M., 2006. Development of the endosperm of *Sorghum bicolor* during the endoreduplication-associated growth phase. *Journal of Cereal Science*, 43, 209-215.
- Strgulc-Krajšek, S., Dolenc Koce, J., 2015. Sexual reproduction of knotweed (*Fallopia* sect. *Reynoutria*) in Slovenia. *Preslia*, 87 (1), 17-30.
- Strgulc-Krajšek, S., Bahčič, E., Čoko, U., Dolenc Koce, J., 2020. Disposal methods for selected invasive plant species used as ornamental garden plants. *Management of Biological Invasions*, 11 (2), 293-305.
- Vilhar, B., Greilhuber, J., Dolenc Koce, J., Tensch, E.M., Dermastia, M., 2001. Plant genome size measurement with DNA image cytometry. *Annals of Botany*, 87 (6), 719-728.
- Vilhar, B., Kladnik, A., Blejec, A., Chourey, P.S., Dermastia, M., 2002. Cytometrical evidence that the loss seed weight in the miniature seed mutant of maize is associated with reduced mitotic activity in the developing endosperm. *Plant Physiology*, 129 (1), 23-30.

### Raziskovalna skupina za sistematsko botaniko

Raziskovalna skupina za sistematsko botaniko je od začetka del Katedre za botaniko ter uspešno in aktivno sodeluje predvsem s sodelavci s področja eksperimentalne botanike. Po profesorju

Ernestu Mayerju (1920-2009, poučeval sistematsko botaniko 1952-1978, pred tem 5 let asistent) je vodenje raziskovalne skupine prevzel Tone Wraber (1938-2010, asistent 1968, predavatelj 1984-2007) in za njim Nejc Jogan (asistent 1992-2007, 2007- predavatelj).

Mayerjevo znanstveno delo je bilo usmerjeno bolj v taksonomsko in fitogeografsko problematiko flore tedanje Jugoslavije, tako da se je slovenski flori pomembno posvečal le prva leta svojega raziskovalnega delovanja. Njegova kompilacija nekaterih dotedanjih zbirnih florističnih del, ki pa jih je presejal za območje slovenskega etničnega ozemlja, Seznam praprotnic in cvetnic, je bila pomembno izhodišče za botanične raziskave še več nadaljnjih desetletij, Mayerjevo ime pa bo stalno zapisano ob 24 novoopisanih taksonih z območja zahodnega Balkanskega polotoka, med drugim endemična juljski ušivec in kamniška ivanjščica. Tone Wraber je že kot Mayerjev asistent konec šestdesetih let oral ledino sistematičnega kartiranja slovenske flore po srednjeevropskih principih. Aktivnost je po prvih intenzivnih letih nekoliko zamrla, a bila po dveh desetletjih oživiljena in njen rezultat je tudi delovna verzija atlasa razširjenosti flore Slovenije s 3200 zemljevidi razširjenosti. Tudi drugače je bil T. Wraber raziskovalno usmerjen na slovensko ozemlje in ga po publikacijah štejemo za najbolj produktivnega in vplivnega botanika 20. stoletja, kolikor so mu razmere dopuščale pa je botaniziral tudi po širšem območju tedanje države in z nekaj ekspedicijami tudi v Himalaji. Opisal je čez 10 novih taksonov, med drugim Vardjanov košutnik, Widrovo lepnico in Petkovškov mak. Bil je tudi eden od družbeno izredno angažiranih strokovnjakov, ki mu ni bilo pod častjo diskutirati v pismih bralcev o številnih pomembnih temah.

Vsebinski poudarki Wraberjevega dela so bila področja floristike, fitogeografije, zgodovine botanike, delno tudi fitocenologije in naravovarstva. Poleg osnovnega predmeta Sistematska botanika je bil še posebej zavzet za izbirni predmet Latinščina za biologe, ki ga po njegovi upokojitvi ni mogel prevzeti nihče.

Wraberjev asistent Andrej Podobnik je obdeloval predvsem različne taksonomsko kritične

skupine zlatičevk, gotovo pa ni nič manj pomembno njegovo delo srednješolskega učitelja in pisca učbenikov, s čemer se je ukvarjal predvsem po odhodu z univerze.

Nejc Jogan je sprva kot asistent in kasneje predavatelj nadaljeval z utečeno raziskovalno potjo na področju floristike in sistematike, posebej pa se je raziskovalno posvetil travam in ne samo raziskovalno problematiki tujerodnih invazivnih vrst. Skupaj z asistentko Tinko Bačič sta opisala dve novi vrsti iz taksonomsko kritične skupine bekic, opisal pa je tudi kranjsko bodalico.

Od srede šestdesetih let so bili raziskovalci iz naše delovne skupine ključni avtorji v štirih zaporednih izdajah Male flore Slovenije, temeljnem florističnem delu za to območje.

Nič manj pomembno ni vsa ta desetletja delovanje sodelavcev skupine v različnih društvih, predvsem Botaničnem društvu Slovenije, katerega polovica ustanovnih članov prihaja z Oddelka za biologijo, njegova predsednika pa sta bila tudi Tone Wraber in Nejc Jogan ter sedaj Andrej Podobnik.

Bistven infrastrukturni element, ki ga upravlja in vzdržuje raziskovalna skupina, je tudi največja herbarijska zbirka v Sloveniji, herbarij LJU. Je naslednik Paulinovih herbarijskih zbirk iz časa direktorovanja Botaničnemu vrtu, vsaj po Paulinovi smrti pa samostojna javna herbarijska zbirka, ki ima danes okoli 200.000 herbarijskih pol. Večina herbarijskega materiala je z ozemlja današnje Slovenije, nekaj pa tudi soseščine. Bogata je tudi zbirka nepalske flore. Herbarijsko zbirko je v desetletjih po drugi svetovni vojni obogatilo predvsem intenzivno terensko delo vseh zaposlenih, pod kuratorstvom T. Wraberja je bila na novo urejena ter etiketirana, pod N. Joganom pa tudi digitalizirana. Predstavlja temelj za vse taksonomske raziskave Slovenije in soseščine ter ključen vir naravovarstvenih podatkov (npr. pri izdelavi rdečega seznama).

## Izbrane reference

- Bačič, M., Dolenc Koče, J., Jogan, N., 2007. *Luzula* sect. *Luzula* (Juncaceae) in the south-eastern Alps: morphology, determination and geographic distribution. *Botanica Helvetica*, 117, 1-15.
- Bačič, M., Strgulc-Krajšek, S., Jogan, N., 2015. Sivi dren (*Cornus sericea* L.) - nova invazivna vrsta v flori Slovenije = Red osier dogwood (*Cornus sericea* L.) - a new invasive species in Slovenian flora. *Acta Biologica Slovenica*, 58 (2), 13-21.

- Bačić, M., Dolenc Koce, J., Frajman, B., 2019. Diversification and distribution patterns of *Luzula* sect. *Luzula* (Juncaceae) in the Eastern Alps: a cytogenetic approach combined with extensive herbarium revisions. *Alpine Botany*, 129, 149-161.
- De Groot, M., Kleijn, D., Jogan, N., 2007. Species groups occupying different trophic levels respond differently to the invasion of semi-natural vegetation by *Solidago canadensis*. *Biological Conservation*, 136, 612-617.
- Jogan, N., 2014. *Muhlenbergia schreberi* J. F. Gmel (Poaceae), a new naturalized species in Croatia. *Acta botanica Croatica*, 73 (2), 465-470.
- Jogan, N., 2014. Poaceae. V: Rottensteiner, W.K. (ur.). *Exkursionsflora für Istrien*. Klagenfurt: Verlag des Naturwissenschaftlichen Vereins für Kärnten, 1014 str.
- Jogan, N., 2017. Spread of *Sporobolus neglectus* and *S. vaginiflorus* (Poaceae) in Slovenia and neighbouring countries. *Botanica Serbica*, 41 (2), 249-256.
- Kus Veenvliet, J., Jogan, N., 2014. Awareness raising on alien species in Slovenia. *Bulletin OEPP*, 44 (2), 243-247.
- Strgulc-Krajšek, S., Dermastia, M., Jogan, N., 2006. Determination key for Central European *Epilobium* species based on trichome morphology. *Botanica Helvetica*, 116, 169-178.
- Taberlet, P., Zimmermann, N.E., Englisch, T., Tribisch, A., Holderegger, R., Alvarez, N., Niklfeld, H., Coldea, G., Mirek, Z., Moilanen, A., Frajman, B., Jogan, N., Wraber, T., et al., 2012: Genetic diversity in widespread species is not congruent with species richness in alpine plant communities. *Ecology Letters*, 15 (12), 1439-1448.

#### Raziskovalna skupina za fiziologijo rastlin

Samostojna Katedra za fito- in zoofiziologijo je bila na Oddelku za biologijo ustanovljena v letu 1961, dolžnosti predstojnika je do leta 1964 opravljal izr. prof. Štefan Sušec-Michieli, za njim pa izr. prof. Miran Vardjan (1919-2005). V njegovem mandatu se je Katedra razdelila na dve samostojni katedri. Predaval je predmete Fiziologija rastlin (prvič razpisan v letu 1962), Ekologija rastlin in Rast rastlin, raziskovalno pa je deloval na področju kalitve ter hormonske regulacije rasti in razvoja rastlin. V letih 1966-68 je deloval kot direktor Inštituta za biologijo Univerze v Ljubljani, v letih 1971-1973 pa kot predstojnik Oddelka za biologijo. Po njegovi upokojitvi v letu 1981 je Katedro za fiziologijo rastlin prevzela zasl. prof. dr. Nada Gogala (1937-2013). Poučevala je predmete Fiziologija rastlin, Rast in razvoj rastlin, Simbioze in parazitizem za študente biologije, agronomije, biotehnologije in študente Pedagoške fakultete. Vaje pri predmetih je vodil prof. dr. Franc Pohleven, po njegovem odhodu na Oddelek za lesarstvo pa mag. Karin Gabrovšek. Raziskovalno je prof. dr. Gogala opravila pionirsko delo na področju rastlinskih tkivnih kultur v slovenskem prostoru ter hormonske regulacije med razvojem mikorizne simbioze, kar

je odmevalo tudi v mednarodni javnosti. V letih 1977-79 je bila predstojnica tedanje Visokošolske temeljne organizacije za biologijo. Od njegove ustanovitve pa tajnica Jugoslovanskega društva za rastlinsko fiziologijo in predsednica Slovenskega društva za rastlinsko fiziologijo.

Po upokojitvi prof. N. Gogala v letu 1998 je vodenje Katedre za fiziologijo rastlin prevzela prof. Marjana Regvar. Z asistentoma doc. Matevžem Likarjem in prof. Katarino Vogel-Mikuš, nadaljujejo njeno delo na pedagoškem in raziskovalnem področju. Poučujejo predmete s področja fiziologije rastlin in rastlinskih interakcij ter s sodobnimi metodami poučevanja in učnimi pripomočki širijo kompetence študentov. Od leta 2006 redno izdajajo revijo z naslovom *Collectanea Studentium Physiologiae Plantarum*, z objavami študentskih projektnih nalog. Raziskave mikorize so z razvojem molekularskih metod omogočile vpogled v populacije mikoriznih gliv in njihov pomen za ekosisteme. Raziskujejo potencial mikoriznih gliv za pridelavo kulturnih rastlin in remediacijo onesnaženih območij z rastlinami (fitoremediacije). Možnost slikovnih raziskav razporejanja elementov v rastlinskih tkivih z metodami na osnovi pospešenih delcev in sinhrotronske svetlobe in s tem razumevanje procesov privzema in kemijske oblike mineralnih hranil in potencialno strupenih



elementov pri rastlinah jim omogoča sodelovanje s kolegi z Odseka za fiziko nizkih in srednjih energij (F2), Inštituta Jožef Stefan (IJS). Raziskujejo mehanizme porazdeljevanja mineralnih hranil v tkivih kulturnih rastlin (biofortifikacija) in rastlin bogatih s kovinami (hiperakumulacija). Zaradi reorganizacijskih zahtev se je skupina v letu 2008 združila s skupinami za eksperimentalno in sistematsko botaniko v Katedro za botaniko in fiziologijo rastlin.

Do sodelovanja s strokovnjaki z Odseka za fiziko nizkih in srednjih energij (F2), Inštituta Jožef Stefan (IJS) je prišlo na pobudo prof. Hermanna Bothe iz Botaničnega Inštituta Univerze v Kölnu in zasl. prof. Bogdana Povha, tedanjega direktorja Inštituta Max Planck v Heidelbergu, strokovnjaka na področju fizike jedra in osnovnih delcev. Prenos znanja in tehnoloških rešitev v Mikroanalizni center IJS pod vodstvom prof. Miloša Budnarja in njegovega naslednika, prof. Primoža Pelicona, ter v Laboratoriju za pripravo bioloških vzorcev skupine za fiziologijo rastlin Oddelka za biologijo sta omogočila prve korake na poti k slikovnim raziskavam razporejanja različnih elementov v rastlinskih tkivih in kvantifikacijo elementov *in situ*. Sodelovanje z dr. Petrom Kumpom in dr. Marijanom Nečemrom z Odseka F2, omogoča dopolnitev raziskav s kvantitativno analizo elementov z rentgensko fluorescenčno spektrometrijo v večjem nizu rastlinskih vzorcev. Rezultat sodelovanja je niz objav s področja hiperakumulacije, kot na primer lokalizaciji Cd, Zn in Pb v listih hiperakumulacijske rastline *Nocceaea (Thlaspi) praecox* in razporeditve mineralnih hranil v zrnih kulturnih rastlin, predvsem ajde, opravljenih v sodelovanju s prof. Ivanom Kreftom (Vogel-Mikuš, s sod. 2008, 2009). Kvalitetna priprava rastlinskih vzorcev je omogočila strukturne in funkcionalne raziskave tkiv in celic s sinhrotronsko svetlobo. Z zaporedno

analizo vzorcev z infrardečo spektroskopije (FTIR) in rentgensko fluorescenčno spektroskopijo nizkih energij (LEXRF) smo dopolnili spoznanja o pomenu biokemijskih prilagoditev celic (pektini, lignin), ki omogočajo shranjevanje kovin (Zn) v epidermisu listov *N. praecox* (Regvar s sod. 2013), s korelativno analizo slike in LERF celic alevrona pšenice pa smo pridobili nova spoznanja o pomenu strukturne organizacije rezervnih vakuol (globoidov) v celicah alevrona pšenice, ki shranjujejo esencialne elemente za kalitev semen (Regvar s sod. 2011). Nadgradnja infrastrukture na Mikroanaliznem centru IJS z masno spektrometrijo sekundarnih ionov (MeV-SIMS) je omogočila tudi molekulsko slikanje aktivnih snovi v trihomih konoplje (*Cannabis indica*; Jeromel s sod. 2016).

Raziskave populacij mikoriznih gliv, s potencialom za fitoremediacijo na onesnaženih rastiščih v Mežiški dolini (Regvar s sod. 2010) smo dopolnili tudi z raziskavami simbiotskih gliv v koreninskem sistemu trte (Likar s sod. 2013) in raziskavami populacij gliv v semenu ajde (Kovačec s sod. 2016). Sposobnost glive *Botrytis cinerea*, izolirane iz semena ajde, za biološko transformacijo bakrovih nanodelcev, ki smo jo dokazali z uporabo rentgenske absorpcijske spektrometrije, nakazuje njeno tolerantnost na fungicide pripravljene na osnovi bakra (Kovačec s sod. 2017). V sodelovanju s prof.dr. Iztokom Arčonom iz Univerze v Novi Gorici in prof.dr. Alojzjem Kodretom iz Fakultete za matematiko in fiziko, UL smo razvili metode za ugotavljanje vezavnih oblik in speciacije kovin v rastlinskih tkivih z rentgensko absorpcijsko spektrometrijo, ki jo izvajamo na različnih sinhrotronskih pospeševalnikih v tujini. Kot prvi smo določili vezavne oblike Cd v hiperakumulacijski rastlini rani mošnjak in Hg v koreninah mikoriznih rastlin in užitnih gobah (Kodre s sod, 2017).

### Izbrane reference

- Jenčič, B., Jeromel, L., Ogrinc Potočnik, N., Vogel-Mikuš, K., Kovačec, E., Regvar, M., Siketić, Z., Vavpetič, P., Rupnik, Z., Bučar, K., Kelemen, M., Kovač, J., Pelicon, P., 2016. Molecular imaging of cannabis leaf tissue with MeV-SIMS method. Nuclear Instruments and Methods in Physics research, Section B, 371 (15), 205-210.
- Kodre, A., Arčon, I., Debeljak, M., Potisek, M., Likar, M., Vogel-Mikuš, K., 2017. Arbuscular mycorrhizal fungi alter Hg root uptake and ligand environment as studied by X-ray absorption fine structure. Environmental and Experimental Botany, 133, 12-23

- Kovačec, E., Likar, M., Regvar, M., 2016. Temporal changes in fungal communities from buckwheat seeds and their effects on seed germination and seedling secondary metabolism. *Fungal Biology*, 120 (5), 666-678.
- Kovačec, E., Regvar, M., van Elteren, J. T., Arčon, I., Papp, T., Makovec, D., Vogel-Mikuš, K., 2017. Biotransformation of copper oxide nanoparticles by the pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Chemosphere*, 180, 178-185.
- Likar, M., Hančević, K., Radić, T., Regvar, M., 2013. Distribution and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in grapevines from production vineyards along the eastern Adriatic coast. *Mycorrhiza*, 23 (3), 209-219.
- Regvar, M., Likar, M., Piltaver, A., Kugonič, N., Smith, J. E., 2010. Fungal community structure under goat willows (*Salix caprea* L.) growing at metal polluted site: the potential of screening in a model phytostabilisation study. *Plant and Soil*, 330 (1-2), 345-356.
- Regvar, M., Eichert, D., Kaullich, B., Gianoncelli, A., Pongrac, P., Vogel-Mikuš, K., Kreft, I., 2011. New insights into globoids of protein storage vacuoles in wheat aleurone using synchrotron soft X-ray microscopy. *Journal of Experimental Botany*, 62 (11), 3929-3939.
- Regvar, M., Eichert, D., Kaullich, B., Gianoncelli, A., Pongrac, P., Vogel-Mikuš, K., 2013. Biochemical characterization of cell types within leaves of metal-hyperaccumulating *Noccaea praecox* (Brassicaceae). *Plant and Soil*, 373 (1/2), 157-171.
- Vogel-Mikuš, K., Simčič, J., Pelicon, P., Budnar, M., Kump, P., Nečemer, M., Mesjasz-Przybyłowicz, J., Przybyłowicz, W. J., Regvar, M., 2008. Comparison of essential and non-essential element distribution in leaves of the Cd/Zn hyperaccumulator *Thlaspi praecox* as revealed by micro-PIXE. *Plant, Cell and Environment*, 31 (10), 1484-1496.
- Vogel-Mikuš, K., Pelicon, P., Vavpetič, P., Kreft, I., Regvar, M., 2009. Elemental analysis of edible grains by micro-PIXE: common buckwheat case study. *Nuclear instruments & methods in physics research. Section B, Beam Interactions with Materials and Atoms*, 17 (267), 2884-2889.

## Katedra za fiziologijo, antropologijo in etologijo

Janko Božič, Gregor Belušič, Petra Golja, Marko Kreft

Katedra kot skupna organizacijska enota treh različnih pedagoških področij deluje od leta 2011. Prvi predstojnik katedre je bil Gregor Zupančič, nato Marko Kreft, nekaj zadnjih let pa katedro vodi Janko Božič.

Najstarejša med tremi na katedri zastopanimi pedagoškimi področji je Fizična antropologija, ki jo je leta 1946 kot Katedro za antropologijo na sedanji Filozofski fakulteti ustanovil prof. dr. Božo Škerlj. Vodenje Katedre za antropologijo je leta 1961 prevzela Zlata Dolinar Osole, leta 1988 Marija Štefančič, ki je delovala skupaj z Tatjano Tomazo Ravnik. od leta 2010 pa Skupino za antropologijo vodi Petra Golja. V skupini pa delujeta še Tatjana Robič Pikel in Katja Zdešar Kotnik.

Relativno dolgo tradicijo ima tudi področje Fiziologija živali, ki je dolgo imelo tudi svojo katedro. Po prvih začetkih se je Fiziologija živali

na Biološkem oddelku začela pospešeno razvijati leta 1961 v obdobju Štefana Sušca-Michielija (1933–1968). Že takoj na začetku se mu je pridružil Matija Gogala (1937-). Kasneje sta fiziološki laboratorij in predavanja vodila Kazimir Drašlar in Peter Stušek, k delu sta pritegnila mlajše sodelavce, med drugimi Gregorja Zupančiča. Trenutno v skupini za integrativno fiziologijo in fiziologijo živali delujemo Marko Kreft, Gregor Belušič, Aleš Škorjanc, Primož Pirih, Uroš Cerkvenc, Andrej Meglič, Suzana Logar, Marko Ilič (trenutno v Hayama, Japonska) in upokojena sodelavca Kazimir Drašlar in Peter Stušek.

Iz fiziologije živali je zrastle tudi Etologija, oz. Nevroetologija, nekaj časa tudi kot posebna katedra. Področje se je začelo razvijati z izbirnim predmetom Etologija pod vodstvom Matije Gogala in izvedbi Tineta Valentinič v sedemdesetih letih

20. stoletja, v naslednjem desetletju pa je Tine Valentinčič začel s samostojnim razvojem področja. Po upokojitvi skupino vodi Janko Božič, v njej pa sta še Gordana Glavan in Špela Golob.

Zaradi različnih zgodovinskih ozadij predstavljamo vsako habilitacijsko in raziskovalno področje posebej. Na področju **Fiziologije živali** trije pedagoški sodelavci Skupine za integrativno fiziologijo in fiziologijo živali (Marko Kreft, Gregor Belušič, Aleš Škorjanc) so/izvajamo pet prvostopenjskih (Fiziologija živali, Fiziologija, Zoofiziologija, Nevrofiziologija, Fiziologija presnove), sedem drugostopenjskih (Fiziologija človeka za tri programe, Nevrobiologija, Funkcionalna biologija celice, Molekulska fiziologija celice, Poletna šola senzorične ekofiziologije) in sedem predmetov na doktorski stopnji (Molekulska fiziologija, Elektrofiziološke meritve nanometerskih razsežnosti, Fiziologija in morfologija živali – integrativni pristop, Analiza bioloških signalov, Optična mikroskopija visoke ločljivosti - konfokalna mikroskopija, Metode za študij funkcije posamezne celice, Celična fiziologija, Nano in mikroelektrofiziološke metode).

Na področju **Fizične antropologije** izobražujemo študente Biotehniške, Pedagoške in Filozofske fakultete Univerze v Ljubljani na vseh stopnjah bolonjskega programa. Na bolonjskem študijskem programu 1. stopnje izvajamo predmete Anatomija človeka in Biologija človeka za programa Biologija (BF UL) in Dvopredmetni učitelj (PeF UL), predmet Osnove anatomije s histologijo za študente programa Živilstvo in prehrana (BF UL) in predmet Paleoantropologija za študente programa Arheologija (FF UL). Na bolonjskem študijskem programu 2. stopnje izvajamo predmete Fiziologija prehrane II za študente programa Prehrana (BF UL), na bolonjskem študijskem programu 3. stopnje pa predmet Fizična antropologija za študente programa Bioznanosti (BF UL). Študente redno vključujemo v različne študentske projekte, denimo v projekte sodelovanja z gospodarstvom imenovane Po kreativni poti do znanja (PKP) in Študentske inovativne projekte za družbeno korist (ŠIPK).

Na področju **Etologije** sodelavca Janko Božič in Gordana Glavan poučujeta redne predmet Etologija na študijskem programu Biologija 1. bolonjske stopnje, predmet Vedenje živali in okolje na 2. stopenjskem študiju Ekologija in

Biodiverziteti, soizvajanje Nevrobiologije na 2. stopenjskem študijskem programu Molekulska in funkcionalna biologija, predmet Možgani in vedenje na dvopredmetnem študijskem programu z biologijo Pedagoške fakultete na 1. stopnji in kot soizvajalci predmeta Izbrana poglavja biologije z didaktiko na 2. stopnji dvopredmetnih študijskih programov Pedagoške fakultete. Občasno sodelujemo tudi pri izvajanju drugih predmetov znotraj Biotehniške fakultete. Redno izvajamo tudi izbirni predmet Čebelarstvo, ki ga vpisujejo 1. stopenjski študenti vseh študijev Biotehniške fakultete, občasno pa tudi posamezniki iz drugih fakultet. V naboru izbirnih predmetov imamo na drugi stopnji še Biologijo žuželk in Nevroetologijo, ki se pa le redko izvajata. Sodelujemo tudi pri izvedbi doktorskega študija Bioznanosti, v sodelovanju z drugimi fakultetami pa tudi v različnih oblikah študentskih projektov. Janko Božič sodeluje tudi v različnih neformalnih izobraževanju na področju čebelarstva, tako aktivno sodelovanje v Slovenski čebelarški akademiji kot tudi vodenje izpitnega odbora pri Obrtni zbornici Slovenije za poklic Čebelarški mojster/mojstrica.

#### *Raziskovalna skupina za integrativno fiziologijo in fiziologijo živali*

Skupina je vključena v dve programski skupini (P3-0333 - Očesne bolezni odraslih in otrok, UKC, Lj, in P3-310 - Celična fiziologija, UL-MF). Raziskave potekajo v treh povezanih laboratorijih: Laboratorij za fotorepcijo, Laboratorij za mehano-repcijo, Laboratorij za celično fiziologijo. Ukvarjamo se z vidom žuželk, s funkcionalnimi lastnostmi filiformnih senzil stenice, in električnimi in presnovnimi lastnostmi celic.

Laboratorij za fotorepcijo preučuje nevrnalno osnovo od vida odvisnega vedenja žuželk. Opremljen je s po meri zgrajenimi merilnimi kompleti za bliskovno in slikovno draženje (Belušič et al., 2016), znotraj- in zunajcelično snemanje signalov iz žuželčjih mrežnic in vidne poti ter optične raziskave sestavljenih oči. Raziskave se dopolnjujejo z anatomsko analizo vidne poti, s spektrometrijo in polarimetričnim slikanjem ter z vedenjskimi poskusi. Teme raziskav obsegajo polarizacijski vid obadov in večš (Belušič et al. 2017, Meglič et al. 2019), barvni vid metuljev

(Pirih et al. 2020), hroščev (Ilić et al. 2016, Meglič et al. 2020) in drugih skupin žuželk.

Laboratorij za celično fiziologijo z občutljivimi kamerami in svetlobno mikroskopijo izvaja meritve aktivnosti kalcija, dinamiko celičnih metabolitov, celično kinematiko, elektrofiziološko metodo patch-clamp, in razvoj metod analize slike (Fink et al. 2020). V sodelovanju z UL-MF in Celica biomedicinski center se ukvarja z raziskavami celic

glije in vplivom ekso- in endogenih učinkovin na možgane (Muhic et al. 2015, Kreft et al. 2016).

Laboratorij za mehanorepcijo preučuje zaznavo zračnih tokov in vibracij z dlačnimi čutilnicami pri žuželkah. Poskusi obsegajo zunajcelične meritve signalov iz čutilnih živcev, ki nastajajo ob mehanskem draženju dlačic pri rdečem škrtcu (Škorjanc et al. 2009).

### Izbrane reference

- Belušič, G., Ilić, M., Meglič, A., Pirih, P., 2016. A fast multispectral light synthesiser based on LEDs and a diffraction grating. *Scientific Reports*, 6, 32012.
- Belušič, G., Šporar, K., Meglič, A., 2017. Extreme polarisation sensitivity in the retina of the corn borer moth *Ostrinia*. *Journal of Experimental Biology*, 220, 2047-2056.
- Fink, K., Prebil, M.L., Vardjan, N., Jensen, J., Zorec, R., Kreft, M., 2020. Increase in subcellular Gsk-3 clusters in insulin- and adrenaline-treated differentiated rat skeletal muscle fibres. *Image Analysis and Stereology*, 39, 25-32.
- Ilić, M., Pirih, P., Belušič, G., 2016. Four photoreceptor classes in the open rhabdom eye of the red palm weevil, *Rynchophorus ferrugineus* Olivier. *Journal of Comparative Physiology A* 202, 203-213.
- Kreft, M., 2016. Buckwheat phenolic metabolites in health and disease. *Nutrition Research Reviews* 29, 30-39..
- Meglič, A., Ilić, M., Pirih, P., Škorjanc, A., Wehling, M. F., Kreft, M., Belušič, G., 2019. Horsefly object-directed polarotaxis is mediated by a stochastically distributed ommatidial subtype in the ventral retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116, 21843-21853.
- Meglič, A., Ilić, M., Quero, C., Arikawa, K., Belušič, G., 2020. Two chiral types of randomly rotated ommatidia are distributed across the retina of the flathead oak borer, *Coraebus undatus* (Coleoptera: Buprestidae). *Journal of Experimental Biology*, 223, jeb225920.
- Muhic, M., Vardjan, N., Chowdhury, H. H., Zorec, R., Kreft, M., 2015. Insulin and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) modulate cytoplasmic glucose and glycogen levels but not glucose transport across the membrane in astrocytes. *Journal of Biological Chemistry* 290, 11167-11176.
- Pirih, P., Meglič, A., Stavenga, D. G., Arikawa, K., Belušič, G., 2020. The Red Admiral butterfly's living light sensors and signals. *Faraday Discussions*.
- Škorjanc, A., Zupančič, G., Drašlar, K., 2009. Multiple mechanisms generate the resting activity of filiform sensilla in the firebug (*Pyrrhocoris apterus* L.; Heteroptera). *Journal of Comparative Physiology A*, 195, 651-661.

### Raziskovalna skupina za antropologijo

Obsežna zbirka antropometričnih podatkov, ki jo vsako leto dopolnjujemo in nadgrajujemo, je neprecenljiva dediščina dolgoletnega dela naših predhodnic in predhodnikov. V zadnjih letih smo uspeli vzpostaviti anonimizirano elektronsko podatkovno bazo, v kateri je zbranih več kot 250 spremenljivk za več kot 15.000 preiskovancev. Vzpostavitev elektronske antropometrične zbirke odpira nove možnosti na področju raziskav

sekularnega trenda in telesne sestave. Področje antropometričnih meritev smo razširili tudi na fiziometrične meritve, predvsem na oceno aerobne telesne zmogljivosti študentov. Pri delu med drugim sodelujemo z raziskovalci Pediatrične klinike, Nacionalnega inštituta za javno zdravje, Fakultete za šport, Zdravstvene fakultete, Inštituta za nutricionistiko in Inštituta »Jožef Stefan«.

V okviru doktorskih disertacij smo obravnavali nekatere za Skupino nove raziskovalne vsebine. V raziskavi „Nedonošenčki 1987“ smo

preučevali zakonitosti rasti in telesnega razvoja donošenih, predvsem pa nedonošenih otrok, od rojstva do zgodnje odrasle dobe. Po našem vedenju je to najobsežnejša do sedaj izvedena longitudinalna raziskava na področju rasti in razvoja nedonošenčkov. Ključni izsledki raziskave so na voljo v znanstvenih člankih (Robič Pikel et al. 2013, 2017), podroben opis raziskave in rezultatov pa v doktorski disertaciji Tatjane Robič Pikel. V raziskavi „Uporaba prehranskih dopolnil pri mladostnikih“, ki smo jo izvedli v okviru projekta ARTOS 2013/2014, smo ocenili tveganje za zdravje zaradi neustrezne prehrane in/ali uporabe prehranskih dopolnil pri slovenskih mladostnikih. Ocenili smo prevalenco uporabe prehranskih dopolnil v tej populaciji in ocenili, v kolikšni meri uporaba prehranskih dopolnil prispeva k celokupnemu vnosu mikrohranil. Ključni rezultati raziskave so na voljo v znanstvenih člankih (Zdešar Kotnik et al. 2017, 2018), podroben opis raziskave in rezultatov pa v doktorski disertaciji Katje Zdešar Kotnik.

Z bogatimi izkušnjami na področju različnih metod za oceno sestave telesa, kot so antropometrija, bioimpedančna analiza, hidrodenzitometrija ipd. (Zdešar Kotnik et al. 2012, 2015, Robič Pikel et al. 2013, Golja et al. 2020) in z znanjem o pravilni oceni prevalence prehranskih dopolnil (Zdešar Kotnik et al. 2018) aktivno sodelujemo v različnih medinstitucionalnih projektih, vključno s projekti Nacionalnega inštituta za javno zdravje (Si.Menu 2017/2018, Shema šolskega sadja in zelenjave), Fakultete za šport (ARTOS), Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete (Moje mleko 1: Vloga materinega mleka v razvoju črevesne mikrobiote dojenčka, Moje mleko 2: NUTRI-PROTECT - Prehrana otrok in odraslih kot zaščitni dejavnik ali dejavnik zdravstvenih tveganj), Inštituta za nutricionistiko in drugih. Naše raziskovalno delo predstavljamo na mednarodnih konferencah v Sloveniji in tujini.

### Izbrane reference

- Golja, P. 2019. A short history of physical anthropology in Slovenia. *Anthropological Notebooks*, 25 (3), 85-84.
- Golja, P., Robič Pikel, T., Zdešar Kotnik, K., Fležar, M., Selak, S., Kapus, K., Kotnik, P., 2020. Direct comparison of (anthropometric) methods for the assessment of body composition. *Annals of Nutrition and Metabolism*, v tisku.
- Robič Pikel, T., Benedik, E., Fidler Mis, N., Bratanič, B., Rogelj, I., Golja, P., 2013. Challenges in determining body fat in pregnant women. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 63 (4), 341-349.
- Robič Pikel, T., Starc, G., Strel, J., Kovač, M., Babnik, J., Golja, P., 2017. Impact of prematurity on exercise capacity and agility of children and youth aged 8 to 18. *Early Human Development*, 110 (1), 39-45.
- Štefančič, M., 2008. Review of research work of physical anthropology in Slovenia. *Acta Biologica Slovenica*, 51 (2), 21-33.
- Zdešar Kotnik, K., Golja, P., 2012. Changes in body composition of university students in a country in socio-economic transition. *Anthropologischer Anzeiger*, 69 (3), 261-271.
- Zdešar Kotnik, K., Robič Pikel, T., Golja, P., 2015. Which method to use for a fast assessment of body fat percentage?. *Physiological measurement*, 36 (7), 1453-1468.
- Zdešar Kotnik, K., Jurak, G., Starc, G., Golja, P., 2017. Faster, stronger, healthier: adolescent-stated reasons for dietary supplementation. *Journal of Nutrition Education and Behavior*, 49 (10), 817-826.
- Zdešar Kotnik, K., Jurak, G., Starc, G., Puc, M., Golja, P., 2018. Use of dietary supplements in differently physically active adolescents. *Journal of Food and Nutrition Research*, 57 (3), 231-241.

### Raziskovalna skupina za nevroetologijo

Začetno delo na področju nevroetologije se je navezovalo predvsem na raziskovanje sprožanje prehranjevalnega vedenja s kemičnimi signali. Raziskave so potekle na različnih živalskih skupinah kot so iglokožci, raki in ribe. Največji poudarek je bil na vonjalnem razlikovanju aminokislin pri ribah (Valentinčič 2005, Milavc in Valentinčič 2012). V zadnjih letih pa v laboratoriju proučujemo vedenjske odzive medonosne čebel in fiziološka ozadja. Začetne raziskave so bile usmerjene predvsem v razumevanje sporazumevanja čebel zlasti rekrutiranja čebel na pašo s čebeljim plesom (Božič in Valentinčič 1991). Nadaljnje raziskave vpliva etanola na vedenje čebel (Božič

et al. 2006) so postavile osnove za raziskovanje čebelam tujih snovi, predvsem različni pesticidov na njihovo prehranjevalno vedenje, procesi razstrupljanja v telesu čebel (Kos et al. 2017, Glavan et al. 2020) in vplivi na imunski odgovor čebel (Tesovnik et al. 2017). Pomembni vidik novejših raziskovanje je tudi vloga čebel pri vzpostavitvi specifične biološke aktivnosti medu in cvetnega prahu skladiščenege v satju (Podrižnik in Božič 2015), predvsem v luči možnosti uporabe medu za nego ran. Poleg aplikativnih raziskav vezanih na čebelje pridelke pa se skupina vključuje tudi v raziskavo vloge čebel za biodiverzitetu in možnosti vključitve čebelarstva v upravljanje okolja za ustrezno skrb za njegovo pestrost.

### Izbrane reference

- Božič, J., Valentinčič, T., 1991. Attendants and followers of honey bee waggle dances. *Journal of Apicultural Research*, 30 (3/4), 125-131.
- Božič, J., Abramson, C. I., Bedenčič, M., 2006. Reduced ability of ethanol drinkers for social communication in honeybees (*Apis mellifera carnica* Poll.). *Alcohol*, 38 (3), 179-183.
- Glavan, G., Novak, S., Božič, J., Jemec Kokalj, A., 2020. Comparison of sublethal effects of natural acaricides carvacrol and thymol on honeybees. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 166, 1-9.
- Kos, M., Jemec Kokalj, A., Glavan, G., Marolt, G., Zidar, P., Božič, J., Novak, S., Drobne, D., 2017. Cerium (IV) oxide nanoparticles induce sublethal changes in honeybees after chronic exposure. *Environmental Science: Nano*, 4 (12), 2297-2310.
- Miklavc, P., Vlentinič, T., 2012. Chemotopy of amino acids on the olfactory bulb predicts olfactory discrimination capabilities of zebrafish *Danio rerio*. *Chemical senses*, 37 (1), 65-75.
- Podrižnik, B., Božič, J., 2015. Maturation and stratification of antibacterial activity and total phenolic content of bee bread in honey comb cells. *Journal of Apicultural Research*, 54 (2), 81-92.
- Tesovnik, T., Cizelj, I., Zorc, M., Čitar, M., Božič, J., Glavan, G., Narat, M., 2017. Immune related gene expression in worker honey bee (*Apis mellifera carnica*) pupae exposed to neonicotinoid thiamethoxam and *Varroa mites* (*Varroa destructor*). *PLOS ONE*, 12 (10), e0187079.
- Valentinčič, T., 2005. Olfactory discrimination in fishes. V: Reutter, K., Kapoor, B.G. (ur.); *Fish chemosenses*, NH: Science Publishers, Enfield, str. 66-85.

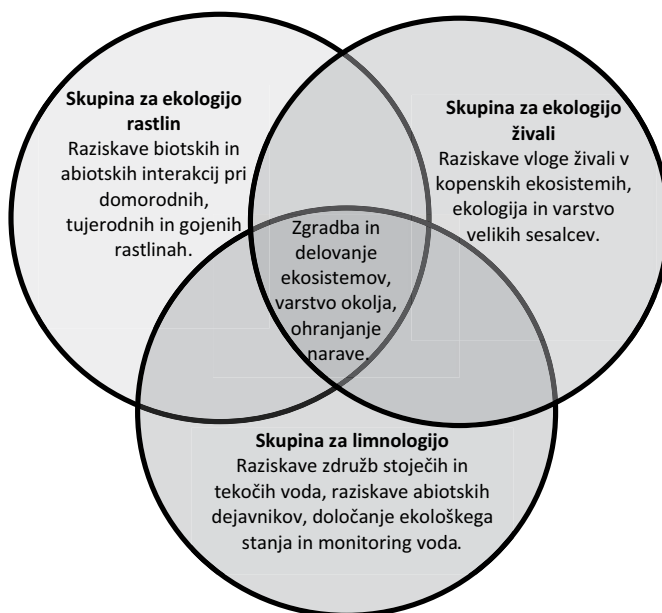
## Katedra za ekologijo in varstvo okolja

Alenka Gaberščik, Ivan Kos, Andrej Martinčič, Kazimir Tarman, Mihael Jožef Toman

Katedra za ekologijo in varstvo okolja je bila osnovana v 70. letih. Sestavljena je iz treh raziskovalnih skupin in sicer Skupine za ekologijo rastlin, Skupine za ekologijo živali in Skupine za limnologijo (Slika 4), ki so se oblikovale v 60. letih iz različnih delovnih skupin na Oddelku za biologijo. Z razvojem in uveljavljanjem ekologije kot znanstvenega področja in tudi v širši družbi je Oddelek za biologijo oziroma Biotehniška fakulteta za uspešnejšo pedagoško in raziskovalno dejavnost tudi formalno ustanovila Katedro za ekologijo in varstvo okolja.

Področje **ekologije rastlin** se je na Oddelku za biologijo pričelo razvijati v študijskem letu 1965/66, ko je bil za 2. letnik študija Biologija uveden eno-semesterški predmet Ekologija rastlin, ki ga je predaval Miran Vardjan. V letu 1968/69 je področje prevzel Andrej Martinčič, ki je poleg predavanj uvedel tudi laboratorijske in terenske vaje. Rastlinska ekologija je bila sprva vključena

v predmet Geobotanika, skupaj s Fitogeografijo in Fitocenologijo. Kasneje je bil predmet Geobotanika razdeljen na predmeta Ekologija rastlin ter Fitogeografija in fitocenologija. V 80. so bili uvedeni nekateri novi predmeti kot so Primarna produkcija, Ekosistemi ter Onesnaževanje in varstvo okolja, ki se je kasneje preimenoval v Varstvo okolja in naravne dediščine. Dolga leta se je študij rastlinske ekologije izvajal samo na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, v devetdesetih pa se je začel izvajati tudi na Univerzi v Mariboru. Andrej Martinčič je ustanovil tudi raziskovalno skupino za ekologijo rastlin. Ukvarjal se je s fitocenološkimi, florističnimi in ekološkimi raziskavami skrajnih rastišč: mrazišč, vhodov v jame in jam z umetno osvetlitvijo, visokih in nizkih barij ter presihajočega Cerknškega jezera. Med njegovimi pomembnejšimi deli je monografija o visokih barjih v Sloveniji, ki jo je napisal skupaj z Milanom Piskernikom, ključno pa je prispeval



**Slika 4:** Sestava Katedre za ekologijo in varstvo okolja in področja raziskav posameznih raziskovalnih skupin.  
**Figure 4:** Research groups of the Chair of ecology and environment conservations, and their research fields.

tudi k nastanku Male flore Slovenije. Že v osemdesetih letih je vzpostavil sodoben, odlično opremljen ekofiziološki laboratorij za meritve v naravnem okolju. Proučeval je funkcionalne (fotosintezo, transpiracijo, učinkovitost rabe sevanja) in morfološke odzive rastlin na okoljske razmere na skrajnih rastiščih.

Področje **ekologije živali** na Oddelku za biologijo je nastalo v okviru aktivnosti povezanih z biologijo živali (zoologijo). S študijskim letom 1959/60 pa je Kazimir Tarman osnoval pedagoško in raziskovalno delo s področja ekologije živali in ga kasneje nadgradil z vključevanjem novih sodelavcev (Stanko Červek, Franci Potočnik, Ivan Kos). Raziskovalno delo je bilo usmerjeno v proučevanje favniističnih, biogeografskih in ekoloških vsebin izbranih talnih (edafskih) živalskih skupin (Acarina, Chilopoda, Collembola, Oligochaeta, Isopoda). Pedagoško delo je bilo usmerjeno v podajanje teoretičnega znanja, uvajanje laboratorijskih in terenskih vaj (oziroma ekskurzij) in mentorstvo študentom, predvsem s področja ekologije živali, pa tudi s področja varstva okolja in narave ter biologije morja. Z uvajanjem področja ekologije in študijske in učne programe je K. Tarman ekologijo vpeljal v širši slovenski prostor in je sedaj zastopana v različnih študijskih programih.

Področje **limnologije** je bilo na Oddelek za biologijo uvedeno sredi sedemdesetih, ko je bil osnovan izbirni predmet Sladkovodni ekosistemi, ki ga je predaval Marjan Rejic, raziskovalec na Kemijskem inštitutu Borisa Kidriča in sodelavec posebne Skupine za kemijo, tehnologijo in biologijo voda, ki jo je vodil Milan Dular. Pod vodstvom M. Rejica so bila predavanja na Oddelku le nekaj časa, kasneje jih je za nekaj let prevzel asistent A. Martinčiča, Danijel Vrhovšek. V osemdesetih letih pa do danes je področje limnologije prevzel Mihael Jožef Toman, ki je razširil nabor predmetov vezanih na ekologijo celinskih voda. Ti predmeti so danes tudi del študija Okoljskega inženirstva na Fakulteti za gradbeništvo in geodeziji in Krajinjske arhitekture na Biotehniški fakulteti.

Z uvedbo bolonjskega študija je bil vzpostavljen dvostopenjski sistem in sicer univerzitetni študij biologije in magistrski študij Ekologija in biodiverziteta. Danes sodelavci katedre na 1. stopnji predavamo predmet Ekologija, na 2. pa usmerjene ekološke predmete kot so Ekologija

rastlin, Ekologija živali, Ekologija celinskih voda, Ekosistemi, Biogeografija, Varstvena biologija, Okoljske spremembe in varstvo ter Upravljanje z vodnimi ekosistemi.

### *Skupina za ekologijo rastlin*

Leta 1998 je vodenje skupine in pedagoške obveznosti prevzela Alenka Gaberščik. Danes v raziskovalni skupini sodelujejo Tadeja Trošt Sedej, Mateja Germ, Igor Zelnik, Aleksandra Golob, mlada raziskovalka Mateja Grašič. Raziskovalno delo skupine je usmerjeno v raziskave ekologije rastlin in ekosistemske raziskave. Poleg raziskovanja Cerkniškega jezera, ki ga je preučeval že A. Martinčič, se je skupina usmerila v preučevanje ekologije makrofitov in invazivnih tujerodnih vrst (ITV), interakcij rastlin s sevanjem ter v sodelovanju z Ivanom Kreftom tudi v preučevanje ekologije in biofortifikacije kmetijskih rastlin, predvsem ajde in žit. Na usmeritev raziskav skupine je pomembno vplivala vključenost članov skupine v mednarodna združenja; Ekspertno skupino za makrofite donavskega porečja, Svetovno in evropsko združenje za mokrišča in strokovno združenje UV4growth. Raziskave vodnih makrofitov so bile v Sloveniji pionirske. Pregledali smo več kot 1200 km slovenskih vodotokov in pojavljanje vodnih rastlin (makrofitov) povezali z morfološkimi značilnostmi vodotoka. Z dolgotrajnim spremljanjem makrofitov Bohinjskega jezera smo pokazali, da na dinamiko pojavljanja, globinske razporeditve in pogostosti makrofitov vplivajo klimatske razmere in koncentracije fitoplanktona v vodnem stolpcu. Raziskava vodnih teles ob Dravi je pokazala, da vrstna sestava hidrofitev vpliva na prisotnost predstavnikov hroščev. Raziskave interakcij s kemijskimi dejavniki so razkrile, da imajo različne vrste makrofitov različni potencial kopičenja hranil in kovin. Raziskave ITV v obrežnih pasovih odkrivajo, da je pogostost ITV povezana s spremenjenostjo obrežnega pasu ter da tujerodne vzpenjavke lahko močno vplivajo na domorodne vrste. Raziskave UV sevanja smo začeli v okviru EU projekta UV-AQTER. Dokazali smo povezavo med rastnimi oblikami rastlin ter življenjsko dobo in občutljivostjo na UV (npr.: Rozema et al. 2002), nizko sposobnost aklimatizacije na sevanje pri hidrofiteh, manjšo



privlačnost z UV obsevanih alg za prehrano vodnih bolh, blažilni učinek UV sevanja ob stresu zaradi suše, pomembnost biomineralov pri razlagi optičnih lastnosti listov predvsem v UV delu spektra. Raziskave biomineralov v rastlinah so pokazale, da se stopnja in vzorec inkrustriranosti razlikujeta med vrstami in glede na starost lista ter, da suša močno zmanjša privzem biomineralov in drugih elementov, kar ima negativen vpliv na žita, ki so pomembni akumuliratorji Si (npr. Grašič et al. 2019). Raziskave optičnih lastnosti listov so pokazale povezanost z zgradbo lista, tako da so odbojni spektri nekakšni »spektralni podpisi« rastlin, kar je pomembno z vidika raziskav, ki temeljijo na zaznavanju vegetacije na daljavo. Prepoznali smo različne mehanizme optimiziranja optičnih lastnosti različnih vrst v podrasti, kjer je svetloba omejujoč dejavnik. Raziskovali smo tudi kako na optične lastnosti vplivajo snovi na površini lista. Prisotnost diatomej na površini hidrofitov in prisotnost soli na površini listov slanuš ščiti liste pred UV sevanjem, prisotnost apnenčastega prahu na površini listov bukve pa odbija PAR in preprečuje segrevanje listov. Na optične lastnosti listov vplivajo tudi biominerali na primer okremenitve listov trav, predvsem bodičke, povečajo odbojnost kratkih valovnih dolžin, kristali kalcijevega oksalata pa vplivajo na prehajanje sevanja v listih ajde. Pomembno področje naših raziskav je Cerkniško jezero, kjer

raziskujemo tako procese kot tudi vrste, na primer rastline z amfibijskim značajem, ki odražajo veliko fenotipsko plastičnost na morfološki in funkcionalni ravni kar optimizira funkcijo v spremenljivih razmerah. Ugotovili smo, da vodostaj močno vpliva na prisotnost večinsko zastopanih vrst, na primarno proizvodnjo navadnega trsta ter da se stopnja razgradnje opada navadnega trsta povečuje s trajanjem poplavljenja. Glivna kolonizacija korenin različnih helofitov je pokazala, da ima večina preiskanih vrst korenine kolonizirane z glivami ter da na stopnjo glivne kolonizacije poplavljenost negativno vpliva. Raziskave vpliva selena na rastline, ki so potekale v sodelovanju z IJS so pokazale, da so nekatere vrste rastlin indikatorji prisotnosti Se ter, da odražajo obremenjenost vodnega okolja s Se. Izkazalo se je, da nekatere vrste privzemajo Se v koncentracijah, ki so primerne za prehrano ljudi. Pri raziskavah skupine so pomembno sodelovali številni diplomanti (154), magistrandi (40) in doktorandi (14). Rezultat naših raziskav v zadnjih 22 letih je 199 znanstvenih člankov, 28 poglavij v monografijah ter uredništvo 2 monografij (Gaberščik 2002 (2003 ponatis), Janauer et al. 2018).

Poleg raziskovalnega dela v skupini opravljamo tudi strokovno delo, ki vključuje spremljanje stanja makrofitov v slovenskih vodah, razvoj metod za vrednotenje ekološkega stanja voda na podlagi makrofitov glede na WFD in kartiranje habitatov.

## Izbrane reference

- Gaberščik, A., 2002. Jezero, ki izginja; monografija o Cerkniškem jezeru. Društvo ekologov Slovenije, Ljubljana, 333 str.
- Grašič, M., Golob, A., Vogel-Mikuš, K., Gaberščik, A., 2019. Severe water deficiency during the mid-vegetative and reproductive phase has little effect on proso millet performance. *Water*, 11, 10, 1-21.
- Janauer, G., Gaberščik, A., Květ, J., Germ, M., Exler, N. (uredniki), 2018. *Macrophytes of the River Danube Basin, (Živá příroda)*, 1st ed. Academia, Praha, 407 str.
- Martinčič, A., Piskernik, M., 1985. Die Hochmoore Sloweniens. *Biološki vestnik*, 1, 1-239.
- Rozema, J., Björn, L.O., Bormann, J.F., Gaberščik, A., Häder, D.-P., Trošst, T., Germ, M., Klisch, M., Gröniger, A., Sinha, R.P., Lebert, M., He, Y.-Y., Buffoni-Hall, R., de Bakker N. V.J., van de Staaij, J., Meijkamp, B.B., 2002. The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems - an experimental and functional analysis of the evolution of UV-absorbing compounds. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 66, 1, 2-12.

### Skupina za ekologijo živali

Skupino za ekologijo živali je po upokojitvi Kazimirja Tarmana in odhodu Stanka Črveka leta 1997 prevzel Ivan Kos. Trenutno v skupini delujejo še asistent Hubert Potočnik, Tomaž Skrbinšek, Aleksandra Majič Skrbinšek, Maja Jelenčič, Marjeta Konec, Astrid Vik Stronen, Irena Kavčič, Elena Pazhenkova, Barbara Boljte, Meta Mavec in Jaka Črtalič. Nadaljevanje raziskovalnega dela iz ekoloških, favnističnih in biogeografskih vsebin povezanih s talnimi plenilci (Chilopoda) smo nadgradili z vključevanjem vsebin povezanih z velikimi sesalci (predvsem zvermi) (Kos et al. 2005, Potočnik et al. 2019). Spoznanje, da tudi (ali pa še bolj) za karizmatične živali velja, da osnovo za varstvo in upravljanje predstavlja dobra znanstvena podpora je bilo osnovno vodilo nadaljnjih aktivnosti. Tako smo s sodelovanjem v širšem krogu evropskih raziskovalcev uspeli delovanje razširiti v treh ključnih smereh, to je poleg klasičnih avtekololoških študij (aktivnost, raba prostora, prehranjevalne interakcije) tudi v uporabo molekularno genetskih metod (varstvena populacijska genetika). Zaradi zavedanja, da je varovanje okolja in narave tudi pomemben družbeni izziv, je pomembna smer aktivnosti povezana področjem družbenih vidikov upravljanja z elementi narave.

Z raziskavami strig (Chilopoda) v gozdnih ekosistemih ugotavljamo pomen horizontalne strukture na vrstno strukturo, kar najverjetneje predstavlja ključen mehanizem za visoko biodiverzitetno živalstva v dinarskih gozdovih (npr. Grgič in Kos 2005). Z intenzivnim proučevanjem združbe talnih plenilcev v pragozdnem ostanku

Krokar želimo pridobiti predstavo o potencialno naravni združbi, ki ni odvisna od različnih načinov upravljanja z gozdom (Kuralt v pripravi). Naslednji sklop raziskav je povezan z daljinskim spremljanjem živali. Začetki so bili s spremljanjem ježev, divje malčke in risa s klasično radiotelemetrijo, kar smo kasneje nadgradili s sodobnejšo GPS-GSM telemetrijo. Poleg spremljanja risov je tudi spremljanje šakalov ključno za ugotavljanje prostorskih zahtev vrste v novo poseljenih območjih (Potočnik et al. 2019). Z razvojem molekularne genetike so se odprle številne možnosti uporabe metodologije v ekologiji. Pogosto uporabljena metoda lova, označevanja in ponovnega ulova za oceno velikosti živalskih populacij je bila za velike sesalce manj primerna, saj je bilo odlavljanje živali zamudno oziroma neizvedljivo. S pomočjo genetske identifikacije, predvsem iz neinvazivnih vzorcev (iztrebki, dlake z mešički, slina, urin) pa lahko razmeroma preprosto ocenimo številčnost, kar v okviru monitoringov izvajamo pri rjavem medvedu, volku in risu (npr. Skrbinšek et al. 2012). Pri varstvu in upravljanju z velikimi zvermi je ključen človek zaradi svojih evolucijskih izhodišč in delovanja družbe. Zato so raziskave družbenega in sociološkega vidika odločilnega pomena za dolgoročno upravljanje z velikimi zvermi (npr. Chapron et al. 2014). Pridobljena nova znanja uporabljamo tudi pri sodelovanju pri pripravi ključnih državnih oziroma evropskih dokumentov kot so strategije in akcijski plani. Večino raziskovalnih in strokovnih aktivnosti izvajamo v okviru evropskih projektov (FP7, Interreg, Life), pri katerih smo vodilni oziroma sodelujoči partner.

### Izbrane reference

- Chapron, G., Jerina, K., Kos, I., Krofel, M., Majič Skrbinšek, A., Potočnik, H., Skrbinšek, T., et al., 2014. Recovery of large carnivores in Europe's modern humandominated landscapes. *Science*, 346, 6216, 1517-1519.
- Grgič, T., Kos, I., 2005. Influence of forest development phase on centipede diversity in managed beech forests in Slovenia. *Biodiversity and Conservation*, 14 (8), 1841-1862.
- Kos, I., Potočnik, H., Skrbinšek, T., Majič Skrbinšek, A., Jonozovič, M., Krofel, M., 2005. Ris v Sloveniji : strokovna izhodišča za varstvo in upravljanje, 2. dopolnjena izd. Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Ljubljana, 271 str.
- Potočnik, H., Pokorny, B., Flajšman, K., Kos, I., 2019. Evrazijski šakal. Lovska zveza Slovenije, Ljubljana, Zlatorogova knjižnica, 42, 248 str.
- Skrbinšek, T., Jelenčič, M., Waits, L., Kos, I., Jerina, K., Trontelj, P., 2012. Monitoring the effective population size of a brown bear (*Ursus arctos*) population using new single sample approaches. *Molecular Ecology*, 21 (4), 862-875.

### Skupina za limnologijo

V 80. letih je raziskovalno skupino prevzel Mihael J. Toman. Sodelovanje na raziskovalnem področju s Kemijskim inštitutom, je po njegovem prihodu na Biotehniško fakulteto, postopno odmiralo. Danes je raziskovalno pomembno sodelovanje z IJS, s skupino, ki jo vodi Milena Horvat.

Raziskave pokrivajo različna področja vezana na ekologijo voda, kroženje snovi v vodnih okoljih in vpliv na organizme (Toman in Dall 1998), delno pa tudi tehnologijo voda. Po sprejetju Okvirne vodne direktive (Water framework directive) so se člani skupine pod vodstvom M. J. Tomana, predvsem Gorazd Urbanič, Mojca Hrovat in nekateri zunanji sodelavci osredotočili na raziskave bentoških življenjskih združb v tekočih vodah, združbe makroinvertebratov (velikih vodnih nevretenčarjev) in obrasti perifitona in priprave metodologije za vrednotenje ekološkega stanja tekočih voda, harmonizirane z direktivami EU. Obdobje večletnih raziskav je prineslo veliko dobrih rezultatov, ki smo jih objavili v odličnih revijah tega področja (Urbanič et al. 2005).

### Izbrane reference

- Toman, M.J., Dall, P.C., 1998. Respiratory levels and adaptations in four freshwater species of *Gammarus* (Crustacea: Amphipoda). *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie*, 83 (3), 251-263.
- Urbanič, G., Toman, M.J., Krušnik, C., 2005. Microhabitat type selection of caddisfly larvae (Insecta: Trichoptera) in a shallow lowland stream. *Hydrobiologia*, 541, 1-12.
- Žižek, S., Horvat, M., Gibičar, D., Fajon, V., Toman, M.J., 2007. Bioaccumulation of mercury in benthic communities of a river ecosystem affected by mercury mining. *Science of the Total Environment*, 377 (2-3), 407-415.
- Zelnik, I., Balanč, T., Toman, M.J., 2018. Diversity and structure of the tychoplankton diatom community in the limnocene spring Zelenci (Slovenia) in relation to environmental factors. *Water*, 10, 4, 1-12.

Istočasno je M. J. Toman pričel z raziskavami kroženja snovi, predvsem metilnega živega srebra v programski skupini Milene Horvat. Pridružila se je tudi sodelavka Suzana Žižek, ki je s svojo doktorsko nalogo prispevala znanja o premeščanju metilnega živega srebra v bentoških združbah od alg do rib v rečnem sistemu Idrijce in Soče. Številne raziskave smo objavili v revijah z visokim faktorjem vpliva (npr.: Žižek et al. 2007). Z raziskavami nadaljujemo še danes, težišče pa je vezano na rečni sistem reke Save po izgradnji rečnih akumulacij s spodnjem toku.

Kasneje se je skupini pridružil Igor Zelnik, ki ga zanimajo predvsem procesi v perifitonskih in tihoplanktonskih združbah, sodeluje pa tudi z drugimi raziskovalci na katedri (Zelnik et al. 2018).

S pridobljenimi znanji uspešno rešujemo strokovna vprašanja, opravljamo monitoring za namene ARSO, ocenjujemo stanje v vodnih telesih po različnih okoljskih nesrečah in prispevamo mnenja in ocene za Ministrstvo za okolje in prostor, druge institucije in individualne uporabnike. M.J. Toman pogosto komentira družbena dogajanja povezana z okoljem, prispeva strokovne ocene v primerih okoljskih nesreč v medijih in tudi na tak način ozavešča širšo družbo o okolju in naravi.

## Katedra za biokemijo

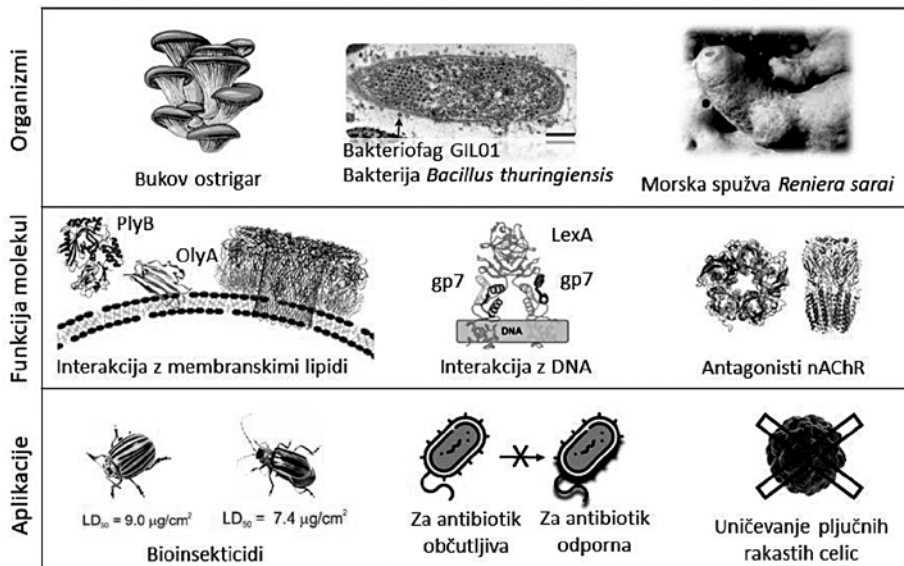
Tom Turk, Matej Butala, Anastasija Panevska, Kristina Sepčič

Začetki katedre za biokemijo sovpadajo s prihodom prof. dr. Draga Lebeza iz Inštituta Jožefa Stefana na Oddelek za biologijo leta 1971. Prof. Lebez je bil mednarodno priznani toksinolog in dolgoletni profesor biokemije na Oddelku za biologijo. Na Univerzi v Ljubljani se je habilitiral kot profesor za biokemijo, ki je bila takrat pri nas dokaj nova znanstvena disciplina. Katedra za biokemijo se je kot samostojna katedra sicer formirala precej pozneje, saj je bila v začetku del skupne Katedre za biokemijo in genetiko, ta pa je imela dve vodji enot: prof. Lebeza za biokemijski in prof. Grabnarja za genetski del katedre. S tem se je »tradicionalnim« biološkim disciplinam na Oddelku za biologijo, pridružila nova razsežnost, preučevanje bioloških procesov na nivoju molekul. Začetki pa so bili zelo skromni, saj je imela biokemija na razpolago le en prostor na hodniku 4. nadstropja Filozofske fakultete, kjer je dolga leta gostovala večina Oddelka za biologijo. Tudi opreme v tistem zasilenem lesenem boksu praktično ni bilo. Pa vendar je katedra rastla. Po nekaj letih je dobila nove prostore v pritličju nekdanjega poslopja Biotehniške fakultete na Krekovem trgu 1, kjer je danes Teološka fakulteta. Laboratoriji biokemijskega in genetskega dela so bili sicer ločeni, vendar so bili še vedno del iste, skupne katedre. Tam je takratna skupina za biokemijo doživela pravi razcvet, čeprav so bili prostori še vedno zelo skromni, opreme pa malo. To so bili časi, ko smo delali z veliko improvizacije, z malo denarja, a z veliko volje. Zato je bilo to, kljub težavam, lepo obdobje, bili smo mladi in polni načrtov. Ob koncu delovanja na Krekovem trgu smo se morali zaradi selitve Biotehniške fakultete pod Rožnik, skupaj z genetiki preseliti nadstropje višje. To je bila za nekatere že druga selitev v razmeroma kratkem času. Spet je bilo treba vse razmontirati in ponovno sestaviti, kar smo, kot vedno, opravili večinoma sami. V teh razmerah se seveda ni dalo normalno delati, saj smo bili praktično v zapuščeni hiši in smo le čakali kdaj bo narejeno vsaj eno krilo v novem Biološkem središču, kamor smo se namenili preseliti. Vaje smo imeli v nezakurjenih prostorih. Lahko bi rekli, da če si takrat potreboval poskusno žival,

si jo lahko počakal kar na hodniku, saj so se po njih veselo podile podgane. V novo, a skoraj popolnoma nedograjeno stavbo Biološkega središča, smo se vselili leta 1993, kjer smo tudi skoraj 30 let kasneje. Tako smo se spet znašli na gradbišču, v nove prostore smo tako hodili kar po zidarskih lestvah. Dobro leto kasneje je bil zahodni del stavbe v celoti končan in življenje se je počasi normaliziralo. To je bil tudi čas, ko se je Katedra za biokemijo in genetiko razdelila na dve katedri – Katedro za biokemijo in Katedro za Genetiko. Prvi predstojnik samostojne katedre je takrat postal prof. dr. Peter Maček. Prišli so boljši časi, katedra se je kadrovsko in materialno zelo okrepila, s prihodom mlajših sodelavcev, prof. dr. Sepčičeve in prof. dr. Anderluha (ki je danes direktor KI), pa so se širile tudi teme naših raziskav. V vseh teh letih so na naši katedri diplomirali številni študenti biologije, mikrobiologije, biotehnologije in pedagoških programov. Na katedri so se usposabljali mnogi mladi raziskovalci, ki so kasneje magistrirali ali doktorirali. Pri nas so gostovali tudi tuji študenti in raziskovalni sodelavci. Veseli smo, da so bili vse te kolegice in kolegi z nami in so pripomogli k razvoju in napredku naše katedre, pa tudi to, da so se pri nas dobro počutili in jim je bilo kar malo žal, ko so nas morali zapustiti. Kljub nekaterim pomembnim, tudi državnim nagradam, ki so jih prejeli člani katedre, pa smo vedno najbolj počaščeni, ko študenti pohvalijo naše pedagoško delo. Tega smo res iskreno veseli in lepšega plačila za naše delo si ne bi mogli želeli.

Raziskovalno delo na Katedri za biokemijo je od samih začetkov primarno usmerjeno v proučevanje zgradbe in funkcije molekul, predvsem beljakovin, ki se vežejo z različnimi receptorji v bioloških membranah. Interakcije molekul z membranami lahko vodijo v preoblikovanje membran in tvorbo transmembranskih por, ter povzročajo sprožitev različnih signalnih poti, kar ponuja številne možnosti za potencialno uporabo membransko aktivnih molekul v biomedicini, farmaciji, kmetijstvu in drugje.

Tehnike, ki jih uporabljamo pri delu, spadajo v niz biokemijskih preparativnih in analitskih metod ter molekularno-bioloških metod. Pripravljamo in



**Slika 5:** Raziskovalno delo na Katedri za biokemijo je usmerjeno v proučevanje molekul, ki izvirajo iz gliv, bakterij, bakteriofagov in morskih spužev in imajo različne funkcije ter se lahko uporabijo v različne medicinske in biotehnoške namene.

**Figure 5:** Research work at the Chair for biochemistry is focused on molecules from fungi, bacteria, bacteriophages and marine sponges that have different functions and applications in medicine and biotechnology.

preučujemo lastnosti modelnih lipidnih sistemov, kot so umetni lipidni vezikli različnih velikosti, lipidne kapljice in Langmuirovi lipidni monosloji. Pridobivamo tudi rekombinantne proteine iz bakterijskih ekspresijskih sevov. V okviru katedre deluje Infrastrukturni center za raziskave molekularskih interakcij, v katerem s pomočjo površinske plazmonske resonance preučujemo kinetiko in interakcije molekul z lipidnimi membranami in drugimi ligandi (proteini, nukleinskimi kislinami, manjšimi molekulami).

V zadnjih 20 letih se pretežno posvečamo proučevanju proteinov iz družine egerolizinov, ki so prisotni predvsem v glivah in bakterijah in katerih skupna lastnost je interakcija s specifičnimi membranskimi lipidi in lipidnimi domenami. Nekateri glavni egerolizinski proteini se specifično vežejo z membranskimi domenami, ki vsebujejo veliko sfingomielina in holesterola (lipidni rafti), in tako predstavljajo obetavno orodje za označevanje teh biološko pomembnih področij celične membrane (Skočaj et al. 2014). Drugi glavni egerolizini specifično reagirajo s

ceramid fosfoetanolaminom, najbolj zastopanim sfingolipidom v membranah nevretčenčarjev, ter v kombinaciji s partnerskim proteinom tvorijo pore v membranah celic, ki vsebujejo to lipidno tarčo. To je tudi razlog za njihovo selektivno toksičnost proti nekaterim ekonomsko pomembnim rastlinskim škodljivcem (koloradski in koruzni hrošč) in predstavlja odlično osnovo za razvoj okolju prijaznih bioinsekticidov (Panevska et al. 2019).

Raziskujemo tudi molekularne mehanizme, s katerimi proteini uravnavajo prepis genov v bakterijah. Razvijamo metodo, ki nam bo omogočila prepoznavo zastopnosti in dinamiko vezave proteinov na nekaj 1000 baznih parov dolgih odsekih DNA direktno v bakteriji. Preučujemo tudi interakcijo bakteriofaga (faga) GIL01 z bakterijo *Bacillus thuringiensis*. Pojasnili smo, da mala proteina faga delujeta kot genetsko stikalo, ki omogočita preklon iz cikla, ko se genom faga pasivno podvaja z genomom bakterije, v cikel sinteze novih virusov (Fornelos et al., 2018, Caveney et al. 2019). Slednja proteina vplivata tudi na odziv bakterije na stresne razmere v okolju,

zato spoznanja omogočajo razvoj učinkovin, s katerimi bi lahko, podobno kot GIL01, nadzorovali procese v določeni bakteriji.

Danes je le manjši del raziskav na katedri za biokemijo še namenjen raziskavam naravnih učinkovin iz morskih organizmov. Predvsem nas zanima delovanje polimernih alkilpiridinijevih spojin, ki jih najdemo v nekaterih spužvah. Te spojine imajo številne biološke učinke, med drugim delujejo kot protivegetativne snovi, v celicah so uporabne kot transfekcijska sredstva, ker lahko inducirajo prehodne pore, inhibirajo acetilholinesterazo, predvsem pa se vežejo na

nekatero nikotinske acetilholinske receptorje in nanje delujejo kot inhibitorji oziroma antagonisti. Ker se specifično vežejo predvsem na  $\alpha 7$  nAChR podtip, to pa so receptorji, ki se prekomerno izražajo v nekaterih rakastih celicah, bi z njihovo uporabo lahko zavrli prekomerno proliferacijo in nesmrtnost takih celic. To smo v naših raziskavah že delno dokazali, saj uporaba alkilpiridinijevih sintetičnih analogov, v rakastih celicah pljučnega adenokarcinoma sproži apoptozo in je zanje citotoksična, medtem ko nima vpliva na zdrave celice, ki ne izražajo tega podtipa nAChR (Berne et al. 2018).

### Izbrane reference

- Berne, S., Čemažar, M., Frangež, R., Juntos, P., Kranjc, S., Grandič, M., Savarin, M. Turk, T., 2018. APS8 delays tumor growth in mice by inducing apoptosis of lung adenocarcinoma cells expressing high number of  $\alpha 7$  nicotinic receptors. *Marine Drugs*, 16, 367, 10.3390/md16100367.
- Caveney, N.A., Pavlin, A., Caballero, G., Bahun, M., Hodnik, V., de Castro, L., Fornelos, N., Butala, M., Strynadka, N.C.J., 2019. Structural insights into bacteriophage GIL01 gp7 inhibition of host LexA repressor. *Structure*, 2, 27 (7), 1094-1102.
- Fornelos, N., Browning, D.F., Pavlin, A., Podlesek, Z., Hodnik, V., Salas, M., Butala, M., 2018. Lytic gene expression in the temperate bacteriophage GIL01 is activated by a phage-encoded LexA homologue. *Nucleic Acids Research*, 12, 46(18), 9432-9443.
- Panevska, A., et al., 2019. Pore-forming protein complexes from *Pleurotus* mushrooms kill western corn rootworm and Colorado potato beetle through targeting membrane ceramide phosphoethanolamine. *Scientific Reports*, 25, 5073.
- Skočaj, M., et al., 2014. Tracking cholesterol/ sphingomyelin-rich membrane domains with the ostreolysin A-mCherry protein. *PLoS ONE* 9, e92783.

## Katedra za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov

Darja Žgur Bertok, Uroš Petrovič, Nina Gunde Cimerman

Prvi in dolgoletni predstojnik katedre je bil prof. dr. Miklavž Grabnar. Njegova študijska in raziskovalna pot je bila ključna za ustanovitev katedre, kakor tudi razvoja področja molekularne genetike oziroma molekularne biologije, tako na Oddelku za biologijo BF, kot v širšem prostoru. Prof. Grabnar je študiral biologijo na Naravoslovni fakulteti Univerze v Ljubljani, doktoriral na John Hopkins University, Baltimore, ZDA, ter se podoktorsko usposabljal na University of California, Berkeley, ZDA. Po vrnitvi v Slovenijo se je leta 1971 zaposlil na Biotehniški fakulteti, Oddelku za biologijo, kjer je ostal do svoje upokojitve. Profesor Grabnar je predaval predmet Molekularna

genetika študentom Biotehniške in Medicinske fakultete. Njegova skupina je bila sprva del Katedre za fiziologijo rastlin in genetiko, v zelo skromnih prostorih na Filozofski fakulteti na Aškerčevi 2. Leta 1979 sta se skupini za Molekularno genetiko in za Biokemijo preselili v za laboratorije primernejše prostore na Krekovem trgu 1 in se združili v Katedro za biokemijo in genetiko.

Pomembna prelomnica je bil v letu 1981 izveden mednarodni tečaj z laboratorijskim delom iz Molekularne biologije in tehnologij rekombinantne DNA, ki je potekal v prostorih katedre na Krekovem trgu. Tečaj je organiziral prof. Grabnar v sodelovanju s prof. dr. Duškom



Slika / Figure 6: Prof. dr. Miklavž Grabnar.

Ehrlichom, INRA, Francija. Sodelovali so vsi člani tedanje genetske skupine in po tečaju pričeli med prvimi v Sloveniji uvajati molekularno biološke metode v svoje pedagoško in raziskovalno delo s področja genetike bakterij.

Leta 1989 se je takratni Katedri za molekularno genetiko pridružil prof. dr. Miha Janc, pred tem zaposlen na Veterinarski fakulteti oziroma na Inštitutu za mikrobiologijo Medicinske fakultete. Kmalu zatem, leta 1990, je sledila še ena selitev, tokrat v Biološko središče na Večni poti 111 in s tem pridružitve ter tesnejše povezovanje z ostalimi katedrami Oddelka za biologijo BF. Profesorja Grabnar in Janc sta bila člana skupine matičarjev za pripravo študija Mikrobiologije na Biotehniški fakulteti UL, ki se je pričel izvajati leta 1993.

S prihodom prof. Janca se je na Oddelku za biologijo vzpostavilo tudi področje mikrobiologije. Prof. Janc je prevzel predavanja iz predmeta Mikrobiologija in pričel z raziskavami na področju klinične mikrobiologije in epidemiologije. Leta 2000 je katedro zapustila asistentka dr. Maja Rupnik, ki se je kasneje zaposlila v Nacionalnem laboratoriju za zdravje, okolje in hrano (NLZOH), Maribor. Po prihodu profesorja Janca se je katedra preimenovala v Katedro za molekularno genetiko in mikrobiologijo. Prof. Janc se je 1999 leta upokojil, mikrobiološki del katedre pa je takrat prevzela prof. dr. Nina Gunde – Cimerman, ki je prišla s Kemijskega inštituta, Oddelka za biotehnologijo in industrijsko mikologijo. Genetskemu delu katedre se je leta 2016 pridružil prof. dr. Uroš Petrovič, ki je prišel z Inštituta »Jožef Stefan«.

Po upokojitvi prof. Grabnarja je bila od leta 2009 do 2018 predstojnica katedre prof. dr. Darja Žgur Bertok, 2019 je prevzela vodenje katedre prof. dr. Nina Gunde – Cimerman, prof. dr. Uroš

Petrovič pa je prevzel vodenje genetske raziskovalne skupine.

Trenutni (2020) člani katedre na učiteljskih mestih so prof. dr. Nina Gunde – Cimerman, prof. dr. Uroš Petrovič, doc. dr. Jerneja Ambrožič Avguštin, asistenti pa doc. dr. Polona Zalar, doc. dr. Martina Turk, doc. dr. Cene Gostinčar, prof. dr. Marjanca Starčič – Erjavec, doc. dr. Matej Skočaj, asist. dr. Kristina Marton, raziskovalca dr. Monika Novak Babič in dr. Zdravko Podlesek, in tehniške sodelavke Barbara Kastelic – Bokal, Iva Lipovšek in Mojca Matul.

Člani katedre sodelujejo pri izvajanju naslednjih predmetov na študijih 1. in 2. stopnje (stanje 2019/2020): Mikrobiologija, Mikrobiologija – praktikum, Genetika, Uporabnost znanj genetike, Mikologija (1. st. Biologija, BF), Molekularna biologija, Mikrobna genetika, Mikrob in patogenez, Mikrobna raznolikost in identifikacija – evkarionti, Mikologija, Industrijska mikrobiologija (1. st. Mikrobiologija, BF), Mikrobiologija, Funkcijska genomika (1. st. Biokemija, FKKT), Mikrobna ekologija (2. st. Ekologija in diverzitet, BF), Genetika evkariontov, Molekulska biologija genov, Genomika in proteomika (2. st. Molekulska in funkcionalna biologija, deloma tudi 2. st. Biološko izobraževanje, BF), Molekularna mikrobiologija, Mikrobiologija ekstremnih okolij (2. st. Mikrobiologija), Mikroskopija – praktikum (2. st. Restavratorstvo, ALUO). Na doktorskem študiju sodelujemo v programih Bioznanosti in Biomedicina. Pedagoško sodelujemo tudi pri izobraževanju učiteljev in v projektih delih z gospodarstvom in negospodarstvom, ki so namenjena vzpostavitvi medsebojnega sodelovanja ter seznanitvi študentov z delom v gospodarstvu.

#### *Raziskovalna skupina za molekularno genetiko*

Raziskovalno delo skupine za molekularno genetiko poteka v okviru raziskovalnega programa Molekularno biološke raziskave mikroorganizmov, v zadnjih letih pa delno tudi znotraj programa Toksini in biomembrane. Raziskovalno delo skupine poteka s formalnimi in neformalnimi mednarodnimi sodelovanji, prav tako pa se v luči potrebe po interdisciplinarnosti vedno bolj povezuje in prepleta z raziskovalnim delom sorodnih raziskovalnih skupin na Oddelku za

biologijo BF in na drugih slovenskih raziskovalnih inštitucijah.

Pionirske molekularno genetske raziskave v Sloveniji profesorja Miklavža Grabnarja so bile osredotočene na bakteriofage enterobakterij ter operona bakterije *Salmonella typhimurium* za sintezo aminokislina prolin. Tem so sledile raziskave sinteze antibiotika bacitracin bakterije *Bacillus subtilis* in odpornosti proti njemu. Veja raziskav odpornosti proti protimikrobnim učinkovinam, ki se je v skupini za molekularno genetiko tudi na temeljih novih eksperimentalnih tehnik razvila v več poganjkov, je zelo aktualna še danes, saj je odpornost bakterij proti antibiotikom ena najhujših groženj zdravju ljudi v svetovnem merilu. Poleg medicinsko pomembnih bakterij pa v skupini potekajo intenzivne raziskave tudi veterinarsko pomembnih patogenih bakterij. Raziskave odpornosti patogenih mikroorganizmov proti protimikrobnim učinkovinam je skupina nedavno razširila tudi na področje patogenih kvasovk. Slednje se navezuje tudi na raziskovalno delo na kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* kot modelnem evkariontskem organizmu, ki na katedri poteka zadnjih pet let.

Osrednji modelni organizem za raziskave skupine za molekularno genetiko je bakterija *Escherichia coli*. Ta vrsta, ki je najverjetneje najboljše raziskana bakterija, je komezal prebavnega trakta ljudi, vendar pa nekateri sevi *E. coli* z geni za virulentne dejavnike povzročajo črevesne in izven-črevesne okužbe, tudi s težkim potekom. *E. coli* je pomemben indikator tudi za nadzor odpornosti proti antibiotikom in zato tudi v skupini za molekularno genetiko potekajo raziskave genomov ter odpornosti proti antibiotikom bakterije *E. coli* in drugih enterobakterij, izoliranih iz ljudi, živali in okolja. Predmet raziskav skupine so tudi kolicini, torej bakteriocini *E. coli*, ki so vpleteni v tekmovanje in nadzor bakterijskih populacij v kompleksnih ekoloških nišah, na primer v prebavnem traktu. Raziskave uravnavanja sinteze kolicinov po eni strani razkrivajo zapletene mehanizme prepletov molekularnih procesov v bakterijski celici,

po drugi strani pa lahko raziskave kolicinskih genov vodijo tudi k raziskavam uporabe kolicinov kot alternativne protimikrobne učinkovine. Le-to se lahko, poleg načina z izoliranim kolicinom, izvaja z znotrajceličnem delovanjem kolicina po konjugativnem prenosu gena za kolicin v tarčno bakterijo.

Toksini komezalnih bakterij lahko poškodujejo genom gostitelja in izzovejo tumorigenozo. Raziskave skupine razkrivajo zapise za genotoksine v genomih sevov *E. coli*. Primer le-tega je bakteriocinu podoben genotoksin Usp, katerega gen je lociran na relativno majhnem genomskem otoku in ima zapletene mehanizme uravnavanje sinteze. Genotoksin *E. coli* kolibaktin pa je zapisan v drugem genomskem otoku, skupaj z genom clbS. Zanimivo je, da protein ClbS z več mehanizmi ščiti producenta pred delovanjem kolibaktina, tudi fizično z vezavo DNA, vendar z zaenkrat še neznanim molekularnim mehanizmom.

Sinteza kolicinov je uravnavana z represorjem LexA, ki uravnava tudi odziv SOS za popraviljanje poškodb DNA bakterij. Raziskave skupine so bile še posebej osredotočene na molekularni mehanizem vezave proteina LexA na DNA. Sistem SOS ima širšo vlogo tudi pri horizontalnih prenosih DNA, izražanju genov toksinov, razvoju odpornosti, perzistence in tolerance na antibiotike, posledično je lahko tarča za nove protimikrobne učinkovine.

Hiter razvoj na področju molekularne biologije v zadnjih dveh desetletjih je omogočil razširitev raziskav skupine za molekularno genetiko s posamičnih organizmov na mikrobne združbe. Raziskovalci skupine so tako vključeni v metagenomske raziskave, ki začenjajo razkrivati skrivnosti mikrobnih združb od ekstremnih okolij do prebavnega trakta nosečnic. V slednjem primeru potekajo raziskave o vplivu dejavnikov na sestavo mikrobnih združb, ki se na predhodne raziskave skupine navezujejo preko hipoteze, da bi specifični sevi bakterije *E. coli* lahko bili indikator disbioze pri določenih bolezenskih stanjih.

### Izbrane reference

- Ball, W.B., Baker, C.D., Neff, J.K., Apfel, G.L., Lagerborg, K.A., Žun, G., Petrovič, U., Jain, M., Gohil, V.M., 2018. Ethanolamine Ameliorates Mitochondrial Dysfunction in Cardiolipin-Deficient Yeast Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 293, 10870.



- Godec, P., Pančur, M., Ilenič, N., Čopar, A., Stražar, M., Erjavec, A., Pretnar, A., Demšar, J., Starič, A., Toplak, M., Žagar, L., Hartman, J., Wang, H., Bellazzi, R., Petrovič, U., Garagna, S., Zuccotti, M., Park, D., Shaulsky, D., Zupan, B., 2019. Democratized Image Analytics by Visual Programming Through Integration of Deep Models and Small-Scale Machine Learning. *Nature Communications*, 10, 4551.
- Kamenšek, S., Browning, D.F., Podlessek, Z., Busby, S.J.W., Žgur-Bertok, D., Butala, M., 2015. Silencing of DNase colicin E8 gene expression by a complex nucleoprotein assembly ensures timely colicin induction. *PLoS Genetics*, 11, 1.
- Kogovšek, P., Ambrožič, J., Dovč, A., Dreo, T., Hristov, H., Krapež, U., Ravnikar, M., Slavec, B., Lotrič, M., Žel, J., Zorman-Rojs, O. 2018. Loop-mediated isothermal amplification : rapid molecular detection of virulence genes associated with avian pathogenic *Escherichia coli* in poultry. *Poultry Science*, 98, 1500.
- Kuznetsova, M.V., Gizaizatullina, J., Nesterova, L. J., Starčič Erjavec, M., 2020. *Escherichia coli* isolated from cases of colibacillosis in Russian poultry farms (Perm Krai): sensitivity to antibiotics and bacteriocins. *Microorganisms*, 8, 1.
- Mogrovejo, D.C., Perini, L., Gostinčar, C., Sepčič, K., Turk, M., Ambrožič, J., Brill, F.H.H., Gunde-Cimerman, N., 2020. Prevalence of antimicrobial resistance and hemolytic phenotypes in culturable Arctic bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 570, 1.
- Molan, K., Podlessek, Z., Hodnik, V., Butala, M., Oswald, E., Žgur Bertok, D., 2019. The *Escherichia coli* colibactin resistance protein ClbS is a novel DNA binding protein that protects DNA from nucleolytic degradation. *DNA Repair*, 79, 50.
- Rihtar, E., Žgur Bertok, D., Podlessek, Z., 2020. The uropathogenic specific protein gene *usp* from *Escherichia coli* and *Salmonella bongori* is a novel member of the TyrR and H-NS regulons. *Microorganisms*, 8, 1.
- Zorman-Rojs, O., Zdovc, I., Dovč, A., Žgajnar, J., Slavec, B., Krapež, U., Ambrožič, J., 2019. Presence and distribution of extended-spectrum and AmpC beta-lactamases-producing *Escherichia coli* on poultry farms in Slovenia. *The Journal of Applied Poultry Research*, 28, 200.
- Železni Ramuta, T., Starčič Erjavec, M., Erdani-Kreft, M. 2020. Amniotic membrane preparation crucially affects its broad-spectrum activity against uropathogenic bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1.

#### Raziskovalna skupina za biologijo mikroorganizmov

Raziskovalno delo skupine za Biologijo mikroorganizmov delno poteka v okviru raziskovalnega programa MF UL Molekulski mehanizmi uravnavanja celičnih procesov v povezavi z nekaterimi boleznimi pri človeku in v okviru IC Mycosmo. Raziskovalna skupina ima vzpostavljena mnoga interdisciplinarna mednarodna sodelovanja, sodeluje pa tudi z raziskovalnimi skupinami na Oddelku za biologijo in drugimi oddelki BF in različnimi slovenskimi raziskovalnimi institucijami.

Raziskovalno delo Katedre za molekularno genetiko se je s pridružitvijo prof. Janca leta 1989 razširilo na področje mikrobioloških raziskav, katedra pa se je preimenovala v Katedro za molekularno genetiko in mikrobiologijo. Prof. Janc

je vpeljal klinične in epidemiološke raziskave. Osredotočil se je na bakterijo *Escherichia coli* in sposobnost sinteze hemolizinov in na bakterije rodu *Salmonella* v povezavi s prašičjo gripo. Pričel je z rutinsko diagnostiko za določevanje bakterij rodu *Campylobacter* in različnih anaerobnih bakterij ter sodeloval pri postavitvi anaerobnih laboratorijev na BF, VF in MF UL. Uvedel je imunofluorescentne metode za detekcijo povzročitelja stekline in se skupaj z asistentko Majo Rupnik poglobil v diagnostiko in virulentne dejavnike bakterije *Clostridium difficile*.

Po upokojitvi prof. Janca in prihodu prof. Gunde-Cimerman v skupino (1999) se je težišče raziskovalnega dela premaknilo na glive v ekstremnih okoljih in se osredotočilo zlasti na njihove interakcije z okoljem, molekularne prilagoditve na ekstreme razmere, biotehnoško uporabnost in oportuno patogenost. Te raziskave so nekaj

časa potekale znotraj nove Katedre za biologijo mikroorganizmov, kmalu pa, tokrat organizirane v Raziskovalno skupino za biologijo mikroorganizmov, spet kot del enotne Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov. Raziskave ekstremofilov so se začele z odkritjem slanljubnih gliv v Sečoveljskih solinah, kasneje pa še v drugih solinah po svetu. Za identifikacijo gliv so v skupini uvedli molekularne metode, ki so se takrat v mikologiji šele začele uporabljati. Molekularne prilagoditve na življenje v izjemno slanem okolju so skupaj s sodelavci z Inštituta za biokemijo MF preučevali na ekstremofilnih črnih kvasovkah, zlasti na črni kvasovki *Hortaea werneckii*, ki lahko raste brez soli pa vse do nasičenja s soljo (več kot 30% NaCl) in na halotolerantni črni kvasovki *Aureobasidium pullulans*. Obe glivi sta postali uveljavljena modelna organizma za halofilne raziskave evkariontov.

Raziskave gliv v ekstremnih okoljih so kasneje razširili na ledenike na Arktiki in kot prvi na svetu opisali populacije gliv v ledeniškem subglacialnem ledu in v črnem ledu grenlandskega ledenega pokrova. Seznam ekstremnih okolij, ki jih naseljujejo glive, so razširili še na človeška domovanja, zlasti na gospodinjske naprave. Pogoji v pomivalnih in pralnih strojih so namreč ekstremni: temperatura med 40-60 °C, alkalen pH, strižne sile in oksidativni stres. Pri teh pogojih se selektivno namnožijo le izbrane oportuno patogene glive, med katerimi je najpomembnejša nevtrotopna črna kvasovka *Exophiala dermatitidis*, ki povzroča okužbe možgan. Članek o tem odkritju se je viralno razširil in dosegel več kot 500 milijonov ljudi po celem svetu. Raziskovalna skupina se ukvarja tudi z mikroorganizmi, ki naseljujejo in potencialno uničujejo objekte kulturne dediščine, od oljnih slik,

fresk, do kipov in grobnic, ter skupaj z restavratorji sodeluje pri njihovi sanaciji.

V okviru raziskovalne skupine deluje Infrastrukturni center Mycosmo, ki opravlja štiri med seboj povezane osnovne dejavnosti: 1. shranjevanje izoliranih in identificiranih mikroorganizmov v genski banki Ex, ki obsega največjo zbirko ekstremofilnih gliv na svetu (15.000 sevov gliv, 5.000 sevov bakterij); 2. temeljne in aplikativne mikološke storitve in raziskave, v okviru katerih sodeluje s slovensko in tujo industrijo in različnimi javnimi ustanovami; 3. molekularne raziskave adaptacij na ekstremne pogoje, s poudarkom na biotehnoškem potencialu in virulentnih dejavnikih; 4. preučevanje genomov ekstremofilnih gliv in razširjanje podatkov ter znanja. V letu 2010 je IC Mycosmo kot prvi v Sloveniji določil genomsko zaporedje evkariontskega organizma. V nadaljevanju je kot vodilna organizacija sodeloval pri določanju genomskega zaporedja še petih drugih ekstremofilnih gliv. To delo se nadaljuje v sodelovanju z enim od največjih centrov za sekvenciranje na svetu, kitajskim inštitutom BGI, z določevanjem več kot 200 genomov gliv iz ekstremnih okolij in s sekvenciranjem genoma človeške ribice *Proteus anguinus*, ki je trenutno največji sekvenciran živalski genom. Genomske raziskave nadgrajujejo z bioinformatičnimi analizami izbranih genov povezanih z ekstremotoleranco in z analizami populacijske genomike. Vse genomske in transkriptomske podatke, pa tudi podatke o kulturah ekstremofilnih gliv in bakterij v genski banki Ex javno sproti objavljajo in jih s tem dajejo na razpolago znanstveni skupnosti, s čimer so slovenske raziskave ekstremofilnih gliv in Infrastrukturni center Mycosmo deležni vse večje prepoznavnosti tudi v svetovnem merilu.

### Izbrane reference

- Butinar, L., Spencer-Martins, I., Gunde-Cimerman, N., 2007. Yeasts in high Arctic Glaciers : the discovery of a new habitat for eukaryotic microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek : International Journal of General and Molecular Microbiology*, 91 (3), 277-289.
- Gostinčar, C., Zajc, J., Lenassi, M., Plemenitaš, A., de Hoog, S., Al-Hatmi, A., Gunde-Cimerman, N., 2018. Fungi between extremotolerance and opportunistic pathogenicity on humans. *Fungal Diversity*, 93 (1), 195-213.
- Gostinčar, C., Turk, M., Zajc, J., Gunde-Cimerman, N., 2019. Fifty *Aureobasidium pullulans* genomes reveal a recombining polyextremotolerant generalist. *Environmental Microbiology*, 21 (10), 3638-3652.
- Gunde-Cimerman, N., Zalar, P., de Hoog, S., Plemenitaš, A., 2000. Hypersaline waters in salterns: natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microbiology Ecology*, 32 (3), 235-240.

- Lenassi, M., Gostinčar, C., Jackman, S., Turk, M., Sadowski, I., Nislow, C., Gunde-Cimerman, N., Plemenitaš, A., et al., 2013. Whole genome duplication and enrichment of metal cation transporters revealed by de novo genome sequencing of extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii*. *Plos One*, 8, 8.
- Perini, L., Gostinčar, C., Anesio, A., Williamson, C., Tranter, M., Gunde-Cimerman, N., 2019. Darkening of the Greenland ice sheet: fungal abundance and diversity are associated with algal bloom. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1-14.
- Rupnik, M., Braun, V., Soehn, F., Janc, M., Hofstetter, M., Laufenberg-Feldmann, R., von Eichel-Streiber, C., 1997. Characterization of polymorphism in the toxin a and b genes of *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiology Letters*, 148, 197-202.
- Zajc, J., Liu, Y., Dai, W., Yang, Z., Hu, J., Gostinčar, C., Gunde-Cimerman, N., 2013. Genome and transcriptome sequencing of the halophilic fungus *Wallemia ichthyophaga*: haloadaptations present and absent. *BMC Genomics*, 14, 617.
- Zalar, P., de Hoog, S. Schroers, H. J., Frank, J. M., Gunde-Cimerman, N., 2005. Taxonomy and phylogeny of the xerophilic genus *Wallemia* (Wallemiomycetes and Wallemiales, cl. et ord. nov.). *Antonie van Leeuwenhoek : International Journal of General and Molecular Microbiology*, 87, 311-328.
- Zalar, P., Novak Babič, M., de Hoog, S., Gunde-Cimerman, N., 2011. Dishwashers - a man-made ecological niche accommodating human opportunistic fungal pathogens. *Fungal Biology*, 115 (10), 997-1007.

## Skupina za biološko izobraževanje

Iztok Tomažič

Biološka didaktika se je kot ena izmed specialnih didaktik v slovenskem prostoru pričela intenzivneje razvijati leta 1964. Tega leta so na takratnem Zavodu za šolstvo, ki ga je vodil Brane Vesel, med učitelji izvedli anketo o poučevanju bioloških vsebin. Rezultati ankete so bili podlaga za uvajanje sprememb na področju biološkega izobraževanja, predvsem na srednjih šolah. Skoraj desetletje je preteklo, preden je izšel tudi prevod t. i. Modre knjige („Od molekule do človeka“, 1974), katere urednik je bil botanik Franc Sušnik. S spreminjanjem srednješolskega izobraževanja pa se je pojavila tudi potreba po ustanovitvi skupine za specialno didaktiko. Vodenje te skupine je prevzel Brane Vesel. Leta 1974 se je katedri priključila Tatjana Verčkovnik, leto kasneje Rudi Ocepek, nekaj let za njim pa tudi Dušan Vrščaj. Vsi so se v večji meri ukvarjali z izobraževanjem osnovnošolskih in srednješolskih učiteljev ter pripravo učnih gradiv za omenjena nivoja šolanja. Veliko truda in energije so vložili v pripravo seminarjev za učitelje, v sklopu katerih so spodbujali izkustveno učenje v želji, da bi učitelji učencem približali naravo/biologijo na čim bolj konkreten način in s tem gradili na znanju, spretnostih in stališčih učencev in dijakov. Pri teh aktivnostih se jim je

leta 1985 pridružila Jelka Strgar. Velik zalogaj je predstavljala prenova osnovne šole, ki se je odvila v že samostojni Sloveniji. Rezultat tega dela sta bila leta 1998 prenovljena učna načrta Naravoslovje in Biologija. V vseh letih od ustanovitve katedre so bili njeni člani aktivni predvsem pri strokovnih objavah na področju biološke didaktike. Leta 2008 je vodenje Skupine za biološko izobraževanje za kratek čas prevzela Barbara Vilhar. Od leta 2013 pa Skupino za biološko izobraževanje in drugostopenjski študijski program Biološko izobraževanje vodi Iztok Tomažič.

Člani skupine za biološko izobraževanje trenutno sodelujejo v študijskih programih Biotehniške, Pedagoške, Filozofske in Zdravstvene fakultete. Na Biotehniški fakulteti je akreditiran drugostopenjski študijski program Biološko izobraževanje (<http://www.bf.uni-lj.si/dekanat/studijski-programi/2-bolonjska-stopnja-magistrski-studiji/biološko-izobraževanje/>). Razpisan je vsako drugo leto. Ta študijski program je edini študijski program v Sloveniji, ki je namenjen usposabljanju bodočih učiteljev biologije v gimnazijskih programih. V študijskem letu 2019/2020 je bila na Biotehniški fakulteti v prvi letnik prenovljenega programa Biološko izobraževanje vpisana tretja generacija



**Slika 7:** Priprava študentov na poučevanje bioloških vsebin (a) in nastop na delavnici (b).

**Figure 7:** Preparation of students for biology teaching (a) and workshop performance (b).

študentov. Vpis študentov v ta študijski program se je od prvega do tretjega razpisa skoraj podvojil.

Velik poudarek v omenjenem študijskem programu je namenjen pripravi bodočih učiteljev, da v pouk biologije vključujejo izkustveno in raziskovalno učenje ter uporabljajo metode poučevanja, ki pozitivno vplivajo tako na znanje, spretnosti in stališča učencev in dijakov (slika 7).

V programu se študente usposablja tudi za pedagoško delo v izvenšolskih učnih ustanovah, na primer v živalskih vrtovih in botaničnih vrtovih ter muzejih. Ustrezna biološka in pedagoška izobrazba diplomantom tega študijskega programa med drugim omogoča tudi zaposlitev v založbah, ki izdajajo učbenike, priručnike, poljudnoznanstvene revije in drugo strokovno literaturo.

Člani skupine za biološko izobraževanje sodelujejo pri pripravi gradiv za nacionalno preverjanje znanja iz biologije, prenovah učnih načrtov osnovnih in srednjih šol, organizaciji in izvedbi naravoslovnih tekmovanj (Kresnička, EUSO, IJSO), pisanju in urednikovanju učbenikov in drugih učnih gradiv. Kot člani predmetnih skupin Zavoda RS za šolstvo se člani skupine aktivno vključujejo v permanentno izobraževanje osnovnošolskih in srednješolskih učiteljev. Poleg izobraževanja bodočih učiteljev imajo člani skupine skozi strokovno delo možnost prenosa novosti s področja biološkega izobraževanja v šolsko

prakso. V zadnjem desetletju pa sodelujejo tudi pri raznih naravovarstvenih projektih z namenom ugotavljanja učinka prenosa znanstvenih spoznanj v pouk biologije in naravoslovja.

Znanstveno se člani skupine ukvarjajo predvsem z raziskovanjem znanja učencev in dijakov v povezavi z abstraktnimi biološkimi vsebinami (Gobec in Strgar 2019), stališči in predsodki učencev do organizmov in drugih bioloških in družbeno – znanstvenih tem (Oražem in Tomažič 2018, Randler et al. 2020, Tomažič 2017), učinki različnih načinov poučevanja na znanje, stališča in spretnosti učencev in dijakov (Oražem et al. 2019, Tomažič et al. 2018), analizami dosežkov učencev na nacionalnem preverjanju znanja (Strgar 2018), pa tudi z drugimi temami, ki so povezane z biološkim izobraževanjem (Tomažič in Randler 2018). Ključne ugotovitve omenjenih raziskav so, da poučevanje, ki temelji na pridobivanju neposrednih izkušenj z organizmi pa tudi raziskovalni pouk pozitivno vplivata ne le na znanje učečih, temveč imata bolj kot tradicionalni pouk (frontalni pouk), pozitivne učinke na stališča do tem učenja in na stališča do naravoslovja in naravoslovnega raziskovanja. Predvsem neposredne izkušnje so tiste, ki omogočajo celosten pouk biologije, ki ne upošteva le znanja učečih, temveč tudi že omenjena stališča in naravoslovne spretnosti in veščine.

### Izbrane reference

- Gobec, K., Strgar, J., 2019. Agricultural students' knowledge of photosynthesis and the contextual factors that influence it. *Journal of Baltic Science Education*, 18 (1), 6-18.
- Oražem, V., Tomažič, I., 2018. The vocational upper secondary schools students' knowledge and their attitudes toward wolves. *Journal of Baltic Science Education*, 17 (6), 918-934.

- Oražem, V., Tomažič, I., Kos, I., Nagode, D., Randler, C., 2019. Wolves' conservation through educational workshops: which method works best? *Sustainability*, 11, 1124.
- Randler, C., Wagner, A., Rögele, A., Hummel, E., Tomažič, I., 2020. Attitudes toward and knowledge about wolves in SW German secondary school pupils from within and outside an area occupied by wolves (*Canis lupus*). *Animals*, 10 (4), 607.
- Strgar, J., 2018. Analiza dosežkov osnovnošolcev na nacionalnem preverjanju znanja iz biologije = Analysis of elementary school pupils' achievements on the national assessment of knowledge in biology." *Acta Biologica Slovenica*, 61 (1), 47-59.
- Tomažič, I., 2017. Lower secondary school students' interest and emotions regarding dissection in schools: a pilot study = Interes in čustva osnovnošolcev v povezavi s seciranjem v šoli: pilotna študija. *Acta Biologica Slovenica*, 60 (1), 89-99.
- Tomažič, I., Randler, C., 2018. Slovenian adaptation of the Morningness-Eveningness-Stability Scales improved (MESSi). *Biological Rhythm Research*, 51 (3), 453-459.
- Tomažič, I., Hummel, E., Schrenk, M., Rupnik, T., Randler, C., 2018. Cognitive and affective outcomes of teaching about poisonous and venomous animals. *Journal of Biological Education*, 54 (1), 63-76.

## Botanični vrt Univerze v Ljubljani

Jože Bavcon

Ustanovitev Botaničnega vrta Univerze v Ljubljani je povezana z ustanovitvijo Ilirskih provinc. Marmontova odredba iz 4. julija 1810 v 9. členu navaja, naj se poleg knjižnice, fizikalnega in kemičnega kabineta ustanovi še botanični vrt. Uredba je visoke šole v Iliriji povzdignila na stopnjo univerzitetne ravni. Franc Hladnik je z ustanovitvijo Ilirskih provinc dobil zemljišče ob Karlovški cesti ob Gruberjevem prekopu, namenjeno ureditvi botaničnega vrta.

Hladnik je svoje znanje botanike dobil od Wulfena, ki je botaniko praktical že vse od leta 1750. Imel je zelo veliko stikov s Scopolijem. Na Hladnika se je tako posredno preko Wulfena preneslo znanje Scopolija in še drugih naravoslovcev. Hladnik je postal v srednji Evropi zelo cenjen. Sodeloval je s Hostom na Dunaju, ki je urejal dunajski botanični vrt. To je bilo odločilno za obstoj ljubljanskega botaničnega vrta, saj je kljub ukinitvi ilirskih provinc kot institucija ostal.

Za Hladnikom je vrt prevzel Biatzowsky in ga zelo uspešno vodil do leta 1850. Za njim je vodenje prevzel Andrej Fleishmann. Leta 1844 je izšel njegov pregled Kranjske flore. Posvečal se je pospeševanju kmetijstva in sadjarstva, se vključeval v prizadevanja za pogozdovanje Krasa. Alfonz Paulin je v vrtu deloval od leta 1886 do 1931. Od leta 1901-1936 je izhajala njegova znamenita posušena zbirka Kranjske flore: *Flora*

*exiccata carniolica*. Enako pomembno je njegovo delo *Index seminum* -1889, saj je vrt s to znanstveno publikacijo povezal z evropskimi vrtovi.

Vrt je leta 1919 je ponovno prišel pod na novo ustanovljeno Univerzo v Ljubljani. Prevzela ga je od deželne vlade. Na predlog profesorjev Nahtigala (Filozofska fakulteta) in Hinterlechnerja (Tehnična fakulteta) je univerzitetni svet ljubljanske univerze 12. novembra 1919 sklenil Deželno vlado prositi, da odstopi botanični vrt v Ljubljani v last Univerze.

Po Paulinu je bilo obdobje hitrih izmenjav vodij vrta. Med vojno je vrt vodil Tomažič, ki se je ukvarjal s fitocenologijo. Nato je vrt prevzel Lazar, ga povečal in za tedanje čase uredil grede za rastlinski sistem in ekološke enote. Leta 1967 je vodstvo vrta prevzel prof. dr. Vinko Strgar (1928-1992). Površina se je zaradi posodobitev ceste in železnice začela manjšati. Vsa svoja prizadevanja je skupaj s sodelavci oddelka za biologijo usmeril v pridobivanje zemljišča za nov botanični vrt pod Rožnikom in kasneje graditev univerzitetnega biološkega središča. Raziskoval je rod *Sesleria*, opisal je novo vrsto netreska - *Sempervivum juvenii* in se ukvarjal z vzgojo endemičnih in ogroženih vrst. Po njegovi smrti je začasno vodstvo prevzel prof. dr. Tone Wraber, od leta 1995 pa vrt vodi avtor teksta.

Novейše obdobje botaničnega vrta Univerze v Ljubljani označuje boj za preživetje. Gradnja Biološkega središča ob Večni poti, je zanesljivo največje delo pokojnega vodje vrta dr. Strgarja. Oddelek za biologijo je z njim prvič v zgodovini dobil svoj skupni prostor. Za Botanični vrt je gradnja pomenila velik udarec, ker je s tem vrt stagniral. Strgarjeva smrt je prekinila prizadevanja za izgradnjo novega vrta. Po končani gradnji biološkega središča za vrt ni bilo več posluha. Ko je bil vhodni objekt v vrt dograjen, se je vrtu namenjene prostore začelo dajati za druge potrebe. Rastlinjak je ostal nedokončan. Kljub številnim predlogom vodstva vrta, je bil zaradi nezainteresiranosti oddelka za biologijo projekt že vnaprej obsojen na propad. S sredstvi MOL smo zato obnovili stari vrt. Leta 2000 smo posadili nasad japonskih češenj kot protokolarno darilo države Japonske Sloveniji na vhodu v novo lokacijo. Leta 2000 smo za *in-situ* varovanja rastlinskih vrst najeli suhi travnik v Rojah s katerim upravljamo še danes. Z lastnimi sredstvi smo leta 2004 dokončali rastlinjak za prezimovanje sredozemskih rastlin. Od mesta Ljubljana smo leta 2009 prevzeli tivolski rastlinjak. Ustvarjali smo prepoznavnost vrta v tujini in doma. Posvečali smo se raziskavam avtohtone flore in njeni uporabi v hortikulture namene. Naše delo je bilo prepoznano v tujini. Leta 2003 smo organizirali slovensko mrežo botaničnih vrtov in arboretumov Slovenije. Z vstopom v Eu je vrt postal redni član evropskega konzorcija botaničnih vrtov in predstavnik Slovenije v njem. Leta 2007 je bil v Londonu izmed 2700 vrtov na svetu uvrščen med 278 zgodovinsko pomembnih botaničnih vrtov, leta 2013 med 90 pomembnih v Evropi, katerih je bilo tedaj 900. Leta 2008 je botanični vrt zaslovel po prepoznavni zbirki posebnosti vrste *Galanthus nivalis* in nato vrste *Cyclamen purpurascens* in drugih.

### Izbrane reference

- Bavcon, J., 2008. Navadni mali zvonček (*Galanthus nivalis* L.) in njegova raznolikost v Sloveniji = Common snowdrop (*Galanthus nivalis* L.) and its diversity in Slovenia. Biotehniška fakulteta, Ljubljana, 94 str.
- Bavcon, J., 2010. 200 let botaničnega vrta v Ljubljani. Biotehniška fakulteta, Ljubljana, str. 7-71.
- Bavcon, J., Praprotnik, N., Ravnjak, B., 2017. Franc Hladnik und seine Zusammenarbeit mit Nicolaus Thomas Host. V: Seidl, J. (ur.): Deutsche und österreichische Forschungsreisen auf den Balkan und nach Nahost, Europäische Wissenschaftsbeziehungen, str. 323-344.

Po dolgoletnih prošnjah in štirih poslanskih vprašanjih je Ministrstvo za šolstvo leta 2010 le dalo Univerzi v Ljubljani sredstva za izgradnjo tropskega rastlinjaka na stari lokaciji. Načrt njegove zasaditev je plod lastnega znanja. Rastlinjak je postal referenčni objekt v regiji. Svojo mednarodno dejavnost je vrt udeležil z gostovanjem Evropskega konzorcija botaničnih vrtov v letih 2010 in 2016. Leta 2015 je prejel nagrado Marsh za varovanje rastlinskih vrst. Leta 2018 pa je prejel dva certifikata Botanic Gardens Conservation International (BGCI) in sicer za Accredited Botanic Garden in Conservation Practitioner.

V tem času je bil izmed 3500 registriranih botaničnih vrtov na svetu uvrščen v šesterico izbrancev, ki je imela oba certifikata. Vrt je s strani BGCI predstavljen kot izredno proaktiven, ki ustvarja novo prihodnost - politike vrtov. Botanični vrt deluje izven svoje ograje, sodeluje pri načrtovanjih zelenih površin v MOL in drugod po Sloveniji. Leta 2016 se je vrt razširil z mestnim zemljiščem v velikosti 0,75 ha, kjer je bil leta 2017 odprt učni čebelnjak, seminarsko delo študentov arhitekture. Ob čebelnjaku pa smo uredili vrt cvetočih preprog z medovitimi rastlinami.

Kljub 210-letni bogati zgodovini, se še vedno bori za preživetje, kar ni v ponos Oddelku za biologijo. Še manj pa mu je v ponos, da je pozabil na svojo najstarejšo ustanovo in ji ni omogočil širitve na novi lokaciji, kar je v svojem zapisu že zelo preroško zapisal vodja gradnje biološkega središča dr. Strgar (1990): »da ne bo kakšen organ hipertrofiran na račun drugega ali pa bi katerega od njih morda celo zanemarili - kot se v enostranskem in včasih zaletavem (ne)uravnavanju našega razvoja vse prerado dogaja.«

Biologija je na svoj dolg do botaničnega vrta pozabila!

- Bavcon, J., Ravnjak, B., Makše, J., Dakskobler, I., 2018. Globalna strategija ohranjanja rastlinskih vrst (točka 8). Biotehniška fakulteta, Ljubljana, str. 4-72.
- Bavcon, J., Ravnjak, B., Praprotnik, N., 2019. Senožeti, rovti - strme in pisane površine = Meadows - steep and colourful grasslands. Biotehniška fakulteta, Ljubljana, 235 str.
- Strgar, V., 1990. Biološko središče v Ljubljani, Botanični vrt, Želje možnosti in iskanja. Biološki vestnik, 38, 83-92.

## Nacionalni inštitut za biologijo - Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo

Maja Ravnikar, Kristina Gruden, Jana Žel

Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo (FITO) ustvarja vrhunsko znanje o interakcijah med biološkimi sistemi in razvija nove tehnologije na področju ved o življenju. Oddelek združuje temeljne raziskave z močno mednarodno vpetostjo in prenos znanj in visoko specializiranega razvoja in storitev tako za vladne službe doma in v tujini, kakor tudi za slovenska in mednarodna podjetja s področja biotehnologije, farmacije, kmetijstva in živilske industrije.

Izobraževanje mladih kadrov ter predajanje znanja sta pomembni nalogi FITO, zato deset habilitiranih sodelavcev sodeluje pri pedagoških procesih Univerze v Ljubljani, Univerze v Novi Gorici, Univerze na Primorskem in Mednarodni podiplomski šoli Jožefa Stefana. FITO organizira tudi izobraževanja za druge laboratorije ter mednarodne specializirane praktične delavnice s področja visokotehnoloških in kvantitativnih metod molekularne biologije, na katerih se je do sedaj izobraževalo več kot 300 udeležencev iz vsega sveta.

Zametek delovanja FITO, sprva imenovan Oddelek za fiziologijo rastlin, sega v šestdeseta leta delovanja Katedre za fiziologijo rastlin Oddelka za biologijo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani, kjer sta prof. dr. Miran Vardjan in njegova naslednica prof. dr. Nada Gogala skupaj s prof. dr. Francijem Pohlevnom uveljavila in mednarodno vpela področje fiziologije rastlin v Sloveniji. Bila sta mentorja vsem dosedanjim vodjem FITO, prof. dr. Maji Kovač, izr. prof. dr. Jani Žel in prof. dr. Maji Ravnikar, ki so oddelek uspešno vodile v zadnjih 30 letih.

Raziskave mikropropagacije rastlin so se začele s še danes težavnimi lesnimi rastlinami ter nadaljevale z vzgojo zdravih rastlin s termoterapijo in meristemskimi kulturami krompirja, praproti,

česna, fižola, surfinij, vse s prenosom v uporabo za slovenska podjetja. Sledile so raziskave tkivnih kultur celic, protoplastov in korenin za pridobivanje sekundarnih metabolitov ter njihova biokemijska analitika, kar je prav tako potekalo v sodelovanju s slovenskim podjetjem KRKA.

Pred prelomom tisočletja so se v laboratorij uvedle molekularne metode in genska transformacija rastlin, ki se je najprej usmerila v preučevanje razvoja odpornosti krompirja na virus PVY, nadalje tudi na halotoleranco in odpornost proti žuželkam. Istočasno se je razvijala tudi mikrobiologija in napredna diagnostika virusov in bakterij, vključno s fitoplazmami. V tem času se je skupini pridružila prof.dr. Kristina Gruden, ki sedaj vodi enoto omike. Takrat so se raziskave usmerile tudi v natančno kvantifikacijo nukleinskih kislin z uporabo PCR v realnem času in v novejšem obdobju z digitalnim PCR, kar je omogočilo razvoj diagnostičnih metod za določanje gensko spremenjenih organizmov. V tem času so se pospešeno uvajale tehnologije sistemske biologije, zlasti genomike in biotehnološki pristopi z uporabo virusov.

FITO od svojega nastanka sodeluje s številnimi sorodnimi inštitucijami v Sloveniji in tujini. Intenzivno poteka tudi sodelovanje z državnimi organi ter podjetji doma in v tujini s področja biotehnologije, farmacije in živilske industrije.

Raziskave in razvojno aplikativno delo FITO je interdisciplinarno in združuje znanje biologije, molekulske biologije, mikrobiologije, biokemije, biotehnologije, matematike, biostatistike in računskih znanosti. Z ustvarjanjem novega znanja, intelektualne lastnine in visoko tehnološkimi storitvami prispevajo k razvoju družbe, reševanju aktualnih problemov na področju biotehnologije, kmetijstva, farmacije, zdravja, okolja in varne hrane. Njihove prednosti so visoko usposobljeni

in motivirani sodelavci, ki prihajajo tudi iz mednarodnega okolja, uporaba najmodernejše opreme in vpeljan sistem kakovosti. Dobra organiziranost in fleksibilnost jim omogočata uspešno povezavo med znanjem in njegovo uporabo. Poznani so po uporabi kvantitativne molekularne biologije in razvijanju pristopov sistemske biologije, vključno z bioinformatiko in biostatistiko.

Odderek zaposluje v letu 2020 več kot 60 sodelavcev in je organiziran v štiri raziskovalne enote in sicer Gensko spremenjeni organizmi s terapevtskimi virusi, Omski pristopi, Mikroorganizmi ter Bakteriologija z meroslovjem, kar so tudi glavne usmeritve Oddelka.

Glavne raziskovalne usmeritve FITO so:

- pridobivanje mehanističnega znanja za razumevanje rastlinskih odgovorov na stres - s pristopi sistemske biologije;
- povečevanje znanja o biologiji mikrobov v različnih okoljih, kot so zrak in voda in tla, da bi bolje razumeli njihovo raznolikost, patogenost in epidemiologijo ter njihovo vlogo v rastlinskih gostiteljih ter pomembnost za zdravje ljudi vključno z raziskavami COVID-19;
- na osnovi pridobljenih rezultatov razvijati učinkovite in trajnostne metode za biotehnoški in biološki nadzor mikrobov;
- celostni pristop h karakterizaciji virusov z molekularnega do morfološkega vidika in izboljšanje kritičnih točk karakterizacije virusov v proizvodnem procesu v biomedicinskih aplikacijah, kot so cepiva in virusni vektorji za gensko terapijo
- razvijati nove strategije za zaščito rastlin in za varno hrano in vodo;
- izgraditi tehnološko platformo, ki podpira raziskave sistemske biologije rastlin;
- razvijati bioinformatika orodja, ki olajšajo interpretacijo masivnih podatkov ('big data') v rastlinski biologiji
- vzdrževanje in razvoj meroslovno naravnane tehnološke podpore ter učinkovitejših identifikacijskih in detekcijskih metod za mikrobe in gensko spremenjene organizme, ki so uporabna tudi na področjih farmacije, zdravja ljudi in varovanja okolja.



**Slika 8:** Na FITO se raziskave opravljajo tudi v rastlinjaku, ki omogoča delo s karantenskimi mikroorganizmi povzročitelji bolezni rastlin.

**Figure 8:** At FITO, research is also carried out in a greenhouse, which enables work with quarantene microorganisms that cause plant diseases.

V okviru oddelka deluje tudi infrastrukturni center Planta (leta 1992 ustanovljen skupaj s podjetji), ki razpolaga z vrhunsko raziskovalno opremo za področje kvantitativne molekularne biologije, komore za gojenja biokultur in karantenski rastlinjak, laboratorijem drugega varnostnega razreda GSO, celični laboratorij, elektronsko in konfokalno mikroskopijo. FITO je aktiven član več infrastrukturnih centrov, kjer združuje opremo. Je tudi član Evropskih infrastruktur, za področje bioinformatike (ELIXIR, <https://elixir-europe.org/>), na področju sistemske biologije (ISBE, <https://project.isbe.eu/>) ter v infrastrukturi Meroslovje v hrani in prehrani (METROFOOD, <https://www.metrofood.eu/>).

FITO ima akreditirano dejavnost po ISO 17025 od 2003 za določanje gensko spremenjenih organizmov in diagnostiko mikroorganizmov, ki povzročajo bolezni rastlin ter več kot 60 akreditiranih metod. FITO je od 2019 imenovan v dva Evropska referenčna laboratorija v konzorciju za škodljive organizme rastlin (za bakterije in za viruse ter fitoplazme) (<https://www.gov.si teme/laboratoriji-za-skodljive-organizme-rastlin/>). V okviru FITO delujeta dva nacionalna in uradna referenčna laboratorija (za bakterije in za viruse ter fitoplazme), sodelavci FITO so imenovani državni predstavniki v Evropski organizaciji za varstvo rastlin (EPPO) <https://www.eppo.int/>. FITO je imenovan kot Nacionalni referenčni laboratorij ter uradni laboratorij za določanje GSO v hrani



in krmi. So člani Evropske mreže laboratorijev za določanje GSO (<https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/ENGL/ENGL.html>). Urad za meroslovje je imenoval NIB, FITO za Nacionalni etalon za področje množina snovi/bioanalize nukleinskih kislin na področju GSO in mikroorganizmov.

Iz Oddelka izhaja tudi visokotehnološko podjetje Biosistemika, ki je bilo ustanovljeno leta 2010 (<https://biosistemika.com/>).

Opomba: Z dovoljenjem založnika je ta prispevek povzetek objave, v kateri je širše opisana zgodovina FITO, njeno delovanje in sodelovanje s podjetji ter drugimi naročniki (Ravnikar et al. Od tkivnih kultur do Oddelka za biotehnologijo in sistemsko biologijo. V: RASPOR, Peter (ur.). BIA, vztrajanje na biotehnološki poti. Posvetovanje ob obeležitvi „30 letnice podjetja BIA d. o. o.“, 16. januar 2020, Ljubljana. Ljubljana: BIA, 2020. Str. 97-108).

### Izbrane reference

- Bačnik, K., Kutnjak, D., Pecman, A., Mehle, N., Tušek-Žnidarič, M., Gutiérrez-Aguirre, I., Ravnikar, M., 2020. Viromics and infectivity analysis reveal the release of infective plant viruses from wastewater into the environment. *Water Research*, 41 str., v tisku.
- Bar-Dror, T., Dermastia, M., Kladnik, A., Tušek-Žnidarič, M., Pompe Novak, M., Meir, S., Burd, S., Philosoph-Hadas, S., Ori, N., Sonogo, L., Dickman, M. B., Lers, A., 2011. Programmed cell death occurs asymmetrically during abscission in tomato. *The Plant Cell*, 23 (11), 4146-4163.
- Dular, M., Griessler Bulc, T., Gutiérrez-Aguirre, I., Heath, E., Kosjek, T., Krivograd-Klemenčič, A., Oer, M., Petkovšek, M., Rački, N., Ravnikar, M., Šarc, A., Širok, B., Zupanc, M., Žitnik, M., Kompare, B., 2016. Use of hydrodynamic cavitation in (waste) water treatment. *Ultrasonics Sonochemistry*, 29, 577-588.
- Kežar, A., Kavčič, L., Polák, M., Nováček, J., Gutiérrez-Aguirre, I., Žnidarič, M.T., Coll, A., Stare, K., Gruden, K., Ravnikar, M., Pahovnik, D., Žagar, E., Merzel, F., Anderluh, G., Podobnik, M., 2019. Structural basis for the multitasking nature of the potato virus Y coat protein. *Science Advances*, 5(7), eaaw3808.
- Morisset, D., Demšar, T., Gruden, K., Vojvoda, J., Štebih, D., Žel, J., 2009. Detection of genetically modified organisms-closing the gaps : to the editor. *Nature Biotechnology*, 27 (8), 700-701.
- Ramšak, Ž., Baebler, Š., Rotter, A., Korbar, M., Mozetič, I., Usadel, B., Gruden, K., 2014. GoMapMan: integration, consolidation and visualization of plant gene annotations within the MapMan ontology. *Nucleic Acids Research*, 42 (D1), 167-175.
- Ramšak, Ž., Coll Rius, A., Stare, T., Tzfadia, O., Baebler, Špela, Van de Peer, Y., Gruden, K., 2018. Network modelling unravels mechanisms of crosstalk between ethylene and salicylate signalling in potato. *Plant Physiology*, 178 (1), 488-499.
- Schwacke, R., Ponce-Soto, G.Y., Krause, K., Bolger, A.M., Arsova, B., Hallab, A., Gruden, K., Stitt, M., Bolger, M.E., Usadel, B., 2019. MapMan4: a refined protein classification and annotation framework applicable to multi-omics data analysis. *Molecular Plant*, 12, 879-892.
- Whale, A.S., Jones, G. M., Pavšič, J., Dreo, T., Redshaw, N., Akyürek, S., Akgöz, M., Divieto, C., Sassi, M.P., He, H.J., Cole, K.D., Bae, Y.K., Park, S.R., Deprez, L., Corbisier, P., Ggarrigou, S., Taly, V., Larios, R., Cowen, S., O'sullivan, D.M., Bushell, C., Goenaga-Infante, H., Ffoy, C.A., Woolford, A.J., Parkes, H.C., Huggett, J.F., Devonshire, A.S., 2018. Assessment of digital PCR as a primary reference measurement procedure to support advances in precision medicine. *Clinical Chemistry*, 64 (9), 1296-1307.
- Žel, J., Milavec, M., Morisset, D., Plan, D., van den Eede, G., Gruden, K., 2012. How to reliably test for GMOs. V: Springer briefs in food, health, and nutrition, Springer, New York, 100 str.

## Nacionalni inštitut za biologijo - Oddelek za raziskave organizmov in ekosistemov

Meta Virant-Doberlet, Danilo Bevk, Nataša Mori, Al Vrezec, Anamarija Žagar,  
Alenka Žunič Kosi

Oddelek za raziskave organizmov in ekosistemov (EKOS) na Nacionalnem inštitutu za biologijo, je nastal leta 2016 z združitvijo Oddelka za raziskave kopenskih in sladkovodnih ekosistemov in Oddelka za entomologijo.

Oddelek za raziskave kopenskih in sladkovodnih ekosistemov je bil poznan po svojih interdisciplinarnih raziskavah ekosistemov, npr. gorskih jezer, ki jih je izvajal v okviru evropskih projektov in jih je v sklopu Nacionalnega inštituta vodil prof. dr. Anton Brancelj. Prav tako je bil Oddelek zelo aktiven tudi pri prenosu znanja v prakso, kjer je pomembno vlogo igrala zdaj že pokojna dr. Olga Urbanc Berčič.

Raziskave Oddelka za entomologijo so bile predvsem posvečene vibracijski komunikaciji žuželk, kar je tematika, ki jo je že v 70. letih prejšnjega stoletja vpeljal akademik prof. dr. Matija Gogala in jo je zatem nadaljeval prof. dr. Andrej Čokl. Drugo področje, po katerem je bil Oddelek poznan pa so bile raziskave boleznih čebel, ki jih je na oddelku vpeljala zdaj že pokojna dr. Jasna Kralj.

Po združitvi in reorganizaciji smo se na Oddelku bolj koordinirano usmerili v kompleksne interdisciplinarne raziskave mehanizmov, ki določajo strukturo in funkcijo naravnih in antropogenih ekosistemov.

Konec leta 2019 je bilo na oddelku zaposlenih 17 raziskovalcev z doktoratom, 5 mladih raziskovalcev in 6 strokovnih sodelavcev (slika 9). V šolskem letu 2019/2020 so bili raziskovalci na Univerzi v Ljubljani, Univerzi v Mariboru, Univerzi v Novi Gorici, Univerzi na Primorskem, Visoki šoli za upravljanje podeželja GRM Novo mesto in na Mednarodni podiplomski šoli Jožef Stefan nosilci ali sodelavci pri 18 predmetih povezanih z vsebinami s področij ekologije kopenskih in sladkovodnih ekosistemov, zoologije, evolucije, vedenja in fiziologije živali, varstva okolja, ekosistemskih storitev in statistike. V letih 2016 in 2018 sta bila člana Oddelka med peterico finalistov za naslov Mentor leta, ki ga podeljuje društvo Mlada akademija.

Dejavnost oddelka je trdno umeščena v vse tri stebre trajnostnega razvoja (ekonomski in socialni razvoj ter varstvo okolja). Z integrativnim, interdisciplinarnim pristopom na Oddelku ustvarjamo temeljno znanje potrebno za celostno razumevanje organizmov in njihove vloge v okolju. V sklopu oddelka na primer deluje eden od vodilnih svetovnih centrov za raziskave vibracijske komunikacije. Naša prednost je, da združujemo tako terenske delo, kot je na primer analiza vibracijske krajine, kot tudi vedenjske, neurofiziološke, ekofiziološke, biofizikalne in morfološke raziskave v laboratoriju. Z aplikativnimi raziskavami na področju prekinjanja parjenja z vibracijskimi signali pa razvijamo nov, okolju prijazen pristop za nadzor žuželčjih škodljivcev.

Skupaj s Prirodoslovnim muzejem Slovenije izvajamo raziskovalni program »Združbe, interakcije in komunikacije v ekosistemih«, ki ga na Oddelku tudi vodimo. Raziskave potekajo v dveh funkcionalnih sklopih, ki pa sta med seboj povezana in se med seboj tudi dopolnjujeta (slika 2). V prvem sklopu 'Biotska pestrost: procesi in vzorci', ki ga sestavljajo področja integrativna taksonomija, evlucijska zoologija, reproduktivna izolacija, komunikacijska omrežja in medvrstne interakcije, se posvečamo vzorcem genetske, morfološke, fiziološke, vedenjske in ekološke pestrosti in raziskujemo ključne evlucijske in ekološke mehanizme, ki oblikujejo vzorce biotske pestrosti ekosistemov. Z rezultati pridobljenimi na področjih ekosistemske storitve, podnebne spremembe, invazivne vrste, varstvena biologija in trajnostna raba naravnih virov, ki sestavljajo drugi sklop 'Upravljanje z ekosistemi' pa določamo smernice za trajnostni razvoj, ki bo ohranjal biotsko pestrost na vseh nivojih in zagotavljal trajnostno rabo obnovljivih naravnih virov.

Ker je raziskovalna dejavnost Oddelka izjemno pestra in razvejana, v nadaljevanju izpostavljamo samo nekatere izbrane publikacije v zadnjih petih letih.

Dolgo spregledana temeljna značilnost komunikacije je, da se v naravi vsako sporazumevanje odvija v komunikacijskem omrežju, to je v skupini



**Slika 9:** Sodelavci Oddelka za raziskave organizmov in ekosistemov. (foto Davorin Tome)

**Figure 9:** Employees of the Department of Organisms and Ecosystems Research.

osebkov, ki so te signale sposobni zaznati in ki se nahajajo v dosegu oddanih signalov in ne-le v dvojici oddajnik-sprejemnik. V sklopu naših raziskav na področju vibracijske komunikacije, smo pokazali, da čeprav ljudje mehanskih signalov, ki se prenašajo preko podlage, ne zaznamo, so živali, ki te signale zaznavajo, del kompleksnih vibracijskih komunikacijskih omrežij, v katerih sta prisluškovanje in izkoriščanje signalov s strani tekmecev in sovražnikov pogosta (Virant-Doberlet et al. 2019).

Čeprav so plenilci pri izboru plena dokaj plastični, kljub temu plenilec ohranja samosvoje preference do plena, četudi pleni v zelo različnih okoljih (Vrezec et al. 2018). Nedavno smo pokazali, da ti vzorci naprej krojijo ključne interakcijske povezave v ekosistemih tako na znotraj trofičnih nivojih, kjer zaradi interakcijskega izključevanja

ali sobivanja prihaja do širjenja ali izumiranja vrst plenilcev ob ekosistemskih spremembah (Brambilla et al. 2020).

Z vnosi tujerodnih vrst se spreminjajo evlucijske razmere v ekosistemih, ki tako domorodne kot tujerodne vrste zaradi novo nastalih selekcijskih pritiskov usmerjajo v doslej neobstoječe smeri razvoja. Z vnosi tujerodnih vrst potočnih rakov so v evropske vode zanesli tudi zajedavca, oomiceto *Aphanomyces astaci*, povzročitelja račje kuge, ki se je pri različnih vrstah rakov koevoluirala v različne seve. Za domorodne vrste rakov je račja kuga pogubna, vendar pa smo v Sloveniji pokazali, da so se nekatere populacije rakov koevoluirale s samosvojim sevom račje kuge, ki lahko prizadene druge tako domorodne kot tujerodne vrste (Jussila et al. 2017).

Podnebne spremembe imajo močan vpliv na zmanjševanje biodiverzitete. Hladnokrvni organizmi imajo zaradi svoje povezave s temperaturami iz okolja bistveno drugačen odziv na globalno segrevanje ozračja. Nedavno smo v okviru mednarodnega sodelovanja ugotovili, da bodo najbolj ogrožene vrste kuščaric v zmernem podnebnju tiste iz gorskih in mokriščnih ekosistemov (Garcia-Porta et al. 2019).

Samoočiščevalni procesi, ki se v celinskih vodah odvijajo v veliki meri v sedimentih, so ključni za vzdrževanje dobrega ekološkega stanja voda. Stresorji, ki ogrožajo ekosistemske procese običajno delujejo v interakcijah. Z uporabo strojnega učenja smo identificirali predhodno nedokazane povezave med stresorji in merjenimi okoljskimi dejavniki ter določili pragove pri katerih prihaja do sprememb v biološkem odzivu (Mori et al. 2019). Uspeli smo pokazati, da so odnosi med stresorji in okoljskimi dejavniki ter biološkimi odzivom odvisni predvsem od tega v katerem temperaturnem rangu jih opazujemo.

Ena najpomembnejših ekosistemskih storitev je oprашevanje. Ocenjujemo, da je vrednost oprășevanja žuželk za slovensko kmetijstvo okoli 120 milijonov EUR letno, pomemben del tega pa opravijo divji oprășevalci, še zlasti divje čebele. Kljub pomembnosti divjih čebel, pa je stanje njihovih populacij slabo raziskano, zato smo na oddelku začeli z razvojem monitoringa čebeljih populacij s pomočjo pasti (Bevk et al. 2019).

Žuželke so najbolj raznolika a tudi ena najbolj ogroženih skupin živali in za njihovo ohranjanje potrebujemo učinkovite metode ugotavljanja prisotnosti in spremljanja stanja populacij. Kljub temu, da monitoring s pomočjo semiokemikalij močno izboljša oceno razširjenosti in stanja populacij žuželk, so bile feromonske pasti redko uporabljene v naravovarstvenih študijah. Identificirali smo vrstno specifični feromon alpskega kozlička (*Rosalia alpina*) (Žunič Kosi et al. 2017), ki je eden najbolj ogroženih saproksilnih hroščev v Sloveniji in EU. Komponenta, ki jo oddajajo samci, predstavlja novo strukturo med feromoni kozličkov in kaže velik potencial pri upravljanju ter ohranjanju te varstveno prioritete vrste.

## Izbrane reference

- Bevk, D., Koderman, B., Virant-Doberlet, M., Vrezec, A., 2019. Uporabnost različnih pasti za monitoring divjih čebel. *Acta Entomologica Slovenica*, 27, 43-50.
- Brambilla, M., et al., 2020. Species interactions and climate change: how the disruption of species co-occurrence will impact on an avian forest guild. *Global Change Biology*, 26, 1212-1224.
- Garcia-Porta, J., et al. 2019. Environmental temperatures shape thermal physiology as well as diversification and genome-wide substitution rates in lizards. *Nature Communications* 10 (1), 1-12.
- Jussila, J., Vrezec, A., Jaklič, M., Kukkonena, H., Makkonen, J., Kokko, H., 2017. *Aphanomyces astaci* isolate from latently infected stone crayfish (*Austropotamobius torrentium*) population is virulent. *Journal of Invertebrate Pathology*, 149, 15-20.
- Mori, N., Debeljak, B., Škerjanc, M., Simčič, T., Kanduč, T., Brancelj, T., 2019. Modelling the effects of multiple stressors on respiration and microbial biomass in the hyporheic zone using decision trees. *Water Research*, 149, 9-20.
- Virant-Doberlet, M., Kuhelj, A., Polajnar, J., Šturm, R., 2019. Predator-prey interactions and eavesdropping in vibrational communication networks. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 7, 203.
- Vrezec, A., Saurola, P., Avotins, A., Kocijančič, S., Sulkava, S., 2018. A comparative study of Ural Owl *Strix uralensis* breeding season diet within its European breeding range, derived from nest box monitoring schemes. *Bird Study*, 65, S85-S95.
- Žunič Kosi, A., Zou, Y., Hoskovec, M., Vrezec, A., Stritih, N., Millar, J. G., 2017. Novel, male-produced aggregation pheromone of the cerambycid beetle *Rosalia alpina*, a priority species of European conservation concern. *PLoS ONE*, 12(8), e0183279.

## Nacionalni inštitut za biologijo - Morska biološka postaja Piran

Martina Orlando-Bonaca, Janja Francé, Tjaša Kogovšek, Alenka Malej, Borut Mavrič,  
Lovrenc Lipelj, Patricija Mozetič, Valentina Turk

Morska biološka postaja Piran Nacionalnega inštituta za biologijo (NIB-MBP) je v letu 2019 praznovala 50 let delovanja. Zasluge za njeno ustanovitev imata prof. Franc Sušnik in prof. Jože Štirn, čeprav se je že l. 1969 med nadobudnimi slovenskimi potapljači in biologi kazala potreba po postavitvi morske raziskovalne postaje na slovenski obali. Danes je MBP druga največja enota NIB, katere poslanstvo je ustvarjanje znanja za razumevanje procesov in sprememb v morju, nudenje strokovne podpore za trajnostni razvoj morskega in obalnega prostora ter širjenje znanja o morju za večanje morske pismenosti.

Že od vsega začetka so raziskave morske biodiverzitete osrednji steber dejavnosti MBP, ki se povezujejo z drugimi biološkimi področji oz. naravoslovnimi vedami v multi- in interdisciplinarni pristop za razumevanje strukture in delovanja obalnega ekosistema. Tako so najpomembnejša raziskovalna področja MBP biologija in ekologija morja in obalnega pasu, biogeokemično kroženje snovi, fizikalna oceanografija, podnebne spremembe, onesnaževanje morja, varstvo narave in okolja ter morska biotehnologija.

Spremembe v okolju, bodisi kot odraz naravne variabilnosti obalnega ekosistema bodisi kot odgovor na antropogene vplive, so skozi desetletja ponujale različne raziskovalne izzive. Če je bilo

v preteklosti težišče raziskav na problemih evtrofikacije – tako vzrokih kot posledicah, onesnaževanju s komunalnimi in industrijskimi odplakami ter občasnimi ekološkimi krizami v severnem Jadranu (npr. kopičenje želatinastih agregatov), so recentne raziskave MBP usmerjene v proučevanje globalnih oceanskih problemov in njihovih posledic, ki pa so na regionalnem ali lokalnem nivoju lahko še bolj silovite. Sredozemsko morje, in z njim severni Jadran, ni znano le kot vroča točka biodiverzitete, ampak tudi kot eno najhitreje segrevajočih se območij in najbolj onesnaženih s plastiko, kar predstavlja veliko grožnjo biodiverziteti. Nekaj izsledkov teh raziskav, ki potekajo na MBP, predstavljamo v nadaljevanju.

V zadnjih desetletjih se Sredozemsko morje z Jadranskim vred sooča z različnimi procesi, ki vplivajo na spremembe biotske raznovrstnosti. Taka procesa sta npr. tropikalizacija, pri kateri gre za širjenje toploljubnih (termofilnih) vrst proti severu, in bioinvazija, pri kateri prihajajo v Sredozemsko morje tujerodne vrste iz drugih biogeografskih provinc. Tudi v slovenskem morju vsako leto odkrivamo nove tujerodne vrste; večina teh sicer ne povzroča škode, nekaj pa je invazivnih. Med slednjimi strokovnjaki MBP-NIB raziskujemo populacijsko dinamiko in prehranjevanje tujerodne rebrače (*Mnemiopsis leidyi*), ki se že nekaj let masovno pojavlja tudi v slovenskih vodah (Malej et al. 2017). Rebrača spada v želatinozni plankton, kamor sodijo tudi meduze, ki so prav sezonsko zelo številčne v našem morju. V življenjskem krogu klobučnjaških meduz se izmenjujeta pritrjena polipna oblika, ki se nespolno razmnožuje, in prosto plavajoča meduza, ki se razmnožuje spolno. Na podlagi številnih raziskav lahko povzamemo, da višje temperature morja, predvsem v toplejšem delu leta, spodbujajo nespolno razmnoževanje polipov (Kogovšek et al. 2018). Poleg tega številne umetne podvodne strukture (pristanišča, marine, valobrani, vrtnalnice) nudijo dodaten habitat polipom, ki v vodni stolpec sprostitjo več efir, iz katerih se razvijejo nove meduze. Visoke gostote meduz



**Slika 10:** Raziskovalno plovilo Sagita in oceanografska boja Vida, dve milj severno od piranskega Rta Madona. (foto: Vladimir Bernetič)

**Figure 10:** Research boat Sagita and oceanographic buoy Vida, 2 miles north of Cape Madonna, Piran.

negativno vplivajo tudi na stalez malih pelagičnih rib (inčun, sardela), saj vsi plenijo zooplankton (Schnedler-Meyer et al. 2016).

Fitoplankton ima pomembno vlogo pri kroženju organske snovi v vodnem stolpcu in je dober indikator ekoloških sprememb. Značilnosti fitoplanktonske združbe v slovenskem morju zato kontinuirano spremljamo že več kot tri desetletja. Z analizami časovne vrste smo, tako v Tržaškem zalivu kot v celotnem severnem Jadranu, zabeležili pomembne spremembe (Mozetič et al. 2010). Tako so problemi povezani z eutrofikacijo, ki so bili pred 20–30 leti pogosti (npr. cvetenje morja in pomanjkanje kisika pri dnu), postali redkejši. Biomasa fitoplanktona se je značilno znižala, poleg tega pa prevladujejo manjše vrste kot nekoč. Spremembe smo zabeležili tudi na višjih trofičnih nivojih, saj se je zaradi spremenjene trofične kontrole ob manjšem vnosu hranilnih snovi v morje in množičnejšem pojavljanju meduz znižala tudi biomasa zooplanktona (Mozetič et al. 2012). Gonilo teh sprememb so predvsem spremembe regionalne klime, ki vpliva na zmanjšane rečne pretoke, in boljše upravljanje z odpadnimi vodami. Ekonomsko pomemben vidik dinamike fitoplanktona je tudi pojavljanje vrst, ki so lahko škodljive. Slovenske gojitelje školjk skrbijo predvsem cvetenja toksičnih vrst mikroalg, katerih strupeni produkti presnove se kopičijo v školjkah in lahko povzročajo zastrupitve pri ljudeh, ki se z njimi prehranjujejo. Tudi te vrste spremljamo že dolgo (od leta 1994), analize pa so poleg precej predvidljivega sezonskega pojavljanja (Francé in Mozetič 2006) pokazale na precejšnjo medletno spremenljivost obsega namnožitve toksičnih vrst in pojavljanja toksinov v školjkah, zabeležili pa smo tudi nekatere nove vrste.

Velika prostorska in časovna variabilnost (sezonska, medletna) je značilna tudi za biomaso in vrstno sestavo bakterij (Tinta et al. 2015). Razlike so predvsem med površinskim in pridnenem sloju. Na spremenljivost vpliva predvsem temperatura, razpoložljivost in kakovost organskih hranil, oceanografski pogoji, ki so pod močnim vplivom antropogenih in podnebnih spremenljivk. Nenačaden dogodki, kot so fitoplanktonska cvetenja, masovno pojavljanje meduz ali drugih organsko bogatih substratov (Vojvoda et al. 2014) sprožijo spremembe v biomas, taksonomski sestavi bakterij in arhej. Želatinozni zooplankton predstavlja

organsko bogata mikrookolja, ki omogočajo hitro rast in spremembe v strukturi funkcionalnih skupin bakterij, kar vpliva na procese kroženja ogljika in drugih elementov, ter trofičnih povezav (Kos-Kramar et al. 2019, Turk et al. 2008).

Spremembe so bile opažene tudi pri bentoških nevretenčarjih. Sredozemska kamena korala (*Cladocora caespitosa*) je dober indikator podnebnih sprememb. Pri nadpovprečnih poletnih temperaturah morja, še posej pa tedaj, ko se obdobje s temperaturo morja nad 25 °C zavleče za nekaj tednov v september, simbiotske alge zoosantele zapustijo koralo in pride do t.i. bledenja koral. Ta pojav v zadnjem desetletju redno beležimo na različnih območjih slovenskega morja. V kolikor temperatura v krajšem času pade, potem zoosantele rekolonizirajo tkivo korale.

Makroalge so prav tako dober indikator sprememb na kamnitem morskem dnu. Med njimi imajo rjave alge iz rodu *Cystoseira* (cistozire) pomembno vlogo kot gradniki habitatov, saj njihova tridimenzionalna struktura zagotavlja hrano in zatočišče za mnoge manjše alge, ribe in nevretenčarje. Različni antropogeni dejavniki, skupaj s podnebnimi spremembami, so odgovorni za zmanjšanje t.i. gozdičev rjavih alg v obalnem Sredozemskem morju, kjer so nekatere vrste cistozir regionalno že izumrle. Tudi v slovenskem morju smo v zadnjem desetletju ugotovili prostorske in sezonske spremembe v pokrovnosti cistozir (Orlando-Bonaca in Rotter 2018). V infralitoralnem pasu še vedno najdemo dve vrsti, *Cystoseira barbata* in *C. compressa*, medtem ko so druge vrste iz tega rodu že redke. Zaradi tega si s pomočjo ARRS sredstev (raziskovalni projekt J1-1702) prizadevamo, da bi natančneje ocenili stanje in porazdelitev gozdičev rjavih alg, prepoznali vzroke za njihovo regresijo, in predlagali ter testirali ohranitvene in obnovitvene ukrepe. Od leta 2016 smo priča tudi trendu krčenja morskih travnikov kolenčaste cimodoceje (*Cymodocea nodosa*) na sedimentnem dnu (Lipej et al. 2018). Izkazalo se je, da je do tega prišlo zaradi antropogenih vplivov s kopnega, kot so gradbena dela, ki vodijo v zasipavanje travnikov.

**Izbrane reference**

- Francé, J., Mozetič, P., 2006. Ecological characterization of toxic phytoplankton species (*Dinophysis* spp., Dinophyceae) in Slovenian mariculture areas (Gulf of Trieste, Adriatic Sea) and the implications for monitoring. *Marine Pollution Bulletin*, 52 (11), 1504-1516.
- Kogovšek, T., Vodopivec, M., Raicich, F., Uye, S.-I., Malej, A., 2018. Comparative analysis of the ecosystems in the northern Adriatic Sea and the Inland Sea of Japan: Can anthropogenic pressures disclose jellyfish outbreaks? *Science of the Total Environment*, 626, 982-994.
- Kos Kramar, M., Tinta, T., Lučić, D., Malej, A., Turk, V., 2019. Bacteria associated with moon jellyfish during bloom and post-bloom periods in the Gulf of Trieste (northern Adriatic). *PloS one*, 14(1), 1/21.
- Lipej, L., Ivajnsič, D., Makovec, T., Mavrič, B., Šiško, M., Trkov, D., Orlando-Bonaca, M., 2018. Raziskava z oceno stanja morskih travnikov v Krajinskem parku Strunjan. Zaključno poročilo, november 2018. Poročila 174. Morska Biološka Postaja, Nacionalni Inštitut za Biologijo, Piran, 37 str.
- Malej, A., Tirelli, V., Lučić, D., Paliaga, P., Vodopivec, M., Goruppi, A., Ancona, S., Benzi, M., Bettoso, N., Camatti, E., Ercolessi, M., Ferrari, C.R., 2017. *Mnemiopsis leidyi* in the northern Adriatic: Here to stay? *Journal of Sea Research*, 124, 10-16.
- Mozetič, P., Solidoro, C., Cossarini, G., Socal, G., Precali, R., France, J., Bianchi, F., De Vittor, C., Smodlaka, N., Fonda Umani, S., 2010. Recent trends towards oligotrophication of the northern Adriatic: evidence from chlorophyll a time series. *Estuaries and Coasts*, 33, 362-375.
- Mozetič, P., France, J., Kogovšek, T., Talaber, I., Malej, A., 2012. Plankton trends and community changes in a coastal sea (northern Adriatic): Bottom-up vs. top-down control in relation to environmental drivers. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 115, 138-148.
- Orlando-Bonaca, M., Rotter, A., 2018. Any signs of replacement of canopy-forming algae by turf-forming algae in the northern Adriatic Sea? *Ecological Indicators*, 87, 272-284.
- Schnedler-Meyer, N.A., Mariani, P., Kirrboe, T., 2016. The global susceptibility of coastal forage fish to competition by large jellyfish. *Proceedings of the Royal Society B*, 283, 20161931.
- Tinta, T., Vojvoda, J., Mozetič, P., Talaber, I., Vodopives, M., Malfatti, F., Turk, V., 2015. Bacterial community shift is induced by dynamic environmental parameters in a changing coastal ecosystem (northern Adriatic, northeastern Mediterranean Sea) - a 2-year time-series study. *Environmental Microbiology*, 17 (10), 3581-3596.
- Turk, V., Lučić, D., Flander-Putrlle, V., Malej, A., 2008. Feeding of *Aurelia* sp. (Scyphozoa) and links to the microbial foodweb. *Marine Ecology*, 29 (4), 495-505.
- Vojvoda, J., Lamy, D., Sintes, E., Garcia, J.A.L., Turk, V., Herndl, G.J., 2014. Seasonal variation in marine-snow-associated and ambient-water prokaryotic communities in the northern Adriatic Sea. *Aquatic Microbial Ecology*, 73, 211-224.

**Zahvala**

Prof. Sket se zahvaljuje Mateji Grašič za odločujoči zadnji pregled rokopisa.

---

## INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

### 1. Types of Articles

SCIENTIFIC ARTICLES are comprehensive descriptions of original research and include a theoretical survey of the topic, a detailed presentation of results with discussion and conclusion, and a bibliography according to the IMRAD outline (Introduction, Methods, Results, and Discussion). In this category ABS also publishes methodological articles, in so far as they present an original method, which was not previously published elsewhere, or they present a new and original usage of an established method. The originality is judged by the editorial board if necessary after a consultation with the referees. The recommended length of an article including tables, graphs, and illustrations is up to fifteen (15) pages; lines must be double-spaced. Scientific articles shall be subject to peer review by two experts in the field.

REVIEW ARTICLES will be published in the journal after consultation between the editorial board and the author. Review articles may be longer than fifteen (15) pages.

BRIEF NOTES are original articles from various biological fields (systematics, biochemistry, genetics, physiology, microbiology, ecology, etc.) that do not include a detailed theoretical discussion. Their aim is to acquaint readers with preliminary or partial results of research. They should not be longer than five (5) pages. Brief note articles shall be subject to peer review by one expert in the field.

CONGRESS NEWS acquaints readers with the content and conclusions of important congresses and seminars at home and abroad.

ASSOCIATION NEWS reports on the work of Slovene biology associations.

### 2. Originality of Articles

Manuscripts submitted for publication in *Acta Biologica Slovenica* should not contain previously published material and should not be under consideration for publication elsewhere.

### 3. Language

Articles and notes should be submitted in English, or as an exception in Slovene if the topic is very local. As a rule, congress and association news will appear in Slovene.

### 4. Titles of Articles

Title must be short, informative, and understandable. It must be written in English and in Slovene language. The title should be followed by the name and full address of the authors (and if possible, fax number and/or e-mail address). The affiliation and address of each author should be clearly marked as well as who is the corresponding author.

### 5. Abstract

The abstract must give concise information about the objective, the methods used, the results obtained, and the conclusions. The suitable length for scientific articles is up to 250 words, and for brief note articles, 100 words. Article must have an abstract in both English and Slovene.

### 6. Keywords

There should be no more than ten (10) keywords; they must reflect the field of research covered in the article. Authors must add keywords in English to articles written in Slovene.

### 7. Running title

This is a shorter version of the title that should contain no more than 60 characters with spaces.



## 8. Introduction

The introduction must refer only to topics presented in the article or brief note.

## 9. Illustrations and Tables

Articles should not contain more than ten (10) illustrations (graphs, dendrograms, pictures, photos etc.) and tables, and their positions in the article should be clearly indicated. All illustrative material should be provided in electronic form. Tables should be submitted on separate pages (only horizontal lines should be used in tables). Titles of tables and illustrations and their legends should be in both Slovene and English. Tables and illustrations should be cited shortly in the text (Tab. 1 or Tabs. 1-2, Fig. 1 or Figs. 1-2; Tab. 1 and Sl. 1). A full name is used in the legend title (e.g. Figure 1, Table 2 etc.), written bold, followed by a short title of the figure or table, also in bold. Subpanels of a figure have to be unambiguously indicated with capital letters (A, B, ...). Explanations associated with subpanels are given alphabetically, each starting with bold capital letter, a hyphen and followed by the text (A - text...).

## 10. The quality of graphic material

All the figures have to be submitted in the electronic form. The ABS publishes figures either in pure black and white or in halftones. Authors are kindly asked to prepare their figures in the correct form to avoid unnecessary delays in preparation for print, especially due to problems with insufficient contrast and resolution. Clarity and resolution of the information presented in graphical form is the responsibility of the author. Editors reserve the right to reject unclear and poorly readable pictures and graphical depictions. The resolution should be 300 d.p.i. minimum for halftones and 600 d.p.i. for pure black and white. The smallest numbers and lettering on the figure should not be smaller than 8 points (2 mm height). The thickness of lines should not be smaller than 0.5 points. The permitted font families are Times, Times New Roman, Helvetica and Arial, whereby all figures in the same article should have the same font type. The figures should be prepared in TIFF, EPS or PDF format, whereby TIFF (ending \*.tif) is the preferred type. When saving figures in TIFF format we recommend the use of LZW or ZIP compression in order to reduce the file sizes. The photographs can be submitted in JPEG format (ending \*.jpg) with low compression ratio. Editors reserve the right to reject the photos of poor quality. Before submitting a figure in EPS format make sure first, that all the characters are rendered correctly (e.g. by opening the file first in the programs Ghostview or GSview – depending on the operation system or in Adobe Photoshop). With PDF format make sure that lossless compression (LZW or ZIP) was used in the creation of the \*.pdf file (JPEG, the default setting, is not suitable). Figures created in Microsoft Word, Excel, PowerPoint etc. will not be accepted without the conversion into one of the before mentioned formats. The same goes for graphics from other graphical programs (CorelDraw, Adobe Illustrator, etc.). The figures should be prepared in final size, published in the magazine. The dimensions are 12.5 cm maximum width and 19 cm maximum height (width and height of the text on a page).

## 11. Conclusions

Articles shall end with a summary of the main findings which may be written in point form.

## 12. Summary

Articles written in Slovene must contain a more extensive English summary. The reverse also applies.

## 13. Literature

References shall be cited in the text. If a reference work by one author is cited, we write Allan (1995) or (Allan 1995); if a work by two authors is cited, (Trinajstić and Franjić 1994); if a work by three or more authors is cited, (Pullin et al. 1995); and if the reference appears in several works, (Honsig-Erlenburg et al. 1992, Ward 1994a, Allan 1995, Pullin et al. 1995). If several works by the same author published in the same year are cited, the individual works are indicated with the added letters a, b, c,

etc.: (Ward 1994a,b). If direct quotations are used, the page numbers should be included: Toman (1992: 5) or (Toman 1992: 5–6). The bibliography shall be arranged in alphabetical order beginning with the surname of the first author, comma, the initials of the name(s) and continued in the same way with the rest of the authors, separated by commas. The names are followed by the year of publication, the title of the article, the full name of the journal (periodical), the volume, the number in parenthesis (optional), and the pages. Example:

Mielke, M.S., Almeida, A.A.F., Gomes, F.P., Aguilar, M.A.G., Mangabeira, P.A.O., 2003. Leaf gas exchange, chlorophyll fluorescence and growth responses of *Genipa americana* seedlings to soil flooding. *Experimental Botany*, 50(1), 221–231.

Books, chapters from books, reports, and congress anthologies use the following forms:

Allan, J.D., 1995. *Stream Ecology. Structure and Function of Running Waters*, 1<sup>st</sup> ed. Chapman & Hall, London, 388 pp.

Pullin, A.S., McLean, I.F.G., Webb, M.R., 1995. Ecology and Conservation of *Lycaena dispar*: British and European Perspectives. In: Pullin A. S. (ed.): *Ecology and Conservation of Butterflies*, 1<sup>st</sup> ed. Chapman & Hall, London, pp. 150-164.

Toman, M.J., 1992. Mikrobiološke značilnosti bioloških čistilnih naprav. Zbornik referatov s posvetovanja DZVS, Gozd Martuljek, pp. 1-7.

#### **14. Format and Form of Articles**

The manuscripts should be sent exclusively in electronic form. The format should be Microsoft Word (\*.doc) or Rich text format (\*.rtf) using Times New Roman 12 font with double spacing, align left only and margins of 3 cm on all sides on A4 pages. Paragraphs should be separated by an empty line. The title and chapters should be written bold in font size 14, also Times New Roman. Possible sub-chapter titles should be written in italic. All scientific names must be properly italicized. Used nomenclature source should be cited in the Methods section. The text and graphic material should be sent to the editor-in-chief as an e-mail attachment. For the purpose of review the main \*.doc or \*.rtf file should contain figures and tables included (each on its own page). However, when submitting the manuscript the figures also have to be sent as separate attached files in the form described under paragraph 10. All the pages (including tables and figures) have to be numbered. All articles must be proofread for professional and language errors before submission.

A manuscript element checklist (For a manuscript in Slovene language the same checklist is appropriately applied with a mirroring sequence of Slovene and English parts):

English title – (Times New Roman 14, bold)

Slovene title – (Times New Roman 14, bold)

Names of authors with clearly indicated addresses, affiliations and the name of the corresponding author – (Times New Roman 12)

Author(s) address(es) / institutional addresses – (Times New Roman 12)

Fax and/or e-mail of the corresponding author – (Times New Roman 12)

Keywords in English – (Times New Roman 12)

Keywords in Slovene – (Times New Roman 12)

Running title – (Times New Roman 12)

Abstract in English (Times New Roman 12, title – Times New Roman 14 bold)

Abstract in Slovene – (Times New Roman 12, title – Times New Roman 14 bold)

Introduction – (Times New Roman 12, title – Times New Roman 14 bold)  
Material and methods – (Times New Roman 12, title – Times New Roman 14 bold)  
Results – (Times New Roman 12, title – Times New Roman 14 bold)  
Discussion – (Times New Roman 12, title – Times New Roman 14 bold)  
Summary in Slovene – (Times New Roman 12, title – Times New Roman 14 bold)  
Figure legends; each in English and in Slovene – (Times New Roman 12, title – Times New Roman 14 bold, figure designation and figure title – Times New Roman 12 bold)  
Table legends; each in English and in Slovene – (Times New Roman 12, title – Times New Roman 14 bold, table designation and table title – Times New Roman 12 bold)  
Acknowledgements – (Times New Roman 12, title – Times New Roman 14 bold)  
Literature – (Times New Roman 12, title – Times New Roman 14 bold)  
Figures, one per page; figure designation indicated top left – (Times New Roman 12 bold)  
Tables, one per page; table designation indicated top left – (Times New Roman 12 bold)  
Page numbering – bottom right – (Times New Roman 12)

### **15. Peer Review**

All Scientific Articles shall be subject to peer review by two experts in the field (one Slovene and one foreign) and Brief Note articles by one Slovene expert in the field. With articles written in Slovene and dealing with a very local topic, both reviewers will be Slovene. In the compulsory accompanying letter to the editor the authors must nominate one foreign and one Slovene reviewer. However, the final choice of referees is at the discretion of the Editorial Board. The referees will remain anonymous to the author. The possible outcomes of the review are: 1. Fully acceptable in its present form, 2. Basically acceptable, but requires minor revision, 3. Basically acceptable, but requires important revision, 4. May be acceptable, but only after major revision, 5. Unacceptable in anything like its present form. In the case of marks 3 and 4 the reviewers that have requested revisions have to accept the suitability of the corrections made. In case of rejection the corresponding author will receive a written negative decision of the editor-in-chief. The original material will be erased from the ABS archives and can be returned to the submitting author on special request. After publication the corresponding author will receive the \*.pdf version of the paper.

ČLANKI – ARTICLES:

**Mitja MOČILAR, Rudi VEROVNIK:** Vrednotenje velikosti populacij sviščevega mravljiščarja *Phengaris alcon* (Lepidoptera: Lycaenidae) in status njegove ogroženosti na zahodnem delu Ljubljanskega barja / Evaluation of the population size of Alcon Blue *Phengaris alcon* (Lepidoptera: Lycaenidae) and its conservation status in western part of Ljubljansko barje . . . . . 3

**Tina KLENOVŠEK:** Modularity of the dorsal and lateral view of the skull in the European ground squirrel / Modularnost dorzalne in lateralne strani lobanje evropske tekunice . . . . 17

**Opeyemi Philips AKINSULIRE, Olaniran Temitope OLADIPO, Olubunmi Cecelia AKINKUNMI, Oladipo Ebenezer ADELEYE, Akinwumi Johnson AKINLOYE:** On the systematic implication of foliar epidermal micro-morphological and venational characters: diversities in some selected Nigerian species of Combretaceae / Mikromorfološke značilnosti listne povrhnjice in žilnatost listov ter implikacije za sistematiko: raznolikost izbranih nigerijskih vrst iz družine Combretaceae . . . . . 25

**Tjaša MATJAŠIČ, Tanja DREO, Zoran SAMARDŽIJA, Oliver BAJT, Tjaša KANDUČ, Tatjana SIMČIČ, Nataša MORI:** Preliminary experiments into colonization of microorganisms from activated sludge on different types of plastics / Preliminarni poskusi kolonizacije različnih tipov plastike z mikroorganizmi iz aktivnega blata . . . . . 45

**Monika NOVAK BABIČ, Nina GUNDE-CIMERMAN:** Design of species-specific primers for rapid detection and identification of *Candida parapsilosis sensu stricto* / Zasnova vrstno-specifičnih oligonukleotidnih začetnikov za hitro zaznavanje in identifikacijo kvasovke *Candida parapsilosis sensu stricto* . . . . . 63

OBLETNICA – ANNIVERSARY:

**Jasna DOLENC KOCE (ur.):** Ob 100-letnici biologije na Univerzi v Ljubljani / Centennial of biology at the University of Ljubljana . . . . . 79

