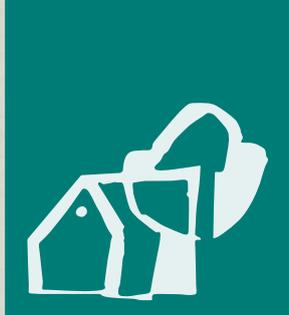


letnik 62
števila 05-2010
UDK 630
ISSN 0024-1067
Cena 4,50 EUR



revija o lesu in pohištvu

les wood



Znanstveno srečanje z javno okroglo mizo

GOZD IN LES

Dinamika ogljika: Od ekosistema do izdelka



Oblikovanje akademik Hozo Dževad, Ljubljanska grafična šola

www.gozd-les.si

www.gozdis.si

www.bf.uni-lj.si

REVOLUCIJA V SVETU ZAŠČITE LESA

SILVANOLIN - NEIZPERLJIV - OKOLJU PRIJAZEN

NOVO!
NEIZPERLJIVA
TRAJNA ZAŠČITA
ZA LES.

www.silvaprodukt.si

SILVANOLIN

V 48 URAH SE FIKSIRA
IN SE NE IZPIRA

Silvaprodukt d.o.o., Dolenjska c. 42, 1000 Ljubljana, 080 12 02

Silvanolin, okolju prijazna zaščita za les, je rezultat izključno domačega znanja zaposlenih v podjetju Silvaprodukt ter zaposlenih na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. Namenjen je zaščiti lesa pred insekti, glivami ter vsem neugodnim vremenskim vplivom. Pripravljen je iz sestavin, ki mu omogočajo najučinkovitejše delovanje proti glivam razkrojevalkam ter lesnim insektom, hkrati pa se dobro vežejo v les in se iz njega ne izpirajo. Kot topilo se pri zaščitnem pripravku uporablja voda, ki je najprijaznejše topilo. Les mora biti pred postopkom zaščite ustrezno posušen, zdrav, brez trohnobe in poškodb insektov. Pripravek je primeren za zaščito vseh vrst lesa in za vse postopke zaščite: premazovanje, namakanje, brizganje, oblivanje in vakuumsko impregnacijo. Najpomembnejša lastnost Silvanolina je, da se veže v les v 48 urah, pri čemer postane neizperljiv, zato je primeren tudi za zaščito lesa neposredno izpostavljenega vsem vremenskim nevšečnostim.

POSKRbite ZA DOLGO OBSTOJNOST LESA.

Pokličite na brezplačno številko 080 1202, www.silvaprodukt.si.



les

revija o lesu in pohištvu

Ustanovitelj in izdajatelj

Zveza lesarjev Slovenije.

Uredništvo in uprava

1000 Ljubljana, Karlovska cesta 3, Slovenija
tel. 01/421-46-60, faks: 01/421-46-64
e-pošta: revija.les@siol.net

Uredništvo in sodelavci uredništva

Glavni urednik: prof. dr. Franc Pohleven
Odgovorni urednik: doc. dr. Miha Humar
Tehnični urednik: Stane Kočar, univ. dipl. inž.
Lektoriranje: Darja Vranjek, prof. slov. in soc.

Oblikovalska zasnova revije

Boštjan Lešnjak

Tisk

Littera Picta d.o.o.

Uredniški svet

Predsednik: strok. svet. Borut Kričej
Člani: Peter Tomšič, univ. dipl. oec., Mitja Strohsack, univ. dipl. iur., mag. Miroslav Strajhar, univ. dipl. inž., Bruno Komac, univ. dipl. inž., mag. Andrej Matej, dipl. oec., Stanislav Škalič, univ. dipl. inž., Janez Pucelj, univ. dipl. inž., Igor Milavec, univ. dipl. inž., Florijan Cifrek, Edi Iskra, prof. dr. Marko Petrič, doc. dr. Milan Šernek, Zdenka Steblovnik, univ. dipl. inž., mag. Darinka Kozinc, univ. dipl. inž., mag. Majda Kanop, univ. dipl. inž., prof. dr. Franc Pohleven, Bojan Pogorevc, univ. dipl. inž.

Uredniški odbor

prof. em. dr. dr. h. c. mult. Walter Liese (Hamburg), prof. dr. Helmut Resch (Dunaj), dr. Milan Nešič (Beograd), prof. dr. Radovan Despot (Zagreb) prof. dr. Vito Hazler, doc. dr. Miha Humar, doc. dr. Manja Kitek Kuzman, Alojz Kobe, univ. dipl. inž., dr. Nike Krajnc, strok. svet. Borut Kričej, prof. dr. Jože Kušar, doc. Nada Matičič, prof. dr. Primož Oven, prof. dr. Marko Petrič, prof. dr. Franc Pohleven, mag. Marija Slovnik, doc. dr. Milan Šernek, prof. dr. dr. h. c. Niko Torelli, Stojan Ulčar, mag. Miran Zager, prof. dr. Roko Žarnič, dr. Mirko Medved, doc. dr. Tom Levanič, prof. dr. Hojka Kraigher

Letna naročnina

Posamezna številka 4,50 EUR
Dijaki in študenti 16 EUR.
Posamezniki 35 EUR.
Podjetja in ustanove 160 EUR.
Obrtniki in šole 80 EUR.
Tujina 160 EUR + poštšina.
Naročnina velja do preklica. Pisne odjave upoštevamo ob koncu obračunskega obdobja.

Transakcijski račun

Zveza lesarjev Slovenije-LES, Ljubljana, Karlovska cesta 3,
IBAN (TR): SI56 0310-0100-0031-882 pri SKB d.d., Ljubljana
SWIFT: SKBAS12X

Revija izhaja v dveh dvojnih in osmih enojnih številkah letno. Za izdajanje prispeva Ministrstvo za znanost, šolstvo in šport Republike Slovenije.

Na podlagi Zakona o davku na dodano vrednost spada revija Les po 43. členu pravilnika med nosilce besede, za katere se plačuje DDV po stopnji 8,5%.

Vsi znanstveni članki so dvojno recenzirani.

Izvečki iz revije LES so objavljeni v AGRIS, Cab International - CD-Tree ter v drugih informacijskih sistemih.

GOZD IN LES ZA ZMERAJ!

Gozdovi pokrivajo prek 60 % nacionalnega ozemlja Slovenije. Njihova površina se je od leta 1875 (737 000 ha) do danes povečala za približno 500 000 ha. Kljub dolgoletni tradiciji sonaravnega gospodarjenja z gozdom in rabe lesa posek močno zaostaja za prirastkom, kar se kaže tudi v hitrem staranju gozdov in padcu kakovosti lesa. Zato je pomembno čim bolj spodbuditi zdravo rabo lesa ob upoštevanju vseh funkcij gozdov in ohranjanju njihovega trajnega prilagajanja na spreminjajoče se okolje.

Poznavanje in upoštevanje pomena gozda in lesa v zadnjem času močno narašča, saj je obdelava lesa energetske nepotratna in okolju prijazna. Poleg tega vedno bolj prihaja v ospredje dejstvo, da so les in lesni izdelki pomembni tudi z vidika skladiščenja ogljika. Les namreč skozi celotno življenjsko dobo skladišči ogljikov dioksid. Skladiščenje ogljika v lesnih izdelkih bo po vsej verjetnosti priznано kot ponor ogljika v post-kjotskem obdobju. Poznavanje dinamike ogljika je pomembno tako z znanstvenega kot tudi s strokovnega vidika, saj je neposredno povezan z aktualnim vprašanjem prilagajanja in zmanjševanja vplivov klimatskih sprememb.

Programski skupini Les in lignocelulozni kompoziti Oddelka za lesarstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani in Gozdna biologija, ekologija in tehnologija Gozdarskega inštituta Slovenije organizirata v Tednu gozdov, v zadnjem tednu maja, znanstveno posvetovanje z naslovom GOZD in LES, namenjeno predstavitvi aktualnih znanstvenih dosežkov, prenosu teh znanj v prakso in popularizaciji obeh področij.

Zasnova posvetovanja, ki predstavlja prvo od rednih letnih srečanj s skupnim naslovom GOZD in LES, bo v letu 2010 temeljila na tematiki »DINAMIKA OGLJIKA: OD EKOSISTEMA DO IZDELKA«. Na prireditvi bodo v obliki predavanj in plenarnih predstavitev plakatov predstavljena predvsem dela mladih raziskovalcev in podoktorjev. Srečanje bomo zaključili z javno okroglo mizo o predstavljeni problematiki in aktualnih razvojnih problemih gozdarstva in lesarstva, torej leta 2010 o sooblikovanju Nacionalnega raziskovalno-razvojnega programa.

S skupnimi srečanji nameravamo nadaljevati že začeto plodno sodelovanje med obema inštitucijama in programskima skupinama: pred kratkim sta programski skupini izdali monografijo ob zaključku skupnega projekta Trajnostna raba lesa v kontekstu sonaravnega gospodarjenja z gozdovi. Verjameva, da bomo dobro sodelovali tudi v prihodnje.

Za sofinanciranje prireditve se najlepše zahvaljujemo Agenciji za raziskovalno delo RS in podjetju Silvaproduct d. o. o..

Miha Humar in Hojka Kraigher

KAKOVOSTNO SEME – KAKOVOSTNI PROIZVODI

Quality seed – quality products

Povzetek: Semena v svojih genih prenašajo potencial dreves, ki se bodo iz njih razvila. Pri naravni obnovi narava sama izloči seme s slabim genotipom, medtem ko je pri umetni obnovi ta odgovornost v rokah gozdarjev. Tradicionalne teste kakovosti semena lahko danes dopolnimo s tistimi, ki temeljijo na poznavanju dedne zasnove semena, saj postaja genetska pestrost znotraj semenskih sestojev vse bolj pomembna pri oceni kakovosti le-tega. V prispevku so opisane metode, ki temeljijo na analizi molekularskih označevalcev in omogočajo oceno genetske pestrosti v semenskih sestojih, določanje števila osebkov, s katerih je bilo seme nabrano in potrjevanje izvora gozdnega reprodukcijskega materiala. Z opisanimi metodami smo analizirali devet podzorcev semena in odraslih osebkov iz štirih semenskih sestojev smreke (*Picea abies* L. (Karst.)). Opisane metode imajo velik uporabni pomen pri zagotavljanju kakovosti semena za uporabo v gozdarstvu.

Ključne besede: dodeljevanje osebkov, genetska pestrost, kakovost semena, molekularne metode, navadna smreka, semenski sestoji, verjetnost identitete

Abstract: Seeds carry in their genes the potential of newly developing trees. In the process of natural regeneration natural processes exclude the seed with unfavourable genotype, while with artificial regeneration this responsibility is in the hands of foresters. Today, traditional seed quality tests can be complemented with molecular ones as genetic diversity within seed stands is becoming increasingly important for assessment of seed quality. Methods, based on the analysis of molecular markers that enable analysis of genetic diversity within seed stands, number of parents, from which the seed has been collected and confirmation of origin of the forest reproductive material are presented. Nine subsamples of seed and adult trees from four Norway spruce (*Picea abies* L. (Karst.)) seed stands were analysed with the described methods. The described methods are of great importance for assuring high quality of seed for the use in forestry.

Keywords: assignment methods, genetic diversity, seed quality, molecular methods, Norway spruce, seed stand, probability of identity

UVOD

V semenu je shranjena zasnova bodočih gozdov. Semena v svojih genih prenašajo potencial dreves, ki se bodo iz njih razvila. Seme s slabim genotipom bo vir neuspešnih potomcev, saj z naravno obnovo procesi selekcije izločijo osebkke, ki niso viabilni ali dovolj vitalni, da bi preživel v danem okolju. Tako poskrbi za kvalitetno genetsko zasnovo bodočega sestoja. Kjer naravna obnova ni možna, je

nujno, da za umetno obnovo uporabimo kakovosten in okolju prilagojen gozdni reprodukcijski material (GRM). S tem kar najbolj omejimo negotovosti pri osnovanju novih sestojev ter tako prihranimo čas in zmanjšamo stroške. Naravna obnova je ponavadi problematična po ujmah, v monokulturah, pri premenah monokultur v bolj naravne sestoje, idr. V zadnjem desetletju je umetna obnova v Sloveniji prisotna na površini med 450 in 750 ha letno (Poročilo Zavoda za gozdove Slovenije, 2009).

Da je seme res kakovostno in prilagojeno okolju, poskušamo zagotoviti že s samim načinom izbire semenskih sestojev, določili o najmanjšem številu dreves, s katerih seme nabiramo, s pravilno dodelavo semena in z vzgojo sadik. Pri vseh postopkih posvečamo veliko pozornosti

* Gozdarski inštitut Slovenije, Večna pot 2, SI-1000 Ljubljana, Slovenija,
e-pošta: marjana.pucko@gozdis.si

** ASP Teisendorf, Forstamtstplatz 1, 83317 Teisendorf, Nemčija

*** Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire, Večna pot 83, SI-1000 Ljubljana, Slovenija

sledljivosti GRM od sestoja do njegove ponovne vrnitve v gozd (Kraigher in Grecs, 2004)

Vendar je pri visokih vložkih v umetno obnovo potrebno objektivno preveriti, ali je seme zares kakovostno. Semenski del preverjanja kakovosti je ustaljena praksa in obsega testiranje kalivosti ali test s tetrazolom, določanje teže 1000 semen, oceno čistosti semena, izračun vsebnosti vlage in oceno zdravstvenega stanja semen (ISTA, 2004). V zadnjih petnajstih letih pa je postala genetska pestrost znotraj semenskega sestoja ključni kriterij za oceno kakovosti GRM (Geburek in Heinze, 1998). V semenskih sestojih naj bi bila višja ali vsaj enaka povprečni genetski pestrosti ostalih sestojev iste drevesne vrste. V sestojih z visoko genetsko pestrostjo se namreč skriva potencial, ki v spreminjajočem se okolju omogoča preživetje, prilagajanje in uspevanje populacij. Genetsko pestrost lahko ocenimo z uporabo različnih molekularnih označevalcev in jo primerjamo s tisto v drugih sestojih.

Priporočila, zapisana v evropskih direktivah in slovenski zakonodaji, spodbujajo uporabo lokalnega GRM, saj je ta najbolj prilagojen okolju, v katerem raste, če s provenienčnimi testi ni ugotovljeno drugače.

Cilj prispevka je na primeru navadne smreke (*Picea abies* L. (Karst.)) predstaviti in oceniti metode, s katerimi lahko objektivno določimo kakovost GRM in potrdimo njegov izvor. To so metode, ki omogočajo oceno genetske variabilnosti, preverjanje števila dreves, s katerih je bilo seme nabrano in metode, s katerimi lahko potrdimo izvor partije semena.

MATERIAL IN METODE

RASTLINSKI MATERIAL IN IZOLACIJA DNK

V analizo smo vključili štiri semenske sestoje navadne smreke (*Picea abies* L. (Karst.)): Pevc, Hrušica, Jerebikovec in Konačnik (Preglednica 1). Analizirali smo vzorce odraslih dreves, referenčnih vzorcev in vzorec iz partije nabranega semena. Oznaka »referenčni« vzorec pomeni, da smo za izolacijo DNK uporabili vzorec, ki ga je po zakonu dolžna odgovorna strokovna oseba dobavitelja dnevno posredovati pooblaščenim osebam za nadzor (Gozdarski inštitut Slovenije - GIS). Za vrste iz rodu *Picea* predstavlja referenčni vzorec en storž za vsako drevo, s katerega se seme nabira. Iz vsakega storža smo izluščili seme. Za kalitev smo naključno izbrali pet semen iz celotnega nabora, izmed skaljenih

pa potem naključno še eno klico, iz katere smo izolirali DNK. V »partiji semena« je zmešano vse seme, nabrano v istem semenskem sestoju. Iz vsake izmed treh partij smo naključno izbrali 30 semen, jih skalili in iz klic izolirali DNK. Za vsako partijo semena smo analizirali tudi kalivost po standardnem postopku (ISTA, 2004). Z namenom testiranja uporabnosti postopka izolacije DNK smo DNK izolirali tudi iz s škrobom bogatega megagametofita, to je tkiva, ki ima maternalni izvor.

DNK smo izolirali iz semena oziroma kalčkov ali megagametofita s pomočjo predpripravljenega postopka »DNeasy Plant Mini Kit« (Quiagen) iz skupno 230 semen ali odraslih dreves navadne smreke ter iz 24 megagametofitov (seme iz sestoja Pevc; ni prikazano v preglednici 1).

Kvaliteto in količino izolirane genomske DNK smo preverili na 0,8 % agaroznem gelu z gelsko elektroforezo.

ANALIZA MIKROSATELITOV

Izolirano DNK smo pomnožili v verižni reakciji s polimerazo (PCR) s sedmimi pari začetnih oligonukleotidov, v ločenih reakcijah za vsak par. Začetni oligonukleotidi označujejo sedem mikrosatelitnih lokusov jedrnega genoma: SpAGG3 (Pfeiffer in sod., 1997), EAC1F04 in EAC1G5 (Scotti in sod., 2002), PAAC3 in PAAC19 (Scotti in sod., 2000), paGB8 (Besnard in sod., 2003) in PGL15 (Rajora in sod., 2001). Reakcijska mešanica PCR v skupnem volumnu 10 μ l je vsebovala 1 \times PCR pufr; 0,2 μ M vsakega začetnega oligonukleotida; 0,2 mM vsakega izmed štirih dNTP; 2,5 mM (SpAGG3, PAAC19, paGB8, PAAC3) ali 3 mM (EAC1F04, PGL15, EAC1G5) Mg²⁺; 0,4 (EAC1G5), 0,5 (SpAGG3, PAAC3, EAC1F04, PGL15) ali 0,7 (PAAC19, paGB8) U Taq polimeraze in 1 μ l genomske DNK. PCR reakciji za lokus paGB8 smo dodali še 2 μ g/ml BSA, reakcijama za lokusa EAC1F04 in PGL15 pa 1 M betaina. Temperaturni profili in trajanje reakcij so bili enaki kot v originalnih publikacijah za posa-

Preglednica 1: Pregled vzorčenega materiala za analizo.

Vzorec	Koda in naziv sestoja	Število osebkov	Tkivo za izolacijo DNK	Tip vzorca
PE	6.0284 - Pevc	30	kalček	referenčni
PE ¹		19	iglice	odrasla drevesa
PE ²		30	kalček	partija semena
HRU	6.0137 - Hrušica	19	kalček	referenčni
HRU ²		30	kalček	partija semena
JER	1.0148 - Jerebikovec	30	kalček	referenčni
JER ²		30	kalček	partija semena
KON	2.0173 - Konačnik	23	kalček	referenčni
KON ¹		19	iglice	odrasla drevesa

mezni začetni oligonukleotidni par.

Produkte PCR smo po tri oziroma štiri združili in jih zmešali z deioniziranim formamidom in notranjim velikostnim standardom GS-600 LIZ. Produkte smo ločili s kapilarno elektroforezo na avtomatskem sekvenatorju ABI PRISM 310 (AppliedBiosystems). Elektroforegrame smo obdelali s pripadajočim programom GeneMapper in sicer tako, da smo odčitali relativne dolžine pomnoženih fragmentov.

OCENA GENETSKE PESTROSTI

Kot povprečje vseh lokusov smo izračunali naslednje kazalnike genetske pestrosti: število alelov na lokus A, število alelov neodvisno od velikosti vzorca oziroma število alelov standardizirano na najmanjši popoln multilokusni vzorec AR, število privatnih alelov APRIV, povprečno opaženo heterozigotnost HO, genetsko raznolikost HE in koeficient inbridinga FIS. Kazalnike A, AR, HE smo izračunali s programom FSTAT (Goudet, 1995); APRIV, HO s programom GenAlEx (Pekal in Smouse, 2006) in FIS s programom SpaGeDi (Hardy in Vekemans, 2002). Statistično značilnost koeficienta inbridinga smo ravno tako testirali s programom SpaGeDi z 20.000 permutacijami. Prisotnost ničelnih alelov smo preverili s programom Genepop 4.0 (Rousset, 2008).

VERJETNOST IDENTITETE IN DOLOČANJE ŠTEVILA STARŠEV

Verjetnost identitete PID za osebkke, ki so si v sorodu, smo izračunali po spodnji formuli:

$$P_{ID} = 0,25 + \left(0,5 \sum p_i^2\right)^2 + \left(0,5 \left(\sum p_i^2\right)^2\right) - \left(0,25 \sum p_i^4\right)$$

kjer je p_i frekvenca alelov (Taberlet in Luikart, 1999; Waits in sod., 2001).

Verjetnost identitete je konzervativna ocena verjetnosti, da imata dva naključno izbrana osebkka identičen genotip. PID izračunamo na podlagi nabora lokusov na številu posameznikov vključno z vzorci, ki jih preiskujemo. Če je PID 0,001, lahko v 999 od 1000 primerov razločimo dve naključno izbrani drevesi iz populacije. Ob zadosti majhni vrednosti PID lahko enoznačno določimo vsak osebek iz populacije. Kot so pokazale različne raziskave, lahko materin genotip rekonstruiramo z analizo zadosti velikega števila semen ali klic (Cremer in sod., 2003; Lexer in sod., 1999; Shanjan in sod., 2008). Pri iglavcih lahko uporabimo celo haploidni megagametofit, ki vsebuje samo materin genetski material (Cremer in sod., 2003; Scotti in sod., 2006). Število analiziranih megagametofitov za pravilno določanje materinega genotipa naj ne bi bilo manjše od šest (Cremer in sod., 2003; Scotti in sod., 2006).

Z naborom molekularnih označevalcev z zadosti nizko

vrednostjo PID lahko torej določimo število dreves, s katerih je bilo seme nabrano.

POTRJEVANJE IZVORA GRM

Za certificiranje GRM je potreben postopek, s katerim lahko preverimo, ali seme resnično prihaja iz navedenega sestoja. Na GIS moramo v skladu z Zakonom o gozdnem reprodukcijskem materialu (2002, 2004) in podrejenimi predpisi hraniti referenčne vzorce, lahko tudi kot izolirano genomsko DNK vzorcev z vsakega drevesa, s katerega se nabira seme za uporabo v gozdarstvu. Za smreko velja, da referenčni vzorci obsegajo po en storž na drevo.

Med referenčnimi vzorci in partijo semena iz istega sestoja bi morala obstajati večja podobnost kot med referenčnim vzorcem določenega sestoja in partijo semena, ki ne izhaja iz tega sestoja. Zato naj bi bila tudi genetska diferenciacija med vzorcema iz istega sestoja manjša kot med vzorcema, ki pripadata različnima sestojema. Na tem dejstvu temeljijo metode dodeljevanja osebkov referenčnim populacijam in metode na podlagi genetskih razdalj. Slednje bi morale biti manjše med različnimi vzorci iz istega sestoja kot med vzorci iz različnih sestojev.

Posamezne osebkke iz vzorcev, ki predstavljajo partijo semena (PE2, HRU2, JER2) in odrasla drevesa (PE1, KON1), smo poizkusili s šestimi metodami (preglednica 2) dodeliti referenčnim vzorcem (PE, HRU, JER, KON). Vseh šest metod je implementiranih v programu GeneClass2 (Piry in sod., 2004). Uporabili smo simulacijski algoritem Paetkau in sod. (2004). Število simuliranih posameznikov smo nastavili na 10.000.

Preglednica 2: Oznaka in uporabljene metode dodeljevanja osebkov z njihovimi avtorji.

Oznaka	Tip metode	Avtor
A	Frekvenčna	Paetkau in sod. (1995)
B	Bayesova	Rannala in Mountain (1997)
C	Bayesova	Baudouin in Lebrun (2000)
D	Genetska razdalja D_A	Nei in sod. (1983, cit. po Takezaki in Nei, 1996)
E	Standardna genetska razdalja D_S	Nei (1972)
F	Akordna genetska razdalja D_C	Cavalli-Sforza in Edwards (1967, cit. po Takezaki in Nei, 1996)

Postopek dodeljevanja osebkov je potekal po naslednjem vrstnem redu:

- ▶ Vsakega izmed 230 osebkov smreke smo dodelili enemu izmed štirih referenčnih vzorcev na podlagi najvišje verjetnosti.
- ▶ Za vsak vzorec v simulaciji smo izračunali delež osebkov, uvrščenih v določen referenčni vzorec.
- ▶ Vsak vzorec iz simulacije smo dodelili referenčnemu vzorcu z najvišjim deležem dodeljenih osebkov.

REZULTATI

KALIVOST

Kalivost, določena po standardnem postopku (ISTA, 2004), je znašala 71 % za partijo semena iz semenskega sestojka Konačnik, 81 % iz semenskega sestojka Jerebikovec in 91 % iz semenskih sestojev Hrušica in Pevc.

GENETSKA PESTROST SEMENSKIH SESTOJEV

Skupno število opaženih alelov na lokus se je gibalo med 18 na lokusu SpAGG3 in 60 na lokusu EAC1F04 in lokusu EA-C1G5. Privatni aleli so bili dokaj enakomerno porazdeljeni po različnih tipih podvzorcev. Najmanj jih je bilo v vzorcu PE1, ki predstavlja podvzorec odraslih dreves populacije Pevc, največ pa v podvzorcju HRU2, ki predstavlja partijo semena.

Povprečna opažena heterozigotnost (HO) je bila 0,75. Povprečna pričakovana heterozigotnost ali genska diverziteteta pa 0,93. Manjšo opaženo heterozigotnost od pričakovane

smo prevedli v od nič statistično značilno različen povprečni koeficient inbridginga (FIS = 0,208). FIS je bil statistično značilno različen od ničelne vrednosti v kombinacijah populacija / lokus, kjer so se pojavljali ničelni aleli (rezultati niso prikazani).

VERJETNOST IDENTITETE SORODNIH OSEBKOV

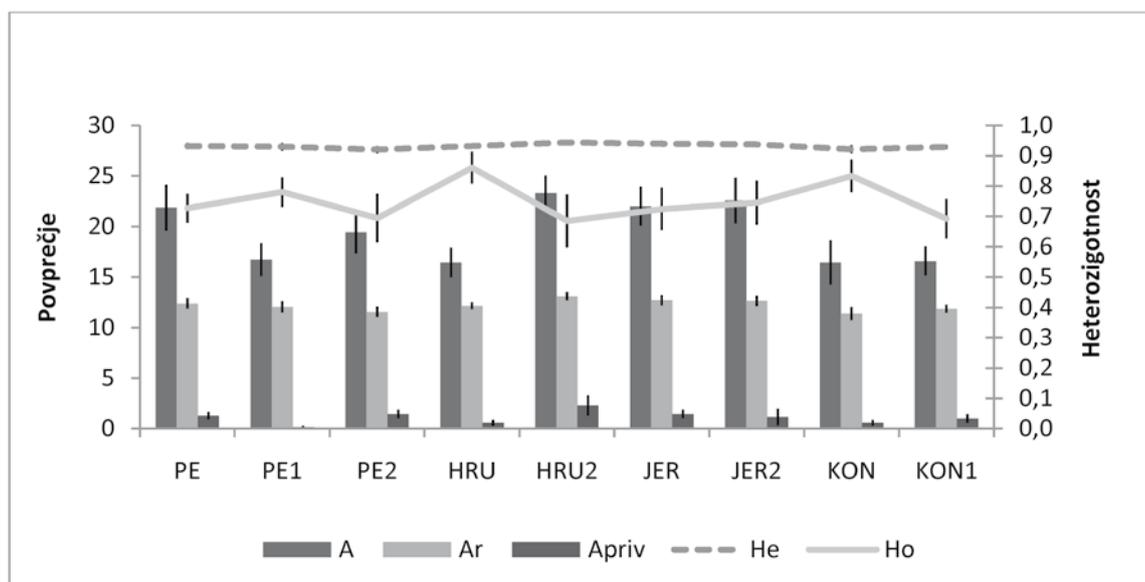
Verjetnosti, da imata dva naključno izbrana sorodna osebka iz iste populacije identičen genotip, so podane v preglednici 3. Z izbranim naborom mikrosatelitov lahko teoretično v 9.998 primerih od 10.000 ločimo dve naključno izbrani drevesi tudi, če so v izbrani populaciji prisotne družinske strukture.

POTRJEVANJE IZVORA GRM

Izvor GRM smo poskusili potrditi tako, da smo vzorce, ki so predstavljali partije semena in odrasla drevesa s pomočjo šestih metod dodeljevali referenčnim vzorcem. Seveda

Preglednica 3: Verjetnost identitete PID (Taberlet in Luikart, 1999) po populacijah. Upoštevanih je vseh sedem lokusov.

Populacija	PID
PE	$1,78 \times 10^{-4}$
HRU	$1,63 \times 10^{-4}$
JER	$1,57 \times 10^{-4}$
KON	$2,02 \times 10^{-4}$



Slika 1: Povprečne vrednosti alelnih kazalnikov. Prikazani so število alelov na lokus A, število alelov neodvisno od velikosti vzorca oz. število alelov, standardizirano na najmanjši popoln multilokusni vzorec A_r , število privatnih alelov A_{priv} , genska raznolikost H_e in povprečna opažena heterozigotnost H_o .

smo pri testiranju primernosti metod vedeli, kateri vzorci prihajajo iz istega semenskega sestaja.

Če je bil vzorec dodeljen dvema ali več referenčnim vzorcem z enakim deležem in je bil med njimi tudi pravi referenčni vzorec, štejeemo, da je vzorec pravilno dodeljen referenčnemu vzorcu.

Vse metode so se izkazale dobro pri dodeljevanju osebkov iz referenčnih vzorcev samim referenčnim vzorcem. Referenčni vzorec je bil z deležem osebkov, večjim od 0,90, vedno dodeljen sam sebi. Izjema je metoda E, s katero je bil vzorec PE dodeljen sam sebi z deležem osebkov 0,87. V štirih primerih je bil vzorec iz iste populacije kot referenčni vzorec dodeljen napačnemu referenčnemu vzorcu, dvakrat z metodo A in po enkrat z metodama D in F (preglednica 4). V treh primerih gre za vzorce, pridobljene iz partije semena, enkrat za vzorec, pridobljen iz odraslih dreves.

DISKUSIJA

Genetska pestrost preučevanih vzorcev je bila velika. Število alelov, standardizirano na najmanjši popoln multilokusni vzorec AR, ki predstavlja 10 osebkov oziroma 20 kopij genov, je bilo med vsemi podvzorcji izenačeno. Večje razlike so bile pri številu alelov A. Najverjetneje so posledica različno velikih vzorcev, saj z večanjem števila osebkov v vzorcu odkrijemo tudi alele z nižjo frekvenco, ne pa različne porazdelitve alelov med odraslimi drevesi, semeni v referenčnih vzorcih in tistih, ki predstavljajo partijo. Najbolj očitna razlika v številu alelov je med podvzorcema iz populacije Hrušica. Najverjetneje je razlika posledica zelo velikega števila privatnih alelov (alelov, ki jih najdemo le v enem podvzorcju) v podvzorcju HRU2.

Opaženo povprečno genetsko pestrost smo primerjali s kalivostjo, ki smo jo določili za partije semena, nabrane v

Preglednica 4: Delež osebkov iz semenskih sestojev smreke, dodeljenih štirim referenčnim vzorcem po šestih metodah dodeljevanja osebkov, navedenih v preglednici 2, s programom GeneClass2. Največji deleži osebkov v določenem referenčnem vzorcu so potemnjeni. Referenčni vzorci so prikazani v kurzivi. Podano je še število osebkov v vzorcu (N).

Metoda	A				B				C			
RV / V (N)	PE	HRU	JER	KON	PE	HRU	JER	KON	PE	HRU	JER	KON
PE (30)	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,97	0,00	0,00	0,03
PE1 (19)	0,84	0,00	0,16	0,00	0,63	0,11	0,21	0,05	0,63	0,05	0,16	0,16
PE2 (30)	0,77	0,07	0,13	0,03	0,40	0,23	0,27	0,10	0,37	0,20	0,20	0,23
HRU (19)	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00
HRU2 (30)	0,47	0,17	0,27	0,10	0,23	0,33	0,20	0,23	0,13	0,47	0,13	0,27
JER (30)	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,97	0,03	0,00	0,00	0,97	0,03
JER2 (30)	0,33	0,07	0,63	0,00	0,23	0,20	0,53	0,03	0,07	0,23	0,50	0,20
KON (23)	0,04	0,00	0,04	0,91	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00
KON1 (19)	0,11	0,16	0,58	0,16	0,05	0,16	0,37	0,42	0,05	0,21	0,26	0,47
Metoda	D				E				F			
RV / V (N)	PE	HRU	JER	KON	PE	HRU	JER	KON	PE	HRU	JER	KON
PE (30)	0,97	0,00	0,00	0,03	0,87	0,00	0,10	0,03	0,97	0,00	0,00	0,03
PE1 (19)	0,42	0,11	0,21	0,26	0,47	0,05	0,37	0,11	0,42	0,05	0,21	0,32
PE2 (30)	0,23	0,30	0,13	0,33	0,47	0,13	0,17	0,23	0,27	0,30	0,13	0,30
HRU (19)	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,95	0,05	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00
HRU2 (30)	0,10	0,47	0,13	0,30	0,20	0,30	0,23	0,27	0,10	0,50	0,13	0,27
JER (30)	0,00	0,00	0,93	0,07	0,03	0,03	0,90	0,03	0,00	0,00	0,97	0,03
JER2 (30)	0,07	0,27	0,43	0,23	0,10	0,17	0,53	0,20	0,07	0,27	0,43	0,23
KON (23)	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,04	0,96	0,00	0,00	0,00	1,00
KON1 (19)	0,00	0,21	0,26	0,53	0,00	0,16	0,37	0,53	0,00	0,21	0,21	0,58

RV referenčni vzorec; V vzorec

sestojih, ki so predmet te raziskave. Tako genetska pestrost kot tudi kalivost vsebujeta informacije o kakovosti semena. Povprečna genetska pestrost analiziranih podvzorcev je bila najnižja v populaciji Konačnik. Število alelov je bilo 16,5, število alelov, standardizirano na najmanjšo velikost vzorca, pa 11,6. Kalivost semena, nabranega v tej populaciji, je bila najmanjša izmed štirih analiziranih populacij in je znašala 71 %. Povprečna genetska pestrost ($A = 22,3$; $AR = 12,6$) je bila največja v populaciji Jerebikovec, kalivost semena iz te populacije pa je znašala 81 %. Kalivost 81 % je visoka, vendar je bila le-ta še višja v populacijah Pevc in Hrušica, kjer je znašala 91 %. Povprečna genetska pestrost obeh populacij je bila med tistima v populaciji Konačnik in Jerebikovec. V sestoji Pevc je bilo povprečno število opaženih alelov 19,3, število alelov standardizirano na najmanjšo velikost vzorca 12,0, v sestoji Hrušica pa 19,8 in 12,6. Pri primerjavi genetske pestrosti s kalivostjo se moramo zavedati, da gre pri prvi za pestrost dela genoma, ki ni pod vplivom selekcije, testi kalivosti pa so izvedeni v optimalnih pogojih.

Za določitev dejanskega materinega genotipa in s tem števila dreves, s katerih nabiramo seme, bi morali izolirati in pomnožiti DNK iz semenskega ovoja, ki vsebuje le materin genotip (Leadem, 1996) ali šestih (Scotti in sod., 2006) do 13 megagametofitov (glejte Cremer in sod., 2003) na referenčni vzorec (v praksi to pomeni analizo šest do 13 semen iz enega storža) in prešteti število različnih genotipov. Na podlagi izbranih mikrosatelitnih lokusov je bila verjetnost identitete PID namreč manjša od 10⁻² do 10⁻⁴, kar zadostuje za enoznačno določitev vsakega osebkov iz populacije (Waits in sod., 2001). Izolacija DNK iz semenskega ovoja kljub testiranju večjega števila protokolov ni bila uspešna. To je najverjetneje posledica majhne količine DNK v semenskem ovoju (Ziegenhagen in sod., 2003), ki je bila zaradi hranjenja na sobni temperaturi tudi degradirana. Ekstrakcija in analiza DNK iz šestih do trinajstih megagametofitov pa bi raziskavo podaljšala in močno podražila, zato smo se zadovoljili z dejstvom, da sta bili izolacija DNK iz megagametofita in PCR po v poglavju metode opisanih protokolih uspešni.

Da bi odgovorili na vprašanje, kako na podlagi semena iz partije dodeliti vzorec pravilnemu semenskemu sestoji, smo proučili več metod. Z metodami dodeljevanja osebkov referenčnim vzorcem in izračunu deleža osebkov v podvzorcju, ki so bili dodeljeni določenemu referenčnemu vzorcju, smo v vseh primerih na podlagi največjega deleža dodeljenih osebkov pravilno določili izvor referenčnega vzorca. Vse podvzorke smo na podlagi največjega deleža dodeljenih osebkov pravim referenčnim vzorcem dodelili z obema Bayesovima metodama in metodo na podlagi standardne genetske razdalje. Nobena izmed opisanih

metod ni popolnoma zanesljiva, saj so se deleži dodeljenih osebkov pravim referenčnim vzorcem za slednje tri metode gibali med 0,30 in 0,63. Za potrebe nadzora semenarske prakse zato predlagamo uporabo kombinacije metod dodeljevanja osebkov, s katerimi primerjamo neznani vzorec z vzorci v bazi molekulskih podatkov: Rannala in Mountain (1997), Baudouin in Lebrun (2000) in Nei (standardna genetska razdalja D_s , 1972). Smiselno je tudi, da v članku predstavljene metode kombiniramo z izrisom filogenetskih dreves na podlagi genetskih razdalj in izračunom parnih vrednosti F_{ST} ter testom genotipske diferenciacije (rezultati niso prikazani). Z zadnjima metodama lahko potrdimo, da med neznanim in referenčnim vzorcem ni razlik. V primeru, da vse metode povežejo isti referenčni vzorec z neznano partijo semena, lahko z veliko verjetnostjo trdimo, da ima neznani vzorec izvor v populaciji, katero predstavlja ta referenčni vzorec. Če rezultati, dobljeni po vseh naštetih metodah, niso enaki, se zanesljivost ocene zmanjša.

Z večanjem števila genetskih podatkov o sestojih oziroma populacijah bodo predstavljene metode pridobivale na pomenu. Šele takrat bodo primerjave semenskih sestojev z ostalimi podale resnično sliko o stopnji genetske variabilnosti znotraj semenskih sestojev. Hkrati pa potrebujemo za potrjevanje izvora 'heznanih' ali sumljivih partij semena čim večje število podatkov, s katerimi lahko tovrstne partije primerjamo.

ZAHVALE

Analize so bile financirane v okviru projekta mlade raziskovalke (3331-03-831659), projekta L4-9647, JGS naloge 3 in raziskovalnega programa P04-0107 »Gozdna biologija, ekologija, tehnologija« v okviru ARRS.

LITERATURA

1. **Baudouin L., Lebrun P. (2000)** An operational bayesian approach for the identification of sexually reproduced cross-fertilized populations using molecular markers. V: International Symposium on Molecular Markers for Characterizing Genotypes and Identifying Cultivars in Horticulture, Montpellier, France, International Society for Horticultural Science: 81-93
2. **Besnard G., Acheré V., Faivre Rampant P., Favre J.M., Jeandroz S. (2003)** A set of cross-species amplifying microsatellite markers developed from DNA sequence databanks in *Picea* (Pinaceae). *Molecular Ecology*, 3, 3: 380-383
3. **Cremer E., Liepelt S., Ziegenhagen B., Hussendörfer E. (2003)** Microsatellite and isozyme markers for seed source identification in silver fir. *Forest Genetics*, 10, 3: 165-170
4. **Geburek T.H., Heinze B. (1998)** Erhaltung genetischer Ressourcen im Wald-Normen, Programme, Maßnahmen. Landsberg, Nemčija, Ecomed-Verlagsgesellschaft, 332
5. **Goudet J. (1995)** FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *J Hered*, 86, 6: 485-486
6. **Hardy O.J., Vekemans X. (2002)** Spagedi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology*, 2: 618-620
7. **ISTA (2004)** International Rules for Seed Testing. Ed. 2004. Bassersdorf, Switzerland, 5-5, 5A-50
8. **Kraigher H., Grecs Z. (2004)** Operativna izvedba nove zakonodaje s področja gozdnega semenarstva in drevesničarstva. *Gozdarski vestnik*, 62, 5-6: 281-287
9. **Leadem C. (1996)** A Guide to the Biology and Use of Forest Tree Seeds BC Ministry of Forests, Victoria, 19
10. **Lexer C., Heinze B., Steinkellner H., Kampfer S., Ziegenhagen B., Glössl J. (1999)** Microsatellite analysis of maternal half-sib families of *Quercus robur*, pedunculate oak: detection of seed contaminations and inference of the seed parents from the offspring. *Theor Appl Genet*, 99: 185-191
11. **Nei M. (1972)** Genetic Distance Between Populations. *The American Naturalist*, 106, 949: 283-292
12. **Paetkau D., Calvert W., Stirling I., Strobeck C. (1995)** Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology*, 4: 347-354
13. **Paetkau D., Slade D., Burden M., Estoup A. (2004)** Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Molecular Ecology*, 13, 1: 55-65
14. **Pekall R., Smouse P.E. (2006)** GenAEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6, 1: 288-295
15. **Pfeiffer A., Olivieri A.M., Morgante M. (1997)** Identification and characterization of microsatellites in Norway spruce (*Picea abies* K.). *Genome*, 40, 4: 411-419
16. **Piry S., Alapetite A., Cornuet J.-M., Paetkau D., Baudouin L., Estoup A. (2004)** GENECLASS2: A Software for Genetic Assignment and First-Generation Migrant Detection. *J Hered*, 95, 6: 536-539
17. **Poročilo Zavoda za gozdove Slovenije o gozdovih za leto 2008. (2009)** Ljubljana, Zavod za gozdove Slovenije, 134
18. **Rajora O.P., Rahman M.H., Dayanandan S., Mosseler A. (2001)** Isolation, characterization, inheritance and linkage of microsatellite DNA markers in white spruce (*Picea glauca*) and their usefulness in other spruce species. *Mol Gen Genet*, 264, 6: 871-882
19. **Rannala B., Mountain J.L. (1997)** Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 17: 9197-9201
20. **Rousset F. (2008)** genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8, 1: 103-106
21. **Scotti I., Magni F., Fink R., Powell W., Binelli G., Hedley P.E. (2000)** Microsatellite repeats are not randomly distributed within Norway spruce (*Picea abies* K.) expressed sequences. *Genome*, 43: 41-46
22. **Scotti I., Paglia G. P., Magni F., Morgante M. (2002)** Efficient development of dinucleotide microsatellite markers in Norway spruce (*Picea abies* Karst.) through dot-blot selection. *Theor Appl Genet*, 104, 6-7: 1035-1041
23. **Scotti I., Paglia G.P., Magni F., Morgante M. (2006)** Population genetics of Norway spruce (*Picea abies* Karst.) at regional scale: sensitivity of different microsatellite motif classes in detecting differentiation. *Annals of forest science*, 63: 485-491
24. **Shanjani P.S., Vendramin G.G., Calagari M. (2008)** Microsatellite analysis for differentiation and identification of the source tree of *Fagus orientalis* Lipsky. *Iranian journal of biotechnology*, 6, 2: 85-91
25. **Taberlet P., Luikart G. (1999)** Non-invasive genetic sampling and individual identification. *Biological Journal of the Linnean Society*, 68, 1-2: 41-55
26. **Takezaki N., Nei M. (1996)** Genetic Distances and Reconstruction of Phylogenetic Trees From Microsatellite DNA. *Genetics*, 144, 1: 389-399
27. **Waits L.P., Luikart G., Taberlet P. (2001)** Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Molecular Ecology*, 10, 1: 249-56
28. **Zakon o gozdnem reprodukcijskem materialu (2002, 2004)** Ur. l. RS 58/2002, 45/2004
29. **Ziegenhagen B., Liepelt S., Kuhlenkamp V., Fladung M. (2003)** Molecular identification of individual oak and fir trees from maternal tissues of their fruits or seeds. *Trees* 17, 345-350

POLEDENODOBNE MIGRACIJE MIKORIZNIH RASTLIN IN GLIVNIH PARTNERJEV V SIMBIOZI: PRIMER RODU *TUBER*

Post-glacial migrations of mycorrhizal plants and ectomycorrhizal partners: an example of the genus *Tuber*

Povzetek: Rod *Tuber* je ektomikorizni rod gliv, razširjen v večjem delu J in JV Evrope. V raziskavi smo s filogeografskim pristopom ugotovljali, ali izbrane vrste iz rodu izkazujejo geografsko diferenciranost na nivoju genov rRNK. Iz razpoložljivih nukleotidnih zaporedij, ki izvirajo iz večjega dela areala vrst rodu *Tuber*, smo za več vrst ugotovili razporejanje in ločevanje genotipov glede na položaj ledeniških zatočišč v zadnji ledeni dobi in glede na znane poledenodobne migracijske poti haplotipov drevesnih partnerjev (hrastov). Območje Slovenije se je izkazalo za območje mešanja več genotipov variabilnih vrst. Prisotnost več genotipov ene vrste gliv nakazuje možnost križanja oziroma mešanja dveh poledenodobnih migracijskih poti, kar daje območju dodatno vrednost s stališča biotske raznovrstnosti. Poznavanje genetske pestrosti in funkcionalne povezave glivnih in rastlinskih genotipov lahko nudi usmeritve pri gospodarjenju z gozdovi, pridobivanju gozdnih proizvodov in morebitnem načrtnem gojenju drevesnih in glivnih partnerjev v simbiozi z namenom pridelave gliv.

Ključne besede: biotska raznovrstnost, ektomikoriza, filogeografija gliv, hipogeje glive, južna in jugovzhodna Evropa, molekularna filogenija

Abstract: The genus *Tuber* is an important ectomycorrhizal genus in Europe, forming symbiosis with a wide range of woody plants. In our research we aimed to apply phylogeography approach to analyse the geographical differentiation of *Tuber* species based on rDNA analysis. Available nucleotide sequences originating from S and SE Europe showed genetic differentiation and distribution in several *Tuber* species. The observed phylogenetic clades corresponded to the last glacial refugia pools and post-glacial migration paths of symbiotic plants (oaks). Based on the high number of the analysed *Tuber* ribotypes found in Slovenia, this area appears to be the encountering zone of two postglacial migration routes and an important biodiversity hot-spot. The knowledge on genetic diversity and geographic distribution of genotypes can contribute to the biodiversity and functional correlations of plant and fungal partners in ectomycorrhiza and subsequently to the forest management planning and potential cultivation of fungi.

Keywords: Biodiversity, Ectomycorrhiza, Phylogeography of fungi, Hypogeous fungi, South and Southeast Europe, Molecular phylogeny

UVOD

V kvartarju so se v času med in po poledenitvah številne drevesne vrste odzivale na spremembe v okolju z migracijami (Wilkinson, 1998). V hladnejših obdobjih, predvsem v zadnjem dlje trajajočem hladnem obdobju pred približno

11–10 tisoč leti je bil precejšnji del Evrope pokrit z ledom, preostale dele so preraščale polpuščavske stepe (Adams in Faure, 1997). Gozdna vegetacija, vključno z ektomikoriznimi partnerji, je bila omejena le na posamezne gorske verige polotokov južne in jugovzhodne Evrope (Adams in Faure, 1997; Randi, 2007). Z ogrevanjem ozračja in umikanjem ledenega pokrova se je do pred ca. 5000 leti oblikovala klima, razporeditev vegetacije (tudi gozdov) in raz-

* Gozdarski inštitut Slovenije, Večna pot 2, SI-1000 Ljubljana, e-pošta: tine.grebenc@gozdis.si

poreditev genotipov znotraj vrst, kot jo poznamo danes (Grove in Rackham, 2001).

Rod *Tuber* predstavlja 86 različnih vrst gliv iz skupine askomicet (Tuberaceae, Ascomycotina, Fungi). Rod je splošno razširjen in številčen predvsem v zmernem in mediteranskem pasu vseh kontinentov (Kirk in sod., 2008). Posamezne vrste so v glavnem omejene na en kontinent, oziroma se morfološko podobne vrste med kontinenti na molekularni ravni jasno ločijo na vrstnem nivoju (Wang in sod., 2006, Grebenc in sod., v pripravi). Znotraj družine Tuberaceae je rod *Tuber* najboljšežnejši ektomikorizni rod (Agerer, 1987–2006), ki tvori izključno podzemne (hipogeje) trosnjake (Paolocci in sod., 2004; Læssøe in Hansen, 2007). Podzemna rast razmnoževalnih struktur je povezana s specifičnim načinom razširjanja, saj vse vrste iz rodu *Tuber* ob zorenju trosnjakov proizvajajo značilne hlapne (volatilne) substance, ki privlačijo raznašalce spor. Spore prenašajo v večji meri insekti ter mali sesalci, ostali načini prenosa (na primer z vodo, prenašanjem zemlje ipd.) so redkejši (Frank in sod., 2006). Način prenosa spor tako poteka na relativno kratkih razdaljah, podobno kot pri arbuskularno mikoriznih glivah (Wilkinson, 1998), in s tem v tesnejši povezavi z migracijami drevesnih partnerjev v ektomikorizi.

Filogeografija je veda, ki razlaga geografsko razporeditev osebkov glede na filogenetsko raznolikost populacij znotraj vrste na osnovi genealogije izbranih genov (Avice, 2000). V literaturi ni znanih veliko primerov filogeografije gliv. Eden od pomembnih razlogov je ta, da zaradi velikega pomena razširjanja na velike razdalje glive (predvsem spore gliv) kažejo široko razširjenost. To velja predvsem za nekatere sprobne vrste (Moncalvo in Buchanan, 2008). Značilne geografske vzorce razporejanja posameznih filogenetskih skupin višjih gliv so do sedaj ugotavljali za ektomikorizne gobane (Boletales) na področju Pacifika (Halling in sod., 2008) in za skupino nemikoriznih (sprobnih) podzemnih bazidiomicet Hysterangiales (Hosaka in sod., 2008). Podatkov o filogeografiji ektomikoriznih vrst, ki tvorijo izključno podzemne trosnjake (npr. rod *Tuber*), kljub velikemu pomenu v gozdnih ekosistemih, še ni.

Namen naše študije je prikazati načine ugotavljanja znotraj vrstne pestrosti na ravni DNK in razložiti opaženo pestrost s filogeografskim pristopom. Za potrditev hipoteze o somigracijah partnerjev v simbiozi kot modela izbora in somigracij najprimernejših genotipov obeh partnerjev glede dogajanja v preteklosti in glede na današnje ekološke razmere, smo analizirali izbrana nukleotidna zaporedja za rod *Tuber* in predhodno objavljene migracijske poti potencialnih drevesnih partnerjev v ektomikorizi.

METODOLOGIJA

IZBOR PODATKOV IN ANALIZE

Za filogeografske analize lahko uporabljamo katerokoli informativno regijo genoma vzorca, ki je jasno določen do vrste in zanj obstajajo zadostni podatki o nahajališču. Za glive iz rodu *Tuber* je v javno dostopnih bazah nukleotidnih zaporedij deponirano zadovoljivo število nukleotidnih zaporedij, pretežno regije rDNK, ki pa so v večji meri brez podatkov o izvoru, predvsem zaradi komercialnih interesov. Za zagotovitev zadostne pokritosti celotnega areala analiziranih vrst s kvalitetnimi in informativnimi spremljajočimi podatki za območje J in JV Evrope, smo poleg zaporedij, deponiranih v javno dostopnih bazah podatkov NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) in UNITE (<http://unite.ut.ee/>), v analize vključili tudi nukleotidna zaporedja lastnih predhodnih študij (Marjanović in sod., 2009; Grebenc in sod., v pripravi).

FILOGENETSKA ANALIZA GLIVNIH PARTNERJEV

V filogenetsko analizo in kasneje filogeografsko opredelitev smo vključili 92 različnih nukleotidnih zaporedij iz rodu *Tuber*, tako da smo zajeli vrste, ki so izkazovale znotraj vrstno variabilnost v predhodnih študijah, ter izbrane nevariabilne oziroma stabilne vrste. Vsi vzorci so bili na osnovi morfoloških znakov določeni do vrste. Za ugotavljanje filogenetskih odnosov lahko uporabimo kateregakoli od številnih orodij in matematičnih pristopov izdelave filogenetskega drevesa, ki za izbrana nukleotidna zaporedja omogočajo optimalne rezultate.

Filogenetsko analizo rodu *Tuber* smo izvedli na nukleotidnih zaporedjih, poravnanih v spletni verziji programa MAFFT (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/index.html>). Poravnavo zaporedij smo naredili s funkcijo za vzporejanje nukleotidnih zaporedij »E-INS-I« (Kalloh in sod., 2005). Filogenetski položaj smo določili s programom PHYML c2.4.5 in izdelali ML (maximum likelihood) filogenetsko drevo. Filogenetsko drevo ML za izbrana nukleotidna zaporedja smo izdelali z uporabo modela substitucij GTR - Generalised Time Reversible model (Tavaré, 1986). Končno filogenetsko drevo smo oblikovali in uredili v programu MEGA 4.

GEOGRAFSKA PORAZDELITEV HAPLOTIPOV DREVESNIH PARTNERJEV IN SOVPADANJE S FILOGENETSKO PORAZDELITVIJO GLIVNIH PARTNERJEV V EKTOMIKORIZI

Na osnovi razpoložljivih podatkov herbarijskega materiala za analizirane vzorce iz rodu *Tuber* (Grebenc in sod., v pripravi) se na rastiščih največkrat kot potencialni ektomikorizni partnerji pojavljajo hrasti (*Quercus* spp.) in beli

gabri (*Carpinus* spp.). Poledeniške migracijske poti hrastov so jasno diferencirane glede na območja refugijev zadnje poledenitve in smo jih povzeli po Petit in sod. (2002) in Ferris in sod. (1998). Za razliko od hrastov je geografska razporeditev haplotipov belih gabrov (*Carpinus betulus* in *C. orientalis*) manj ugodna za pojasnjevanje dobljenih filogenetskih rezultatov, saj večji del vseh razpoložljivih vzorcev iz rodu *Tuber* izvira iz območja enega prevladujočega haplotipa obeh vrst. Poleg tega rod danes ni razširjen na Pirenejskem polotoku, kot enem od območij ledenodobnih zatočišč (Grivet in Petit, 2003).

REZULTATI IN DISKUSIJA

FILOGEOGRAFIJA – SHEMATSKI PREGLED METODE IN REZULTATI ANALIZ ZA ROD *TUBER*

Filogeografski pristop nam poleg povezovanja genetskih in geografskih podatkov omogoča testiranje številnih hipotez, vezanih na sorodstvene odnose, porazdelitev vrst in mehanizmov, ki vodijo speciacijo in posredno navezovanje na razlage vplivov geologije, klime itn., na biotsko raznovrstnost analizirane skupine (Hickerson in sod., 2010). Informacije in nukleotidna zaporedja smo analizirali z izbranim filogenetskim pristopom in izdelali filogenetsko drevo, ki prikazuje sorodstvene odnose v rodu in znotrajvrstno pestrost nekaterih morfološko stabilnih vrst (Slika 1).

Analizirane vrste izhajajo iz treh glavnih področij ledeniških refugijev (Apeninski, Balkanski in Pirenejski polotok) in poledeniških migracijskih poti v centralni in južni Evropi. Največjo filogenetsko diferenciacijo kaže vrsta *Tuber* sp. 1, znotraj katere na osnovi analiziranih nukleotidnih zaporedij obstaja pet različnih končnih grozdov, od katerih trije sovpadajo z ledeniškiimi refugiji in poledeniškimi migracijami hrastov. Diferenciacija znotraj morfološke vrste *Tuber* sp. 2 je manj značilna, ločita se le dve skupini genotipov, prva omejena na Balkanski polotok in druga, ki sega od Slovenije preko večjega dela zahodne Evrope.

SOMIGRACIJE EKTOMIKORIZNIH GLIV IN DREVENIH PARTNERJEV

Migracijske poti rastlinskih vrst v začetku holocena, predvsem po zadnji ledeni dobi, so relativno dobro znane, tako na osnovi palinoloških raziskav, kot tudi iz značilne geografske razporeditve genotipov (haplotipov) analiziranih vrst (Adams in Faure, 1997; Randi, 2007; Ballian in sod., 2006). Za razliko od drevesnih partnerjev je manj znanega o pomenu in (so)migraciji glivnih partnerjev v ektomikorizi (Wilkinson, 1998). Dogodki, ki bi lahko pripeljali do diferenciacije gliv na genetskem nivoju med posameznimi refugiji in kasneje migracijskimi potmi, so:

- ▶ Umikanje termofilne in zmerne vegetacije z ektomi-

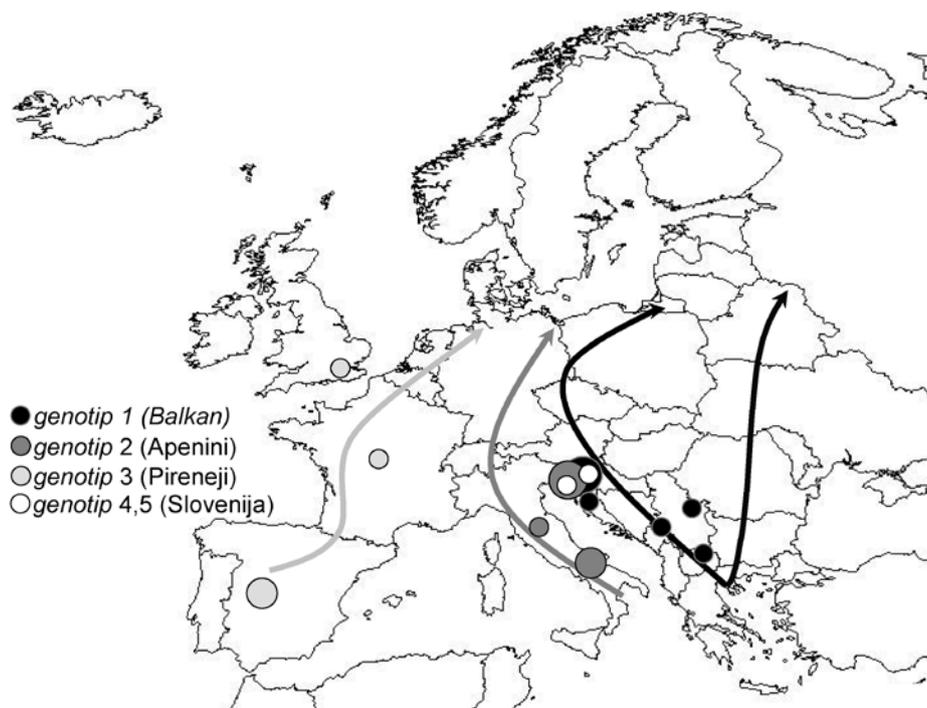
koriznimi glivami v južne predele Evrope, pretežno na hribovite dele polotokov, kjer se je ohranila v refugiju v času mlajšega drias, pred ca. 10.500 leti (Randi, 2007)

- ▶ Zmanjševanja pestrosti in števila drevesnih in predvidoma tudi ektomikoriznih partnerjev v času ledene dobe. Tako je v obdobju mlajšega drias (10.500–6.000 pr.n.š.) prišlo do t.i. ozkega grla (Adams in Faure, 1997), kar so dokazali pri ektomikorizni vrsti *Tuber melanosporum* (Murat in sod., 2004).
- ▶ Po umiku ledu konec mlajšega drias, in najkasneje do ca. 5.000 let pr.n.š., so se preživeli genotipi rastlin in njihovih partnerjev v ektomikorizi postopno začeli vračati v ponovno ugodna rastišča osrednjih delov Evrope, predvsem v smeri SV in SZ (za primer hrastov glej Petit in sod., 2002), dokler niso dosegli današnje razširjenosti (Dawson, 1996).
- ▶ Na območjih, kjer so se migracijske poti križale ali mešale, je prišlo do pojavljanja večjega števila genotipov iste vrste. Posledica mešanja je velika biološka raznovrstnost teh območij (Myers in Cowling, 1999). Področje Slovenije je tak primer vroče točke (Mršič in Gantar, 1997) za nekatere vrste ektomikoriznih gliv.

Rod *Tuber* je s stališča biotske raznovrstnosti na območju južne (Montecchi in Sarasini, 2000; Jeandroz in sod., 2008) in jugovzhodne Evrope (Halász in sod., 2005, Piltaver in Ratoša, 2006; Marjanović in sod., 2009) dobro poznan in v zadnjem desetletju zadovoljivo vzorčen, filogeografsko pa je bila do sedaj opredeljena le vrsta *Tuber melanosporum* (Murat in sod., 2004).

Filogenetska študija je podprla predhodno opažene razlike genov rRNK znotraj posameznih vrst (Pomarico in sod., 2007, Jeandroz in sod., 2008, Marjanović in sod., 2009, Grebenc in sod., v pripravi). Korelacija z geografskim izvorom je pokazala, da se nekatere vrste iz posameznega filogenetskega grozda značilno pojavljajo vzdolž razporeditve enega od haplotipov hrastov (Slika 2). Rezultati potrjujejo predhodno opažena razporejanja genotipov za vrsto *Tuber melanosporum*, kjer so avtorji uspeli povezati migracijske poti haplotipov hrastov in genotipov gomoljike na področju Francije in severne Italije (Murat in sod., 2004).

Kot zanimivo območje mešanja dveh različnih filogenetskih tipov obeh variabilnih vrst se je pokazalo območje Slovenije, predvsem prehodni del med Dinarskim in Submediteranskim področjem. Dobljeni rezultati potrjujejo predvidene dogodke v preteklosti, vključno s poledeniškimi migracijami, saj velika molekularna pestrost (Grebenc in sod., v pripravi) nakazuje na možnost križanja oziroma mešanja dveh migracijskih poti na tem področju. To daje omenjenemu območju dodatno vrednost s stališča biotske raznovrstnosti. Poznavanje genetske pestrosti in funkcionalne povezave glivnih in rastlinskih genotipov sta nujna tudi za uspešno obnavljanje gozda, usmerje-



Slika 2: Geografska distribucija genotipov variabilnih vrst iz rodu *Tuber*, glede na poledeniške migracijske poti hrastov (povzeto po Petit in sod., 2002). Krogi predstavljajo genotipe in področje vzorčenja trosnjakov.
Figure 2: Geographic distribution of genotypes from the variable *Tuber* species in regard to the postglacial migration of oak haplotypes (adapted from Petit et al., 2002). Dots represent genotype and the area of ascocarp sampling.

no sajenje, dolgoročno stabilnost gozdnega ekosistema in končno tudi kot usmeritev pri morebitnem načrtnem gojenju drevesnih in glivnih partnerjev v simbiozi z namenom pridelave gliv.

ZAHVALE

Večino uporabljenih sekvenc smo povzeli po člankih Marjanović in sod., 2009 in Grebenc in sod., (v pripravi). Vsem soavtorjem se najlepše zahvaljujemo za možnost uporabe podatkov. Analizo in pripravo publikacije so sofinancirali projekti EUREKA E!3835 EUROAGRI- CULTUBER "Improvement of truffle cultivation via novel quality control, soil analysis and inoculation methods", SYNTHESYS ESTAF-1729, CRP »Konkurenčnost Slovenije 2006–2013« V4-0492 (ARRS in MKGP) in Raziskovalni program P04-0107 »Gozdna biologija, ekologija, tehnologija« v okviru ARRS. Andreju Verliču se zahvaljujemo za tehnično pomoč pri urejanju besedila.

LITERATURA

1. Adams J.M., Faure H. (1997). QEN members. Review and Atlas of Palaeovegetation: Preliminary land ecosystem maps of the world since the Last Glacial Maximum (1997) Oak Ridge National Laboratory, TN, USA. <http://www.esd.ornl.gov/projects/qen/adams1.html> (17. 3. 2010)
2. Agerer R. (1987–2006) Colour Atlas of Ectomycorrhizae. 13th ed. Einhorn-Verlag Schwabisch Gmund, München, (loč. pag.)
3. Avise J.G. (2000) Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, USA, 447
4. Ballián D., Grebenc T., Božič G., Melnik V., Wraber T., Kraigher H. (2006) History, genetic differentiation and conservation strategies for disjunct populations of *Sibiraea* species from Southeastern Europe and Asia. Conservation Genetics, 7: 895–907
5. Dawson A.G. (1996) Ice age Earth: late Quaternary geology and climate. Routledge, New York, 293
6. Ferris C., King R.A., Väinölä R., Hewitt G.M. (1998) Chloroplast DNA recognizes three refugial sources of European oaks and suggests independent eastern and western immigration to Finland. Heredity, 80: 584–593
7. Frank J.L., Barry S., Southworth D. (2006) Mammal mycophagy and dispersal of mycorrhizal inoculum in Oregon White oak woodlands. Northwest Science, 80, 4: 264–273
8. Grivet D., Petit R.J. (2003) Chloroplast DNA phylogeography of the hornbeam in Europe: Evidence for a bottleneck at the outset of postglacial colonization. Conservation Genetics, 4: 47–56
9. Grove A.T., Rackham O. (2001) The nature of Mediterranean Europe: An ecological history. Yale University Press, New Haven, CT, 384
10. Halász K., Bratek Z., Szego D., Rudnoy S., Racz I., Laszity D.,

- Trappe J.M. (2005)** Tests of species concepts of the small, white, European group of *Tuber* spp. based on morphology and rDNA ITS sequences with special reference to *Tuber rapaeodorum*. *Mycological Progress*, 4: 281-290
11. **Halling R.E., Osmundson T.W., Neves M.-A. (2008)** Pacific boletales: Implication for biogeographic relationship. *Mycological Research*, 112, 4: 437-447
 12. **Hickerson M.J., Carstens B.C., Cevander-Bares J., Crandall K.A., Graham C.H., Johnson J.B., Rissler L., Victoriano P.F., Yoder A.D. (2010)** Phylogeography's past, present and future: 10 years after *Avise*, 2000. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 54, 1: 281-301
 13. **Hosaka K., Castellano, M.A., Spatafora, J.W. (2008)** Biogeography of Hysterangiales (Phallomycetidae, Basidiomycota). *Mycological Research*, 112, 4: 448-462
 14. **Jeandroz S., Murat C., Wang Y., Bonfante P., Le Tacon F. (2008)** Molecular phylogeny and historical biogeography of the genus *Tuber*, the »true truffles«. *Journal of Biogeography*, 35, 5: 815-829
 15. **Katoh K., Kuma K., Toh H., Miyata T. (2005)** MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Research*, 33, 2: 511-518
 16. **Kirk P.M., Cannon P.F., Minter D.W., Stalpers J.A. (2008)** *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*, 10th edition. CABI Publishing, Surrey, UK., 708
 17. **Læssøe T., Hansen K. (2007)** Truffle trouble: what happened to the Tuberales? *Mycological Research*, 111: 1075-1099
 18. **Marjanović Ž., Grebenc T, Marković M., Glišić A., Milenković, M. (2009)** Ecological specificity and molecular diversity of truffles (genus *Tuber*) originating from mid-west of the Balkan Peninsula. *Sydowia* (in print)
 19. **Moncalvo J.-M., Buchanan P.K. (2008)** Molecular evidence for long distance dispersal across the Southern Hemisphere in the *Ganoderma applanatum-australe* species complex (Basidiomycota). *Mycological Research*, 112, 4: 425-436
 20. **Montecchi A., Sarasini M. (2000)** *Fungi ipogei d'Europa*. A.M.B. Fondazione Centro Studi Micologici, Vicenza, Italy, 714
 21. **Mršič N., Gantar P. (1997)** Biotic diversity in Slovenia : Slovenia - the »hot spot« of Europe. Ministry for Environment and Spatial Planning, Ljubljana, 129
 22. **Murat C., Diez J., Luis P., Delaruelle C., Dupre C., Chevalier G., Bonfante P., Martin F. (2004)** Polymorphism at the ribosomal DNA ITS and its relation to postglacial re-colonisation routes of the Perigord truffle *Tuber melanosporum*. *New Phytologist*, 164: 401-411
 23. **Myers N., Cowling R.M. (1999)** Mediterranean Basin. V: Hotspots: Earth's Biologically Richest and Most Endangered Terrestrial Ecoregions. Mittermeier R.A. (ur.), Meyers N. (ur.), Robles Gil P. (ur.), Mittermeier C.G. (ur.), CEMEX, Mexico: 254-267
 24. **Paolocci F., Rubini A., Riccioni C., Topini F., Arcioni S. (2004)** *Tuber aestivum* and *Tuber uncinatum*: two morphotypes of two species? *FEMS Microbiology Letters*, 235: 109-115
 25. **Petit R.J., Brewer S., Bordács S., Burg K., Cheddadi R., Coart E., Cottrell J., Csaikl U.M., van Dam B.C., Deans J.D., Fineschi S., Finkeldey R., Glaz I., Goicoechea P.G., Jensen J.S., König A.O., Lowe A.J., Madsen S.F., Mátyás G., Munro R.C., Popescu F., Slade D., Tabbener H., de Vries S.M.G., Ziegenhagen B., de Beaulieu J.-L., Kremer A. (2002)** Identification of refugia and post-glacial colonization routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence. *Forest Ecology and Management*, 156: 49-74
 26. **Piltaver A., Ratoša I. (2006)** Prispevek k poznavanju podzemnih gliv v Sloveniji. *Gozdarski Vestnik*, 64, 7/8: 303-312, 329-330
 27. **Pomarico M., Figliuolo G., Rana G.L. (2007)** *Tuber* spp. biodiversity in one of the southernmost European distribution areas. *Biodivers. Conserv.*, 16: 3447-3461
 28. **Randi E. (2007)** Phylogeography of South European mammals. V: *Phylogeography of Southern European refugia*. Weiss S. (ur.), Ferrand N. (ur.), Springer, 101-126
 29. **Tavaré S. (1986)** Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA Sequences. *American Mathematical Society: Lectures on Mathematics in the Life Sciences*, 17: 57-86
 30. **Wang Y., Tanm Z.M., Zhang D.C., Murat C., Jeandroz S., Le Tacon F. (2006)** Phylogenetic relationships between *Tuber pseudoexcavatum*, a Chinese truffle and other *Tuber* species based on parsimony and distance analysis of four different gene sequences. *FEMS Microbiology Letters*, 259: 269-281
 31. **Wilkinson D.M. (1998)** Mycorrhizal fungi and Quaternary plant migrations. *Global Ecology and Biogeography Letters*, 7: 137-140

IDENTIFICATION OF ECTOMYCORRHIZAL TYPES IN A WHITE POPLAR (*POPULUS ALBA* L.) PLANTATION NEAR NOVI SAD

Identifikacija tipov ektomikorize v nasadu belega topola (*Populus alba* L.) pri Novem Sadu

Abstract: Our objective was to describe and identify types of ectomycorrhiza in a white poplar (*Populus alba* L.) plantation in the vicinity of Novi Sad, Vojvodina. Identification was achieved by combining morphological and anatomical descriptions with molecular methods (sequencing of ITS region in ribosomal DNA). Distinct types of ectomycorrhiza were observed and they were photographed and briefly described according to morphological, anatomical and molecular characteristics. Four types of ectomycorrhiza were identified to the species level (*Tuber rufum* Pico, *Inocybe squamata* J.E. Lange, *Hebeloma vaccinum* Romagn, *Hymenogaster citrinus* Vittad), six were determined to the genus level (*Tomentella* sp. 1 *Tomentella* sp. 2, *Tomentella* sp. 3, *Tomentella* sp. 4, *Inocybe* sp., *Tuber* sp. 1, *Tuber* sp. 2), additional two types of ectomycorrhiza were determined to the family level of the fungal partner (*Cortinariaceae* and *Thelephoraceae*), one type was identified to the ordo level (*Agaricales*) and one ectomycorrhizal fungus was only classified as belonging to *Ascomycetes*.

Key words: ectomycorrhiza, white poplar, morphological-anatomical characterization, rDNA ITS region, sequencing

Izvleček: Namen raziskave je bil opisati in identificirati tipe ektomikorize v nasadu belega topola (*Populus alba* L.) pri Novem Sadu v Vojvodini. Tipe smo identificirali s kombinacijo morfoloških in anatomskih opisov z molekularnimi metodami (sekveniranje ITS regije v ribosomalni DNK). Mikroskopske preparate ektomikorize smo posneli in na kratko opisali. Do vrste smo identificirali štiri tipe ektomikorize (*Tuber rufum* Pico, *Inocybe squamata* J. E. Lange, *Hebeloma vaccinum* Romagn, *Hymenogaster citrinus* Vittad), šest do rodu (*Tomentella* sp. 1 *Tomentella* sp. 2, *Tomentella* sp. 3, *Tomentella* sp. 4, *Inocybe* sp., *Tuber* sp. 1, *Tuber* sp. 2), dva tipa ektomikorize smo identificirali do nivoja družine glivnega partnerja (*Cortinariaceae* in *Thelephoraceae*), en tip je bil identificiran le to nivoja reda (*Agaricales*) in eden le do skupine *Ascomycetes*.

Ključne besede: ektomikoriza, beli topol, morfološko-anatomska identifikacija, ITS regija rDNK, sekveniranje

1. INTRODUCTION

Establishment, growth and survival of trees in most temperate and boreal forests depend on colonization with ectomycorrhizal (ECM) fungi. Mycelium of ectomycorrhizal fungi represents the main component of forest ecosystems which link biotic with abiotic factors. ECM fungi

successfully take water, organic and inorganic nutrients from soil and translocate them to fine roots of plants from which they obtain carbohydrates in return (Smith and Read, 2008).

Seedlings colonized with appropriate fungal species and strains are favored in comparison to uncolonized ones in making contacts with water and nutrients as well as with other organisms in soil (Kraigher, 1996). It has been demonstrated by several investigators (Molina et al., 1992; Smith and Read, 2008) that in addition to increased nu-

* Institute of lowland forestry and environment, Antona Čehova 13d, 21000 Novi Sad, Serbia, tel. +38121540383, fax +38121540385, e-mail: marinakatanic44@gmail.com

** Slovenian forestry institute, Večna pot 2, 1000 Ljubljana, Slovenia

trient uptake, which is the most significant benefit of mycorrhiza, this symbiotic relationship offers numerous other benefits: enhanced plant efficiency in absorbing water, reduced fertilization and irrigation requirements, increased drought tolerance, increased pathogen resistance, protection against damage from heavy metals and other pollutants, minimization of various plant stresses, improvement of seedling growth and survival and improvement of soil structure by the extramatrical hyphal network.

The functional compatibility and stress tolerance of ectomycorrhizal types is species specific, and therefore the information on the ectomycorrhizal community structure can provide valuable information about physiology of forest trees and functioning of forest ecosystems (Kraigher et al., 2007).

In the last decade, poplars have become one of the most interesting tree species for biotechnology. Besides their commercial importance, they combine many biotechnological advantages, such as rapid growth, simple *in vitro* propagation and the existence of genetic transformation systems (Fladung and Ahuja, 1996). Also, poplars are good candidates for use in phytoremediation because they have deep roots, cycle large amounts of water and grow rapidly (Newman et al., 1997). Poplars routinely form functional mycorrhizal associations with ectomycorrhizal (EM) fungi and arbuscular mycorrhizal (AM) fungi simultaneously (Molina et al., 1992) which can benefit them in establishment and growth in extreme conditions and makes them suitable for reforestation and reclamation purposes.

Since ectomycorrhizae are significantly beneficial for their host, the aim of this work was to describe and identify types of ectomycorrhiza in a white poplar (*Populus alba* L.) plantation in vicinity of Novi Sad, Vojvodina.

2. MATERIAL AND METHODS

1. SAMPLING

ECM roots were isolated from soil samples collected in the experimental field of the Institute of lowland forestry and environment (N 45° 17' 25, 5" E 19° 53' 38", 73 m a. s. l.) placed near village Kač, 20 km from Novi Sad, Srbija. The average annual precipitation is 597 mm and the average yearly temperature is 11°C (Katić et al., 1979). Climate is temperately continental and the soil type is classified as fluvisol. The sampling plot is a white poplar plantation of cca twenty years old poplar trees mixed with *Vitis vinifera* L., *Robinia pseudoacacia* L., *Acer negundo* L., *Sambucus nigra* L., and *Cornus sanguinea* L. The site is not flooded and the ground water level at the site oscilated below 2 m. Also, humidity of the soil surface layer was low.

Soil samples were collected in August 2007 and November 2008, at a distance of about 1 m from the tree trunk; the same five trees were included in both samplings. A soil core of 274 ml volume, 3,5 cm in diameter and 18 cm deep, was used for taking standardized samples (Kraigher, 1999). The total number of samples was ten, 5 taken in 2007 and 5 in 2008. Soil samples were stored at 4 °C for up to one month and one day prior to analysis submerged in cold water. Roots were carefully washed from soil and ECM tips were selected and separated in water under a dissecting microscope.

2. IDENTIFICATION OF ECTOMYCORRHIZAE

Identification of the fungal partner in ectomycorrhiza was achieved by combining morphological and anatomical descriptions with molecular methods. Types of ECM were analyzed and identified after morphological and anatomical characteristics with a binocular Olympus SZX 12 and microscope Olympus BX 51 (enlargement 100-2000x) according to published descriptions (Agerer, 1987-2002; Agerer et al., 2001-2006) and methodology described by Kraigher (1996). Identification with molecular methods was based on PCR amplification of ITS (Internal Transcribed Spacer) regions within nuclear ribosomal DNA. This molecular marker is considered as the best for fungus differentiation at the species level (Gardes and Bruns, 1993). After DNA extraction and amplification of the ITS region with ITS 1f and ITS 4 primer pair, excision and purification (Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System (Promega)), sequencing was performed commercially at MacroGen Inc. (Seoul, Rep. of Korea). Species, genus or family of ectomycorrhizal fungi were determined by comparing our sequence to the ones found in GenBank database (GenBank sequence with maximal identity to our sequence is given in Table 1). New sequences were added to and also published in GenBank. The detailed protocol for identification of ECM types with molecular methods was described by Katanić et al. (2008).

3. RESULTS AND DISCUSSION

In the white poplar plantation, fifteen ectomycorrhizal types were described and identified (a selection is presented in Figure 1). Four types of ectomycorrhiza were identified to the species level (*Tuber rufum* Pico, *Inocybe squamata* J.E. Lange, *Hebeloma vaccinum* Romagn, *Hymenogaster citrinus* Vittad), six were determined to the genus level (*Tomentella* sp. 1 *Tomentella* sp. 2, *Tomentella* sp. 3, *Tomentella* sp. 4, *Inocybe* sp., *Tuber* sp. 1, *Tuber* sp. 2), additional two types of ectomycorrhiza were determined to the family level of the fungal partner (Cortinariaceae and Thelephoraceae), one type was identified to ordo level (Agaricales) and one ectomycorrhizal fungus was only

Table 1. Descriptions of ectomycorrhizal types and molecular identification of fungal partner from the white poplar plantation

Designated identity code of ECM type	Ramification	Shape	Surface	Colour	Rhizo-morphs	Mantle anatomy	Hyphae	Anastomoses	Cystidia	Molecular identification (GenBank code, max identity%)
MK001-Srb001-SLO10001	Irregularly pinnate, monopodial-pinnate	straight, bent	smooth	brown, golden	not observed	plectenchymatous and pseudoparenchymatous	not observed	not observed	not observed	<i>Inocybe squamata</i> J.E. Lange (AM882780, 99%)
MK002-Srb002-SLO10002	simple, monopodial-pinnate	slightly bent	smooth	dark brown, brown, golden-brown	not observed	pseudoparenchymatous -Q, between M and L type according to Agerer (1987-2002)	wavy, intrahyphal hyphae	not observed	not observed	<i>Tuber rufum</i> Pico (EF362475, 99%)
Tip MK003-Srb003-SLO10003	simple	straight	smooth, shiny, with sand	cream	not observed	plectenchymatous and transitional -H type according to Agerer (1987-2002)	not observed	not observed	not observed	<i>Inocybe</i> sp. (FJ210736.1, 96%)
Tip MK004-Srb004-SLO10004	simple, monopodial-pinnate monopodial pyramidal	straight, slightly bent	grainy	golden	observed	pseudoparenchymatous -M type according to Agerer (1987-2002), plectenchymatous	with clamps	not observed	N type according to Agerer (1987-2002)	<i>Tomentella</i> sp. based on anatomical characterisation
Tip MK005-Srb005-SLO10005	simple, monopodial-pinnate	straight, slightly bent	cottony, long spiny, with soil	dark brown, mat	not observed	pseudoparenchymatous -L type according to Agerer (1987-2002), rozet-ta like	with clamps	not observed	not observed	<i>Thelephoraceae</i> (DQ150115.1, 96%)
Tip MK006-Srb006-SLO10006	simple, monopodial-pinnate, monopodial-pyramidal	straight, slightly bent	smooth, grainy with sand	white with brown spots, or brown with white spots	A type according to Agerer (1987-2002)	pseudoparenchymatous -L, M types according to Agerer (1987-2002), plectenchymatous	with clamps	not observed	not observed	<i>Cortinariaceae</i> (FJ210730.1, 99%)
MK007-Srb007-SLO10007	simple, monopodial-pinnate	straight	smooth	brown-golden	not observed	pseudoparenchymatous -Q, L types according to Agerer (1987-2002), plectenchymatous	not observed	not observed	not observed	<i>Tomentella</i> sp. (EU 668207.1, 97%)
MK008-Srb008-SLO10008	simple, monopodial-pinnate	straight, bent	smooth, short spiny	light brown	not observed	pseudoparenchymatous -P, L types according to Agerer (1987-2002), plectenchymatous	with clamps	not observed	with clamps	<i>Tomentella</i> sp. (DQ974780.1, 96%)
MK009-Srb009-SLO10009	simple, monopodial-pyramidal	straight, bent	woolly-cottony	dark brown	not observed	pseudoparenchymatous -P type according to Agerer (1987-2002)	with clamps, numerous, with ramifications	not observed	not observed	<i>Tomentella</i> sp. (EU668215.1, 96%)
MK010-Srb010-SLO10010	simple, pinnate	straight, bent	smooth	light brown,	not observed	pseudoparenchymatous -M type according to Agerer (1987-2002)	not observed	not observed	A type according to Agerer (1987-2002)	<i>Tuber</i> sp. (AJ879691.1, 98%)
MK011-Srb011-SLO10011	simple, pinnate	straight, bent, tortuous	smooth	light brown, brown, sometimes tips are lighter	not observed	pseudoparenchymatous -M type according to Agerer (1987-2002)	not observed	not observed	A type according to Agerer (1987-2002)	<i>Tuber</i> sp. (AY634173.1, 99%)
MK012-Srb012-SLO10012	simple, pinnate	straight, bent	smooth with em. hyphae or woolly-cottony	white, shiny, cream, white with brown spots	not observed	plectenchymatous -C type according to Agerer (1987-2002)	with clamps	not observed	not observed	<i>Agaricales</i> (AJ879662.1, 99%)
MK013-Srb013-SLO10013	simple, pinnate, pyramidal	bent, tortuous	woolly-cottony	white, shiny, cream	observed	plectenchymatous -B type according to Agerer (1987-2002)	with clamps and septas, ramified	observed	not observed	<i>Hebeloma vaccinum</i> Romagn (AY320396.1, 99%)
MK014-Srb014-SLO 1014	simple, pinnate	bent, tortuous	smooth	brown	not observed	pseudoparenchymatous -M, L types according to Agerer (1987-2002)	not observed	not observed	not observed	<i>Ascomycete</i> (AY969730.1, 95%)
MK015-Srb015-SLO10015	simple, pinnate	straight	smooth	brown	not observed	pseudoparenchymatous -M, L type according to Agerer (1987-2002)	not observed	not observed	not observed	<i>Hymenogaster citrinus</i> Vittad (EU784360.1, 99%)

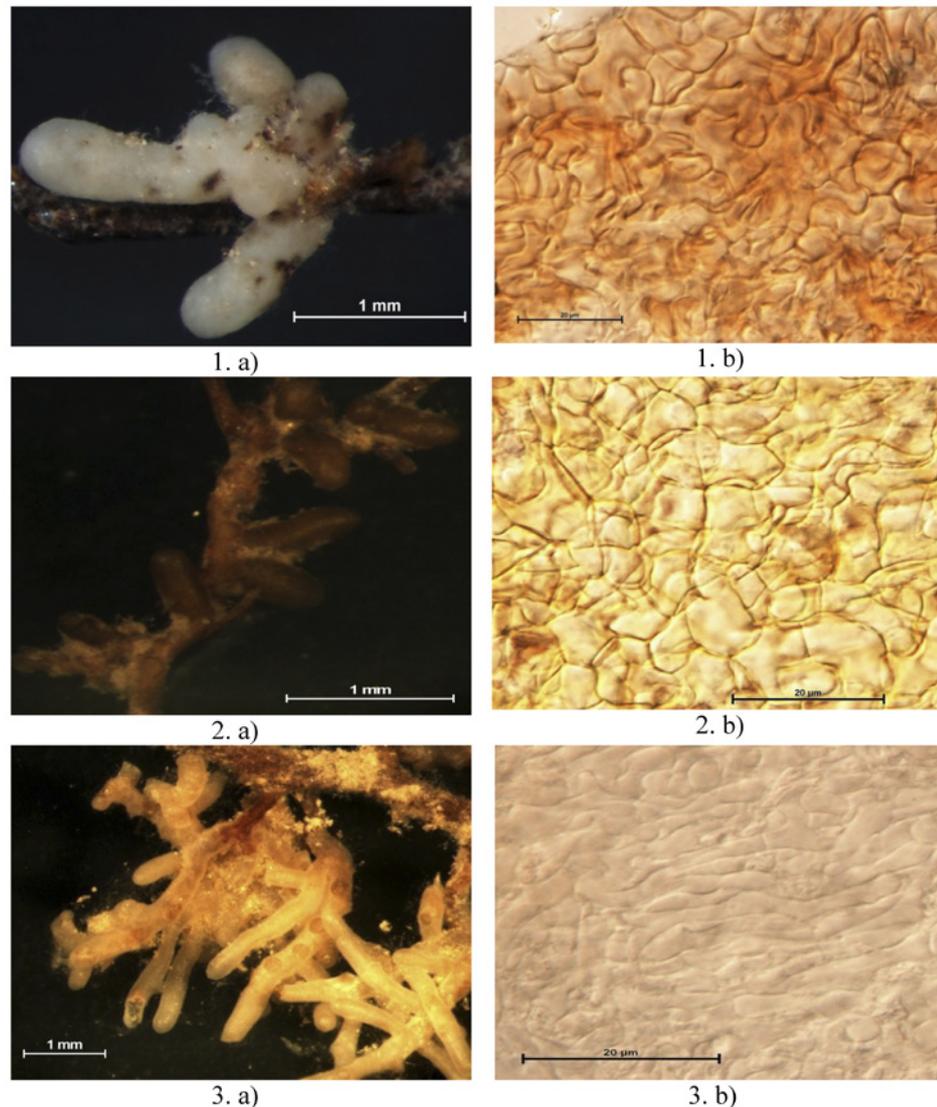


Figure 1. Selected ectomycorrhizal types from the white poplar plantation near Novi Sad

1.a) – Mycorrhizal system of ectomycorrhizal type MK006-Srb006, 1.b) – plectenchymatous mantle of ectomycorrhizal type MK006-Srb006, bar represents 20 µm (photo Katanić, 2007); 2.a) Mycorrhizal system of ectomycorrhizal type MK007-Srb007, 2.b) – pseudoparenchymatous mantle of ectomycorrhizal type MK007-Srb007, bar represents 50 µm (photo Katanić, 2008); 3.a) Mycorrhizal system of ectomycorrhizal type MK012-Srb012, 3.b) – plectenchymatous mantle of ectomycorrhizal type MK012-Srb012, bar represents 20 µm (photo Katanić, 2008)

classified as an Ascomycete. The characterised ECM types are described in Table 1. The abundance of different ECM types was not quantified, however, *Tuber rufum* Pico and type MK006-Srb006-SLO10006 (Cortinariaceae) dominated in 2007 samples and type MK012-Srb012-SLO10012 (Agaricales) was present in most samples in 2008.

Among fifteen ectomycorrhizal types identified in the white poplar plantation, four types belonged to genus *Tomentella* and one to Thelephoraceae family, meaning that *Tomentella* species were very abundant at the inve-

stigated site. Members of Thelephoraceae family, especially genus *Tomentella* are known members of ectomycorrhizal community on poplars. According to Jakucs et al. (2005) tomentelloid ECM are constant, diverse and abundant members of the ECM communities in temperate continental broad-leaved forests. Species *T. pilosa* Burt and *T. subtestacea* Bourdot & Galzin are described in detail in *Colour Atlas of Ectomycorrhizae* (Agerer, 1987–2002) as exclusive poplar symbionts. Since five types of the fifteen found on the plantation belong to Thelephoraceae, this

work showed a relatively high abundance of this family in our experimental field.

Examining the ECM community of transgenic hybrid aspen Kaldorf et al. (2004) observed 23 morphotypes. However, six mycobionts dominated, forming roughly 90 % of all ectomycorrhizas: *Cenococcum geophilum*, *Laccaria sp.*, *Phialocephala fortinii*, two different members of Thelephoraceae family, and one member of the Pezizales.

Investigating ECM communities associated with aspen growing in a heavy metal contaminated site, Krpata et al. (2008) recorded 54 ECM types. The taxonomical groups with the highest belowground species richness were *Tomentella* (17 species), *Inocybe* (6), *Cortinarius* (5), *Hebeloma* and *Tuber* (each 3).

In mixed wood dominated by American aspen, Visser et al. (1998) recorded 22 types of ectomycorrhizal fungi. Dominating types, which were also most abundant in all treatments were *Cenococcum geophilum*, *Cortinarius spp.*, *Russula spp.* and *Tomentella spp.* Few years later, Cripps (2001) recorded over 54 species of ectomycorrhizal fungi occurring in symbiosys with the same species. The fungi were all Basidiomycota, primarily Agaricales, and one Aphylllophorales (*Thelephora terrestris* Fr.) distributed in seven families: Amanitaceae, Russulaceae, Tricholomataceae, Cortinariaceae, Paxillaceae, Boletaceae, and Thelephoraceae. The dark-spored Cortinariaceae was the most diverse family, with 25 species of *Cortinarius*, *Inocybe* and *Hebeloma* occurring in aspen stands. Members of Cortinariaceae family were also abundant in our plantaion.

Although the fungus *Cenococcum geophilum* is a generalist often found on forest trees and poplars especially in dry soil conditions (Visser et al., 1998; Kaldorf et al., 2004; Krpata et al., 2008) it was not found in our investigation. We could speculate that this is due to a relatively low number of samples or because of dominance of *Tuber rufum* and type MK006-Srb006-SLO10006 (Cortinariaceae) in 2007 and type MK012-Srb012-SLO10012 (Agaricales) in 2008.

Differences in composition of ECM fungi between localities depend on different plant species as a host and on different site conditions. Also, ectomycorrhizal fungi are unevenly distributed in the soil because water and nutrients in soils also have an uneven distribution. It is also known, that diversity and abundance of mycorrhizal fungi varies with changes of their habitats, and that ECM fungi can be used as an indicator of environmental pollution (Kraigher et al., 2007). In order to determine the condition of the poplar plantation and poplar trees and monitor its changes, diversity of ectomycorrhize should be monitored seasonally, which will also be our next approach. Plantation management should be adjusted to current condition of poplar trees.

4. LITERATURE

1. **Agerer R. (Ur., 1987–2002)** Colour Atlas of Ectomycorrhizae 1st-12th Edition. Einhorn-Verlag, Schwäbisch Gmünd, Germany
2. **Agerer R., Danielson R.M., Egli S., Ingleby K., Luoma D., Treu R. (Ur., 2001– 2006)** Descriptions of ectomycorrhizae 1st – 10th Vol. Einhorn-Verlag, Schwäbisch Gmünd, Germany.
3. **Cripps C. L. (2001)** Mycorrhizal Fungi of Aspen Forests: Natural Occurrence and Potential Applications USDA Forest Service Proceedings RMRS-P-18.
4. **Fladung M., Ahuja M. R. (1996)** Gene transfer in aspen. Schmidt E. R. Hankeln T. (eds) Transgenic organisms and biosafety. Springer, Berlin Heidelberg New York
5. **Gardes M., Bruns T. D. (1993)** ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes- application to the identification of ectomycorrhizae and rusts. Molecular ecology, 2: 113-118
6. **Jakucs E., Kovacs G. M., Szedlay G., Eros-Honti Z. (2005)** Morphological and molecular diversity and abundance of tomentelloid ectomycorrhizae in broad-leaved forests of the Hungarian Plain. Mycorrhiza, 15: 459-470
7. **Kaldorf M., Renker C., Fladung M., Buscot F. (2004)** Characterization and spatial distribution of ectomycorrhizas colonizing aspen clones released in an experimental field. Mycorrhiza, 14: 295-306
8. **Katanić M., Grebenc T., Hrenko M., Štupar B., Galić Z., Orlović S., Kraigher H. (2008)** First identification of ectomycorrhizal types in white poplars stand (*Populus alba* L.) near Novi Sad. Topola. 181/182: 49-59 (in Serbian)
9. **Katić P., Đukanović D., Đaković P. (1979)** Climate of SAP Vojvodina, Faculty of agriculture in Novi Sad Institute of field and vegetable crops (in Serbian)
10. **Kraigher H. (1996)** Tipi mikorize: taksonomija, pomen, aplikacija. Zbornik gozdarstva in lesarstva, 49: 33-66
11. **Kraigher H. (1999)** Diversity of types of ectomycorrhizae on Norway spruce in Slovenia. Phytion, 39, 3: 199-202
12. **Kraigher H., Al Sayegh-Petkovšek S., Grebenc T., Simon P. (2007)** Types of ectomycorrhiza as pollution stress indicators: case studies in Slovenia. Environ Monit Assess, 128, 1:31–45
13. **Krpata D., Peintner U., Langer I., Walter J. F., Schweiger P. (2008)** Ectomycorrhizal communities associated with *Populus tremula* growing on a heavy metal contaminated site. Mycological research, 112, 9: 1069-1079
14. **Molina R., Massicotte H., Trappe J. M. (1992)** Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosys:community-ecological consequences and practical implications. In: Allen M.F. (ed) Mycorrhizal functioning: an integrative plant-fungal process. Chapman & Hall, New York, 357-423
15. **Newman L. A., Strand S., E, Choe N., Duffy J., Ekuan G., Ruszaj M., Shurleff B. B., Wilmoth J., Heilman P., Gordon M. P. (1997)** Uptake and Biotransformation of Trichloroethylene by Hybrid Poplars. Environ. Sci. Technol., 31: 1062-1067
16. **Smith S. E., Read D. J. (2008)** Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, Cambridge, 815
17. **Visser S., Maynard D., Danieson R. M. (1998)** Response of ecto- and arbuscular fungi to clear-cutting and the application of chipped aspen wood in a mixedwood site in Alberta, Canada. Applied Soil Ecology, 7: 257-269

VPLIV INTERPRETACIJE STATUSA DROBNIH KORENIN NA OCENO DOLGOŽIVOSTI DROBNIH KORENIN BUKVE (*FAGUS SYLVATICA* L.)

Influence of fine root status interpretation on estimates of root longevity of European beech (*Fagus sylvatica* L.)

Povzetek: Minirizotroni so akrilne prozorne cevi, primerne za dolgotrajno in situ spremljanje drobnih korenin rastlin v tleh. V minirizotronih so drobne korenine redno fotografirane, na slikah pa okularno določen njihov status. Korenine klasificiramo na žive, mrtve in izginule. Ta delitev korenin je osnova za nadaljnjo statistično obdelavo podatkov za izračun dolgoživosti korenin. Značilno za metodo minirizotronov je veliko število s posnetkov izginulih korenin, zaradi herbivorov, preraščanj drugih korenin, nejasnih posnetkov ali drugih neznanih vzrokov. Zaradi tega je skupina izginulih korenin zelo pomembna za interpretacijo rezultatov ugotavljanja dolgoživosti. Analizirali smo izbrane posnetke drobnih korenin, katere smo tri leta snemali v minirizotronih ob eni provenienci bukve (*Fagus sylvatica* L.) v mednarodnem provenienčnem poskusu na Kamenskem hribu. V prispevku obravnavamo preliminarne rezultate izbora zaporednih slikanj korenin in ugotovljamo potencialno veliko vlogo določevanja statusa opazovanih korenin na oceno njihove dolgoživosti.

Ključne besede: bukev, dolgoživost drobnih korenin, *Fagus sylvatica*, minirizotroni, preživetvena analiza Kaplan-Meier

Abstract: Minirhizotrons, transparent acrylic tubes inserted in the soil, are well suited for long term, non destructive observations of fine roots. In minirhizotrons, fine roots are regularly photographed and on images root status is visually evaluated. This evaluation gives background for further statistical assessment and estimation of root longevity. It is inherent in the minirhizotron technique that there will be large numbers of roots disappearing from images due to various reasons. We evaluated selected pictures from minirhizotrons, installed at one provenance at the international European beech (*Fagus sylvatica* L.) provenance trial on Kamenski hrib. In our preliminary results we demonstrate a potentially big impact of early root status evaluation on their longevity estimates.

Keywords: European beech, *Fagus sylvatica*, fine root longevity, Kaplan-Meier survival analysis, minirhizotron

UVOD

Drobne korenine (korenine s premeri < 1 mm) imajo v primerjavi s svojo dimenzijo za rastlino velik pomen pri pridobivanju vode in hranil iz tal. Dolgo je veljalo, da zaradi svoje kratke življenjske dobe rastlina v njihovo izgradnjo investira tudi do 33 % lastne neto primarne pro-

dukcije (Jackson in sod., 1997), ob predpostavljaju, da je povprečna dolgoživost drobnih korenin približno 1 leto. Če korenine živijo dlje, to seveda močno spremeni red velikosti vpliva drobnih korenin na krogotok ogljika v tleh. Dominantne teorije (Hendrick in sod., 1996) predpostavljajo, da so v revnih ekosistemih korenine dolgožive, medtem ko so v s hranili bogatih tleh kratkožive. Rezultati raziskav v zadnjem času nakazujejo na veliko dolgoživost korenin (Tierney in sod., 2002).

* Gozdarski inštitut Slovenije, Večna pot 2, 1000 Ljubljana, e-pošta: peter.zeleznik@gozdis.si

Minirizotroni, transparentne akrilne cevi, vstavljene v zemljo, so namenjene opazovanju drobnih korenin in situ. Še posebej so primerne za študije dolgoživosti drobnih korenin. Korenine so slikane v rednih presledkih in na slikah razvrščene v skupine kot žive, mrtve in izginule korenine. Analiza preživetja po metodi Kaplan in Meier (1958), pogosto uporabljena statistična metoda za izračunavanje dolgoživosti drobnih korenin (Majdi in sod., 2001; Tierney in sod., 2001; Majdi in sod., 2005; Strand, Pritchard in sod., 2008), deli vse opazovane korenine v dve skupini: »izločene« in »vključene«. Kot izločene označimo vse korenine, ki so še vedno žive na koncu opazovalnega obdobja in pa korenine, prisotne na posnetkih ob začetku snemanja. Kot »vključene« pa se označijo vse korenine, ki so med opazovanjem odmrle. Poseben problem predstavlja posebna skupina korenin, ki med opazovanjem zaradi različnih razlogov s slik izginejo, zaradi česar ne vemo, kakšna je njihova usoda (Slika 1). Izginule korenine so lahko mrtve in razgrajene, v tem primeru bi bilo korektno, da jih štejemo med »vključene«. Vendar pa so izginule korenine lahko še vedno žive in so samo izginile iz vidnega polja zaradi mikropremikov talnih delcev oz. korenin samih ali preraščanja sosednjih korenin. V tem primeru bi jih lahko šteli v skupino »izločenih« (Børja in sod., 2009).

Za potrebe prihodnjih raziskav življenjske dobe drobnih korenin smo preizkusili vpliv naše odločitve, kako razvrstiti izginule korenine, na izračun dolgoživosti korenin, po vzoru raziskovalcev iz Skandinavije (Børja in sod., 2009).

MATERIAL IN METODE

Za ugotavljanje dolgoživosti korenin bukve (*Fagus sylvatica* L.) smo na ploskvah treh izbranih provenienc bukve v mednarodnem provenienčnem poskusu na Kamenskem hribu v letu 2006 vstavili 15 minirizotronskih cevi. Cevi so bile v smeri juga vstavljene pod kotom 600 do matične

podlage. Na vsaki ploskvi smo namestili 5 minirizotronov, in sicer jugovzhodno od izbranih drevesc, približno 15 cm do 30 cm od debelc. S snemanji smo začeli eno leto po vstavljanju, s tem smo omogočili stabilizacijo cevi in korenin. V vsaki cevi opravljamo dve snemanji, in sicer v smeri vzhoda in zahoda.

S snemanji smo začeli junija 2007 v 14-dnevnih intervalih, v kolikor so vremenske razmere to dopuščale. Zadnji posnetki v letu 2007 so bili narejeni decembra. Preliminarna analiza posnetkov je pokazala, da lahko povečamo čas med snemanji, saj so bile spremembe na koreninah opazne v daljših periodah, kot so bile uporabljene pri naših opazovanjih. Ker za osnovo ocenjevanja razvoja korenin uporabljamo njihovo število, smo v skladu z izsledki drugih raziskovalcev (Johnson in sod., 2001) zmanjšali frekvenco snemanja na 4 tedne. Leta 2008 smo s snemanji začeli v januarju 2008 in zaključili novembra 2008, v letu 2009 pa smo snemanja izvajali od marca do konca novembra.

Za zajemanje slik se uporablja minirizotronska kamera proizvajalca Bartz (Bartz Technology Corporation, Santa Barbara, CA, USA) s pripadajočim programom za zajemanje slik BTC I-Cap in prenosnim računalnikom za shranjevanje slik.

Za analizo digitalnih posnetkov v našem primeru uporabljamo program Winrhizo Tron MF podjetja Regent Instruments (Canada). Vsaka posamezna vidna korenina na posnetkih med analizo dobi svojo številko, tako da ji lahko sledimo čez vse obdobje snemanj. Vsaki korenini se manualno s pomočjo računalniške miške določi premer in dolžino. Bele in rjave korenine različnih odtenkov štejemo pod »žive« korenine. »Mrtve« korenine so na pogled črne, zgrbančene in iz njih čez daljše časovno obdobje ne izraščajo nove korenine. Korenine, ki so s slik izginile, se označijo kot »izginule« in jih lahko iz analize izključimo v skupino »izločene korenine« ali pa jih v analizo vključimo v skupino »mrtve – vključene korenine«.



Slika 1: Primer izginulih korenin; na levi sliki vidni beli mikorizirani koreninski vršički, ki pa na desni niso več prisotni (časovna razlika med slikama je 4 tedne)

Pri dodatnih označevanjih živih, mrtvih in izginulih korenin se je pokazala pomanjkljivost uporabljenega programskega paketa, zato v tem prispevku prikazujemo samo izbor analiziranih slik 548 korenin, analiziranih v minirizotronih ob provenienci P64.

STATISTIČNA ANALIZA

Za izračun dolgoživosti se opažene korenine klasificirajo po predlogi Isabelle Børja s sod. (2009): (1) žive že ob prvem snemanju, (2) prvič opažene v kasnejših snemanjih, (3) mrtve pred zadnjim snemanjem, (4) žive ob zadnjem snemanju, (5) izginule med snemanji. Vse korenine z lastnostma (1) in (4) so bile označene kot »izločene« (censored), korenine z lastnostmi (2) in (3) so bile označene kot »vključene« (non-censored). V analizi smo izginule korenine enkrat šteli med izločene in drugič med neizločene. Življenjska doba vsake drobne korenine, skupaj z zgoraj omenjeno klasifikacijo, predstavlja vhodne podatke za analizo preživetja (Kaplan in Meier 1958).

REZULTATI

Podatki za prikaz so bili pridobljeni z analizo izbora slik iz minirizotronske cevi proveniencie P64 (Nizbor, Češka republika).

Na posnetkih smo v obdobju 2007–2009 določili 548 korenin. Od teh je bilo 15 % korenin takoj izločenih iz analize, saj so bile prisotne v slikah pred začetkom poskusa. 85 % korenin se je pojavilo med poskusom, od teh jih je bilo 40 % živih in prisotnih ob koncu snemanj, zaradi česar smo jih prav tako izločili iz analize. 42 % opazovanih korenin je v času poskusa izginilo s slik, njihove usode ni mogoče natančno ugotoviti. Za 3 % korenin lahko trdimo, da so odmrle (Preglednica 1).

Z analizo preživetja po metodi Kaplan in Meier (1958) pri pristopu z iz analize izključenimi izginulimi koreninami nismo uspeli izračunati podatka o povprečni življenjski dobi drobnih korenin. Število vključenih korenin je bilo premajhno.

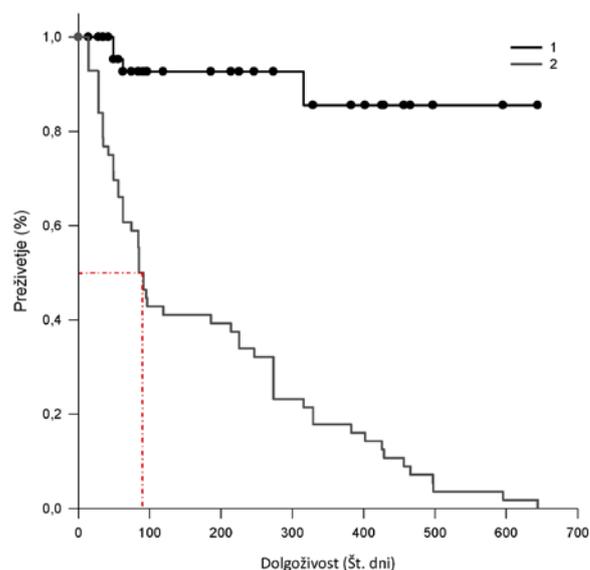
Preglednica 1: Število vključenih korenin, opazovanih v minirizotronih po izločitvi ali vključitvi izginulih korenin.

P64	Brez izginulih korenin		Z vključenimi izginulimi koreninami	
	Vključene korenine (n)	Vključene korenine (%)	Vključene korenine (n)	Vključene korenine (%)
548	16	3	247	45

Preglednica 2: Življenjska doba drobnih korenin bukve (v dnevih) proveniencie P64; uporabljena je ocena Kaplan-Meier (1958), izginule korenine so vključene ali izključene iz analize.

	Izključene izginule korenine	Vključene izginule korenine + sn
Proveniencia P64	Premalo število vključenih korenin, dolgoživosti ni možno oceniti	91 ± 7

Analiza preživetja



Slika 2: Graf s krivuljama preživetja: krivulja 1 predstavlja rezultat analize z izključenimi izginulimi koreninami, krivulja 2 pa rezultat analize z vključenimi izginulimi koreninami – rdeča črtkana črta označuje povprečno dolgoživost drobnih korenin.

Z vključenimi izginulimi koreninami pa smo prišli do rezultata (preglednica 2): ugotovili smo, da korenine bukve proveniencie P64 povprečno živijo 91 dni. Za to oceno je značilna tudi zelo majhna standardna napaka.

DISKUSIJA

Na slikah iz minirizotronov je zelo težko ali celo nemogoče zagotovo določiti, ali so iz slik izginule korenine mrtve (razgrajene ali požrte), ali pa so žive, a nevidne zaradi pre-

mika korenin, prekrivanja drugih korenin oz. prisotnosti kondenza ali biofilma na minirizotronskih ceveh. Odločitev, da izginule korenine štejejo med mrtve, vpliva na končno oceno dolgoživosti korenin in značilno skrajša čas, potreben za statistično značilen rezultat (Børja in sod., 2009). Iz literature zasledimo, da vključevanje izginulih korenin v analizo preživetja podceni dolgoživost korenin za približno 50 %.

Odločitev za izločitev izginulih korenin iz nadaljnje analize se zdi statistično gledano tehtna, saj lahko drugače dobimo rezultate, ki močno podcenjujejo dolgoživost korenin. Praktične izkušnje, pridobljene med analizo velikega števila slik, prav tako podpirajo to trditev, čeprav z našimi preliminarnimi rezultati tega še ne moremo podpreti.

ZAHVALA

Raziskava poteka v okviru programske skupine P4-0107 in projekta mladega raziskovalca (PŽ) pod mentorstvom prof. dr. Hojke Kraigher. Za pomoč pri uvajanju v metodo se zahvaljujemo dr. Isabelle Børja, pri kateri se je izpopolnjeval PŽ v okviru STSM v COST akciji E38. Za skrben pregled članka in se zahvaljujem prof. dr. Hojki Kraigher.

LITERATURA

1. **Børja I., Lange H., Helmisaari H., Steffenrem A. (2009)** How to statistically treat disappeared fine roots for longevity estimates from minirhizotrons. V: International Symposium Root Research and Applications, RootRAP. Boku – Vienna, Austria
2. **Hendrick R., Pregitzer K. (1996)** Applications of minirhizotrons to understand root function in forests and other natural ecosystems. *Plant and Soil*, 185, 2: 293-304
3. **Jackson R. B., Mooney H. A., Schulze E. -D. (1997)** A global budget for fine root biomass, surface area, and nutrient contents. V: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 94: 7362-7366
4. **Johnson M. G., Tingey D. T., Phillips D. L., Storm M. J. (2001)** Advancing fine root research with minirhizotrons. *Environmental and Experimental Botany* 45, 3: 263-289
5. **Kaplan E. L., Meier P. (1958)** Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *Journal of the American Statistical Association*, 53, 282: 457-481
6. **Majdi H., Andersson P. (2005)** Fine Root Production and Turnover in a Norway Spruce Stand in Northern Sweden: Effects of Nitrogen and Water Manipulation. *Ecosystems*, 8, 2: 191-199
7. **Majdi H., Damm E., Nylund J. E. (2001)** Longevity of mycorrhizal roots depends on branching order and nutrient availability. *New Phytologist*, 150, 1: 195-202
8. **Strand A. E., Pritchard S. G., McCormack M. L., Davis M. A., Oren R. (2008)** Irreconcilable Differences: Fine-Root Life Spans and Soil Carbon Persistence. *Science*, 319, 5862: 456-458
9. **Tierney G. L., Fahey T. J. (2001)** Evaluating minirhizotron estimates of fine root longevity and production in the forest floor of a temperate broadleaf forest. *Plant and Soil*, 229, 2: 167-176
10. **Tierney G. L., Fahey T. J. (2002)** Fine root turnover in a northern hardwood forest: a direct comparison of the radiocarbon and minirhizotron methods. *Canadian Journal of Forest Research*, 32, 9: 1692-1697

NASTAJANJE LESA PRI BUKVAH Z DVEH RASTIŠČ NA RAZLIČNIH NADMORSKIH VIŠINAH

Wood formation in beech from two sites at different altitudes

Izvleček: Predstavljamo časovno dinamiko kambijeve aktivnosti in nastanka lesa pri bukvi (*Fagus sylvatica* L.) z rastišča Panška reka (400 m n.m.v.) in Menina planina (1200 m n.m.v.) v letu 2008. Raziskave smo opravili na tkivih lesa, kambija in skorje, odvzetih iz odraslih dreves s pomočjo metode mikro vzorčenja v tedenskih intervalih med vegetacijsko dobo. Delitve v kambiju so se na Panški reki začele prej (med 14. aprilom in 12. majem) in zaključile kasneje (med 30. junijem in 25. avgustom) kot na Menini planini (začetek med 16. in 23. majem ter zaključek med 30. junijem in 25. julijem). Najintenzivnejše celične delitve smo na obeh rastiščih zabeležili nekaj dni pred poletnim solsticijem. Na Panški reki je nastajanje lesa trajalo od 11 do 19 tednov, srednja širina branike pa je bila približno 3 mm. Na Menini planini je nastajanje lesa trajalo 6 do 7 tednov, srednja širina branike pa je bila približno 1 mm. Na Panški reki so bili tedenski prirastki lesa v povprečju skoraj trikrat večji kot na Menini planini, večja je bila tudi variabilnost med drevesi. To so potrdile tudi dendrokronološke raziskave. Primerjave lokalnih kronologij širin branik nakazujejo, da na Panški reki poletne visoke temperature in poletna suša negativno vplivajo na širine branik, na Menini planini pa vladajo visokogorske razmere, kjer imajo višje poletne temperature pozitiven vpliv na rast.

Ključne besede: bukev, (*Fagus sylvatica* L.), delovanje kambija, nastajanje lesa, dendrokronologija

Abstract: We present the dynamics of cambial activity and wood formation in beech (*Fagus sylvatica* L.) from two sites Panška reka (400 m a.s.l.) and Menina planina (1200 m a.s.l.) in 2008. Research was conducted on the tissues of wood, cambium and bark taken from adult trees using the micro-coring technique. The cores were taken at weekly intervals during the vegetation period. Cambial divisions began at Panška reka earlier (between 14 April and 12 May) and finished later (between 30 June and 25 August) than at Menina planina (onset between 16 and 23 May, end between 30 June and 25 July). The highest cell production was recorded at both sites few days before the summer solstice. At Panška reka, the formation of tree-ring lasted 11 to 19 weeks and the mean tree-ring width was about 3 mm. At Menina planina the production of wood lasted 6 to 7 weeks, and the mean tree-ring width was 1 mm. Greater variability among trees at Panška reka was also confirmed with dendrochronological investigations. Comparisons of local tree-ring chronologies indicated that summer drought and high summer temperatures negatively affected variation of tree-ring widths at Panška reka. The situation at Menina planina corresponded to high mountain conditions where higher summer temperatures positively affect the growth.

Keywords: beech, (*Fagus sylvatica* L.), cambial activity, wood formation, dendrochronology

UVOD

Bukev (*Fagus sylvatica* L.) spada med najpomembnejše drevesne vrste v Sloveniji. Pojavlja se v več kot treh četrtnih slovenskih gozdov, njena lesna zaloga pa trenutno predsta-

vlja približno tretjino skupne lesne zaloge (Brus, 2005). Po podatkih Zavoda za gozdove njeno skupno lesno zalogo v Sloveniji ocenjujejo na okvirno 100 milijonov kubičnih metrov lesa (Zavod za Gozdove Slovenije, 2009). Bukov les je pomembna industrijska surovina, na kateri temelji proizvodnja luščenega furnirja in vezanega lesa, ki predstavlja izhodišče za široko paleto najvrednejših lesnih proizvodov.

* Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, e-pošta: peter.prislan@bf.uni-lj.si

Bukovina se poleg tega uporablja tudi za rezan furnir, pohištvo, galanterijske izdelke, ročaje orodij, železniške pragove in redkeje za konstrukcije. Bukovina je pri nas glavna lesna vrsta za drva, predelujejo pa jo tudi v oglje, celulozo, papir in iverne ter vlaknene plošče (Čufar, 2006).

Velika razširjenost, zaloga in široka uporabnost bukovine kaže na njen velik ekonomski pomen. Poleg tega bukev v zadnjih letih postaja vse bolj zanimiva drevesna vrsta za okoljske študije. Na območju njenega naravnega areala vse bolj spoznavajo njen pomen za biogeografske študije (npr. Di Filippo in sod., 2007). Ker so v lesu shranjene informacije o vplivih okolja na rast drevesa, je vse bolj zanimiva tudi za dendroekološke in dendroklimatološke študije (npr. Dittmar in sod., 2003). Pri tovrstnih študijah so pomembne raziskave zaporedij datiranih branik v lesu, za katere vemo, kdaj so nastale, praviloma pa premo poznamo, na kakšen način se vpliv okoljskih dejavnikov in klime kaže v zgradbi lesa. To bi lahko pojasnili, če bi vedeli, kako nastaja les. Pri tem se v zadnjem času vse bolj zavedamo, da nastajanje lesa predstavlja tudi akumulacijo oz. skladiščenje ogljika in energije, ki v lesu lahko ostaneta vezana dolga leta (npr. Lipušček in Tišler, 2003).

Čeprav skupno zalogo bukovine merimo v milijonih kubičnih metrov, se nastanek lesa začne z delitvami celic v kambiju. Kambij, ki proizvaja nove celice, deluje le nekaj mesecev na leto (v grobem od aprila do septembra), razvoj posamezne celice lesa bukve pa traja od enega do dveh mesecev (Prislan in sod., 2009). Zgradba bukovine in posledično njene lastnosti, so zelo odvisne od celične zgradbe, ki se določi v procesu oblikovanja (diferenciacije) celic.

Glede na to postajajo vse bolj zanimive tudi raziskave nastajanja lesa, ki so pomembne z različnih vidikov kot so: produktivnost dreves in sestojev, kakovost lesa, učinek klimatskih sprememb na ekosisteme, akumulacija ogljika itd.

V pričujoči študiji smo raziskali časovno dinamiko kambijeve aktivnosti in nastanka lesa pri bukvah z dveh rastišč; Panška reka in Menina planina v letu 2008.

MATERIALI IN METODE

Raziskava nastajanja lesa je bila opravljena na bukvah (*Fagus sylvatica* L.) z rastišč Panška reka v bližini Ljubljane (46°00'S, 14°40'V, 400 m n.m.v.) in Menina planina (46°16'S, 14°48'V, 1200 m n.m.v.). Bukve na obeh rastiščih rastejo v gozdni združbi Blechno fagetum. V letu 2008 so v Ljubljani, kjer so razmere podobne kot na Panški reki, zabeležili povprečno letno temperaturo 11,6 °C in 1490 mm padavin (podatki Gozdarskega inštituta Slovenije). Razmere na Menini planini pa so dokaj podobne kot na Krvavcu, kjer so v preteklem letu zabeležili povprečno letno temperaturo 3,9 °C in 1542 mm letnih padavin (podatki Agencije Republike Slovenije za okolje).

Na obeh rastiščih smo izbrali po šest dominantnih ali kodominantnih, zdravih bukovih dreves, starih nad 100 let. Med rastno sezono 2008 (od marca do oktobra) smo v tedenskih intervalih na prsni višini debel odvzeli vzorce (mikroizvrtke) s pomočjo orodja Trephor. Odvzeti vzorci so vsebovali floem, kambij in zunanji ksilem (les). Da bi se izognili vplivu poškodovanja debela, je bil razmak med mesti odvzema vzorcev najmanj 10 cm. Takoj po odvzemu smo vzorce fiksirali v raztopini formalina, očetne kisline in etanola (FAA). Po enem tednu fiksacije smo jih prepojili s parafinom v komori za preparacijo tkiv Leica TP 1020-1. Vzorce smo najprej dehidrirali v etanolu naraščajoče koncentracije (70 %, 90 %, 95 % in 100 %) in raztopini bio-clear (D-limonen), nato pa jih prepojili s tekočim parafinom, segretim na 65 °C (Rossi in sod., 2006a). Iz prečno orientiranih vzorcev, vklopljenih v parafinske bloke smo nato narezali 10 µm do 12 µm debele rezine lesa, kambija in floema (prečni prerez) s pomočjo rotacijskega mikrotoma Leica RM 2245 ob uporabi nožev Feather N35H.

Rezine smo prenesli na objektna stekla, premazana z albuminom, ki omogoča boljšo oprijemnost rezin. Nato smo jih pol ure sušili pri 70 °C ter v nadaljevanju iz njih s pomočjo raztopine bio-clear odstranili odvečen parafin. Nazadnje smo rezine 10 minut barvali v mešanici barvil safranin in astra modro (raztopina 40 mg safranina in 150 mg astra modro v 100 ml demineralizirane vode z dodatkom 2 ml očetne kisline) (Van der Werf, 2007), jih sprali v etanolu, dehidrirali in vklopili v Euparal.

Za opazovanje, štetje in merjenje celic ter tkiv v različnih fazah diferenciacije smo uporabili svetlobni mikroskop Nikon Eclipse 800 (svetlo polje in polarizirano svetlobo), digitalno kamero DS-Fi1 in sistem za analizo slike NIS Elements BR3.

Spremljali smo širino kambija in dinamiko nastajanja ksilemske branike med rastno sezono 2008. Na preparatih smo vedno prešteli število slojev celic v kambiju in izmerili širino kambija ter nastajajoče ksilemske branike v vsaj treh radialnih nizih. Za vsak odzem smo izračunali povprečno širino prirastka, nastajanje branike 2008 pa smo nato analizirali s pomočjo Gompertzove funkcije (Rossi in sod., 2003):

$$y = A \exp [-e^{(B-kt)}], \quad (1)$$

kjer je y tedenska kumulativna širina lesnega prirastka (v µm), t je dan v letu, A je zgornja asimptota, ki predstavlja maksimalno širino branike (v µm), B je mesto na osi x in oceni začetek kambijeve aktivnosti, k pa je mesto prevoja krivulje.

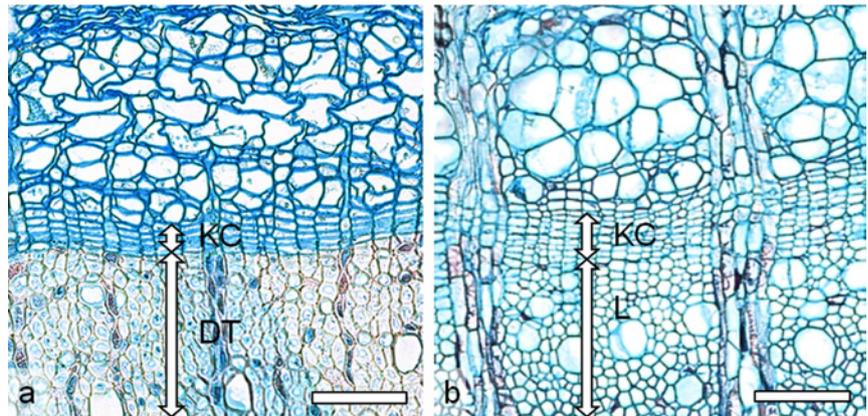
Dendrokronološke analize smo opravili na kolutih posekanih dreves (po 14 dreves z vsakega rastišča). Drevesa na Panški reki so bila posekana ob koncu leta 2006, na Me-

nini planini pa ob koncu leta 2009. Za analize smo s spodnjega dela debla odvzeli kolote debeline približno 10 cm. Iz kolotov smo izžagali vzorce, ki so vsebovali po dva reprezentativna radialna izseka od stržena do skorje. Zračno suh les smo zbrusili. Na obdelanih prečnih prerezih smo izmerili širine branik vzdolž dveh radijev. Zaporedja širin branik smo sinhronizirali in datirali ter sestavili lokalno kronologijo širin branik za vsako rastišče. Za merjenje in izračun dendrokronoloških parametrov smo uporabili programa TSAP-Win in TSAP/X.

REZULTATI

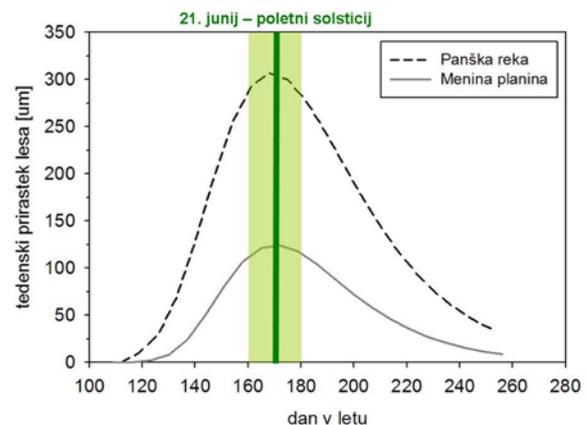
V sredini marca 2008, ko smo pričeli z odvzemom vzorcev na Panški reki, je bil kambij v mirujočem stanju in je štel 4–5 slojev celic (Slika 1a). Čas začetka celičnih delitev, ki smo ga določili na podlagi povečanega števila celic v kambiju (do 8 slojev, slika 1b), se je med vzorčnimi drevesi na tem rastišču nekoliko razlikoval. Delitve v kambiju so se pri dveh bukvah (št. 4 in 6) začele med 14. in 21. aprilom, pri dveh (št. 1 in 3) med 21. in 28. aprilom in pri dveh (št. 2 in 5) med 5. in 12. majem 2008 (Slika 3A). Na rastišču Menina planina smo zabeležili reaktivacijo kambija nekoliko kasneje, variabilnost med drevesi pa je bila manjša. Podobno kot na Panški reki se je število kambijevih celic ob njegovi reaktivaciji iz 4–5 slojev povečalo na okoli 8 slojev. Celične delitve so se pri petih drevesih začele v tednu med 16. in 23. majem, samo pri bukvi št. 4 pa en teden prej (Slika 3B).

Naraščanje širine branike je sledilo sigmoidni krivulji v obliki črke S. Na začetku je bilo počasnejše, sledila je pozitivna eksponentna faza, nato pa se je proti koncu rastne sezone rast postopoma upočasnila. Za izravnavo podatkov smo uporabili Gompertzovo funkcijo, ki je izmed vseh sigmoidnih krivulj najprimernejša za opis debelinske rasti dreves (Rossi in sod., 2003, 2006). Gompertzova funkcija ima asimetrično obliko, točka prevoja pa nastopi pred sredino rastne sezone. Časovno dinamiko tedenskega priraščanja lesa opisuje krivulja zvonaste oblike (slika 2), ki matematično predstavlja odvod sigmoidne krivulje. Krivulji na sliki 2 opisujeta povprečno tedensko priraščanje, oz. koliko lesa je nastalo v posameznem tednu na posameznem rastišču. Tedenski prirastki lesa so bili pri bukvah na Panški reki v povprečju 2,5 krat večji kot na Menini planini, višek priraščanja pa smo na obeh ploskvah zabeležili istočasno, to je približno en teden pred poletnim solsticijem.

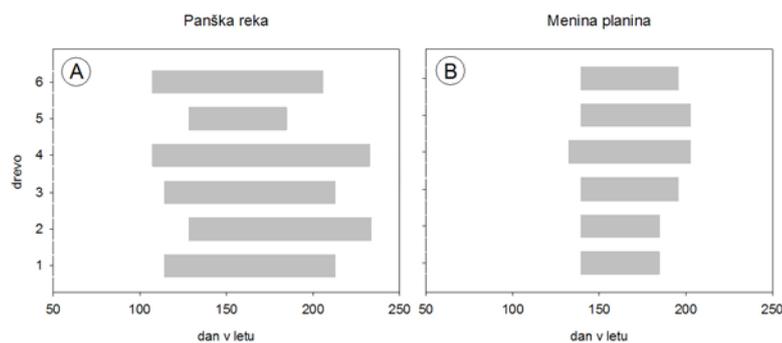


Slika 1: Dormanten (a) in aktiven (b) kambij (KC) pri bukvi: (a) 15. marca 2008, ko je KC še v dormantnem stanju, imajo celice KC manjše radialne dimenzije in nekoliko debelejšee celične stene. Pod KC so vidne popolnoma izoblikovane celice (DT) lesne branike 2007. (b) Okoli poletnega solsticija (23. junija 2008), ko so celične delitve najintenzivnejše, je KC širok 8 slojev celic, pod njim je širok pas celic lesa v fazi površinske rasti (L), ki imajo modro obarvane, nelignificirane primarne celične stene.

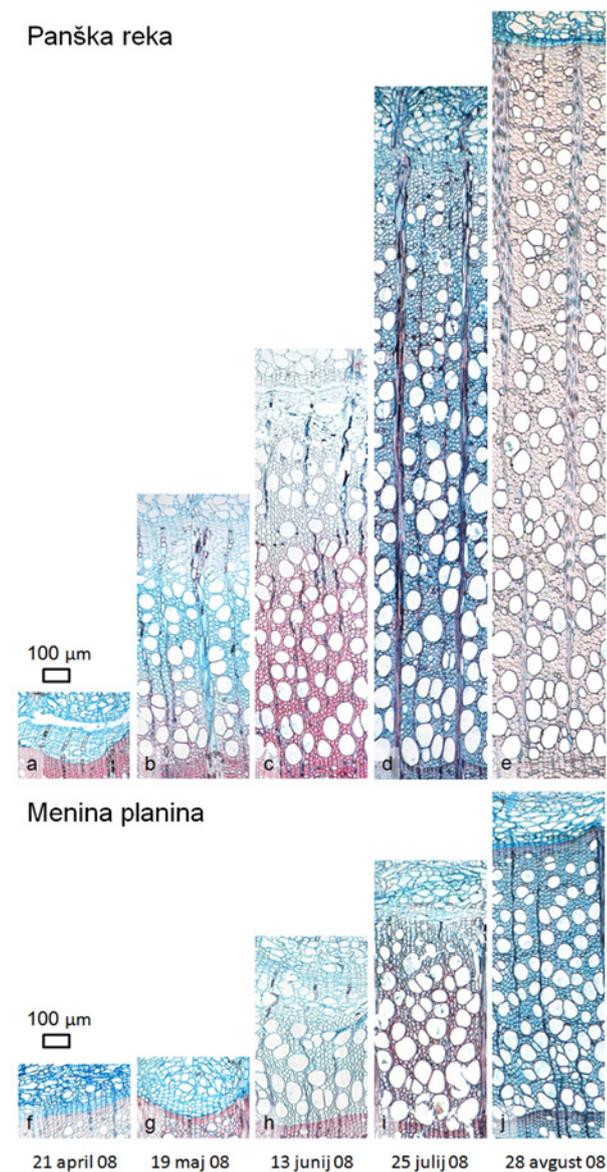
V juliju se je priraščanje lesa začelo upočasnjevati na obeh rastiščih. Obenem je začelo upadati tudi število celic v kambiju. Delitve v kambiju so se pri bukvah na Menini planini v splošnem zaključile prej kot na Panški reki, in sicer pri dveh drevesih (št. 1 in 2) med 30. junijem in 7. julijem, pri dveh (št. 3 in 6) med 11. in 18. julijem ter pri dveh drevesih (št. 4 in 5) med 18. in 25. julijem 2008. Na Panški reki je bila variabilnost med drevesi večja, debelinska rast pri bukvi št. 5 pa se je ustavila že v prvem tednu julija (30. junija do 7. julija), šele tri tedne kasneje pa pri naslednjem drevesu št. 6 (med 21. in 28. julijem). Pri drevesih št. 1 in 3 so se delitve v kambiju končale med 28. julijem in 4.



Slika 2. Povprečni tedenski prirastki lesa na posameznem rastišču v letu 2008, izračunani s pomočjo Gompertzove funkcije.



Slika 3: Obdobje nastajanja lesa pri posameznih bukvah v letu 2008 na (A) Panški reki in na (B) Menini planini.



avgustom 2008, pri drevesih št. 2 in 4 pa šele od 18. do 25. avgusta 2008. Razvoj zadnjih nastalih celic lesa je po zaključku delitev v kambiju potekal na Panški reki še 2 do 3 tedne, na Menini planini pa do 5 tednov.

Poleg večje intenzivnosti priraščanja lesa je bila tudi kambijeva aktivnost pri bukvah na Panški reki približno 2,5 krat daljša kot na Menini planini. Na Panški reki je trajala 11 do 19 tednov ($15,17 \pm 4,26$) tedna, na Menini planini 6 do 7 tednov ($6,83 \pm 0,75$) (slika 3). Obenem smo na Panški reki zasledili tudi večjo variabilnost med drevesi v smislu trajanja nastanka lesa (slika 3A). Ker dolžina kambijeve aktivnosti in hitrost nastajanja celic določata širino letnega prirastka lesa, so bile širine branik, nastalih v letu 2008, pri bukvah na Panški reki skoraj trikrat večje kot na Menini planini. Branika, nastala v letu 2008, je bila na Panški reki v povprečju široka približno 3 mm ($2954,56 \pm 1652,42 \mu\text{m}$), na Menini planini pa približno 1 mm ($1020,59 \pm 388,06 \mu\text{m}$) (slika 4).

Dendrokronološke analize so pokazale, da so bila drevesa na Panški reki v splošnem mlajša kot na Menini planini. Na Panški reki smo sestavili lokalno kronologijo širin branik dolgo 135 let, za Menino planino pa 158 let. Standardni statistični kazalniki obeh neindeksiranih kronologij, izračunani s programom TSAP-Win pa kažejo, da je bila srednja širina branik na Panški reki večja, večji je bil tudi standardni odklon (STD) in avtokorelacija (AC1), srednja občutljivost (MS) pa je bila na obeh rastiščih primerljiva (preglednica 1).

Kronologiji Panške reke in Menine planine nista podobni niti vizualno (slika 5) niti statistično, saj je bila t-vrednost po Baillieju in Pilcherju (tBP) primerjave med kronologijama nižja od 1, dve kronologiji pa sta statistično podobni,

Slika 4: Nastanek branike bukve med vegetacijsko dobo 2008, prečni prerezi. Panška reka, drevo 6: (a) delitve v kambiju so se že pričele, (b) prve popolnoma diferencirane celice ranega lesa, (c) najintenzivnejše celične delitve, širina branike narašča, (d) delitve v kambiju so se upočasnile, večji del branike je že izoblikovan, (e) branika je popolnoma izoblikovana - kambij ne proizvaja novih celic. Menina planina, drevo 4: (f) delitve v kambiju se še niso pričele, (g) število celic v kambiju se je povečalo, (h) celične delitve so najintenzivnejše, (i) delitve so se upočasnile, (j) branika je popolnoma izoblikovana. Lignificirane celične stene tkiv so obarvane rdeče (safranin), neliignificirane pa modro (astra modro).

Preglednica 1. Statistični podatki o kronologijah bukve s Panške reke in Menine planine: časovni razpon in dolžina (v letih), število vključenih dreves, srednja širina branik (mm), MS-srednja občutljivost, STD-standardni odklon, AC1 – avtokorelacija 1. reda. Vrednosti so izračunane za neindeksirane kronologije širin branik s pomočjo programa TSAP-Win.

Šifra	Razpon (leta)	Dolžina	Število dreves	Srednja širina branik (mm)	STD	MS	AC1
Panška reka	1873 - 2007	135	14	1,69	0,53	0,18	0,78
Menina planina	1852 - 2009	158	14	1,51	0,40	0,17	0,72

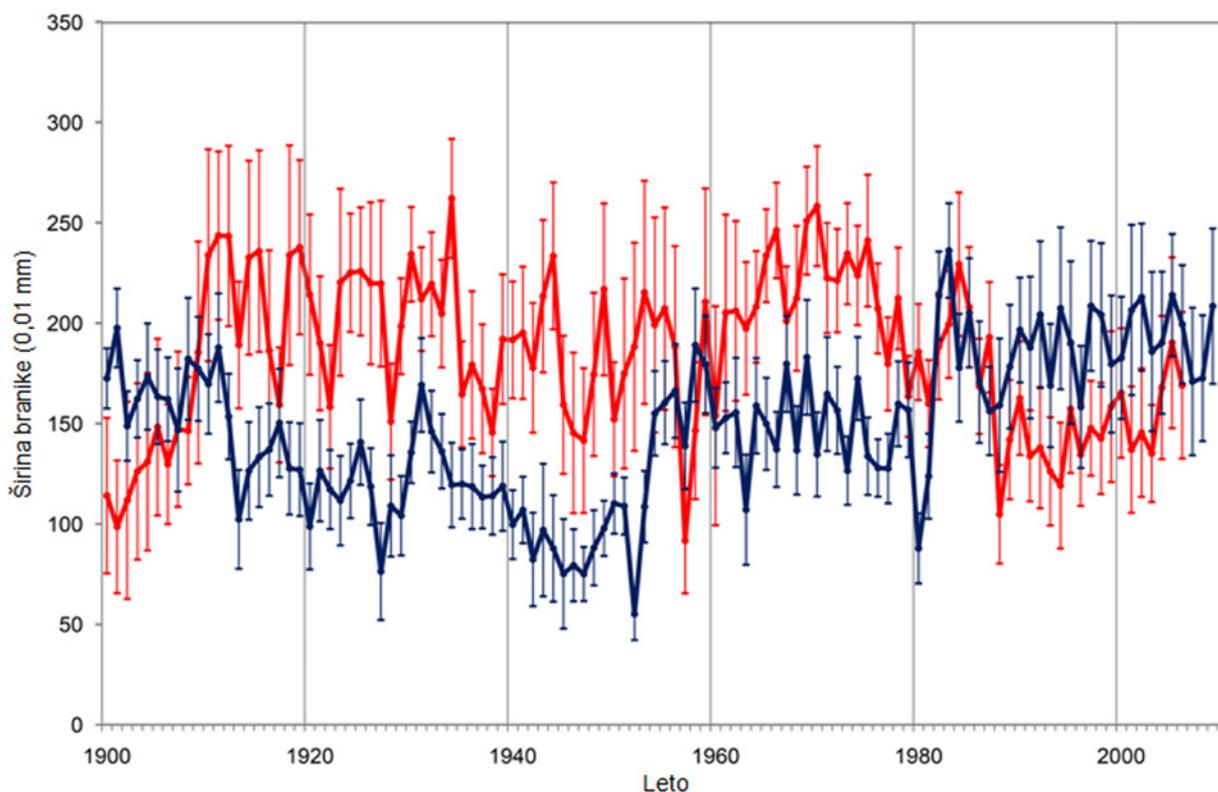
kadar je tBP nad 4 (prim. Levanič 1996). V nadaljevanju smo primerjali kronologijo Panške reke s petimi kronologijami z različnih rastišč v Sloveniji z nadmorskih višin do 1000 m. Primerjava je pokazala, da je kronologija Panške reke statistično podobna s kronologijami rastišč pri Mokronogu, na Gorjancih, pri Pivški jami, pri Kočevski reki in na Mašunu, kazalniki tBP pa so bili 10,7; 5,7; 4,8; 4,5; in 5,8. Kronologija Menine planine se je ujemala s kronologijami bukve z visokogorskih rastišč (nad 1000 m nadm. v.) s Planine Kal nad Tolminom (tBP 4,8), z rastišč Paularo in Tre Confini (Tromeja) v Italiji (tBP 5,1 in 6,1) ter z rastišča Hallstatt (Dachstein) v Avstriji (tBP 5,9). Kronologije so predstavljene v virih Di Filippo in sod. (2007) in Čufar in sod. (2008a). Te primerjave kažejo, da na Panški reki na

rast bukve vplivajo drugačni (klimatski) dejavniki kot na Menini planini.

RAZPRAVA

V letu 2006 smo opravili prvo vzorčenje tkiv bukve za študije nastajanja lesa v Sloveniji in to na rastišču Panška reka (Prislan, 2007; Čufar in sod., 2008d). Celične delitve v kambiju so se začele v drugi polovici aprila, kar je sovpadalo z razvojem prvih listov (Čufar in sod., 2008c). Dendrokronološke raziskave so pokazale, da je Panška reka dokaj reprezentativno rastišče za rast bukve na nadmorskih višinah 300–1000 m v Sloveniji (Čufar in sod., 2008 a).

V letu 2008 smo s študijami sezonske dinamike nastanka



Slika 5: Lokalna kronologija za Panško reko (rdeče) in Menino planino (modro). Prikazano je povprečje in 95 % interval zaupanja.

lesa pri bukvi nadaljevali in v raziskave poleg Panške reke vključili še rastišče Menina planina, saj so predhodne dendrokronološke raziskave nakazale, da se rastni vzorci bukve v Alpah na nadmorskih višinah nad 1200 m značilno razlikujejo od tistih na nižje ležečih rastiščih (Čufar in sod., 2008a).

Na Menini planini smo v letu 2008 reaktivacijo kambija zabeležili 2–3 tedne kasneje kot na Panški reki. To je najverjetneje posledica nižjih temperatur ozračja in tal ter snega, ki običajno obleži do konca aprila oz. začetka maja. Ti dejavniki omejujejo začetek kambijeve aktivnosti na višje ležečih rastiščih (Kirdyanov, 2003), to pa je tudi v skladu z ugotovitvami Rossija in sodelavcev (2008), da les pri iglavcih s hladnejših področij severne poloble začne nastajati, ko pomladne minimalne, srednje in maksimalne temperature zraka presežejo (4–5) °C, (8–9) °C oz. (13–14) °C.

Čeprav je bukev zelo razširjena evropska vrsta, so raziskave sezonske dinamike nastajanja lesa pri tej vrsti nasploh redke. Poznamo le dve tovrstni študiji iz severne Evrope. Schmitt in sodelavci (2000) so ugotovili, da je les pri bukvah v bližini Hamburga v Nemčiji začel nastajati šele okoli 10. maja. Tudi Van den Werf in sodelavci (2007) so pri bukvi na Nizozemskem začetek priraščanja lesa zabeležili v prvi polovici maja. Ugotovitve obeh raziskovalnih skupin skupaj z našimi rezultati nakazujejo, da se kambij pri bukvah z višjih nadmorskih višin in višjih zemljepisnih širin aktivira kasneje kot na primer na nižje ležečih rastiščih v Sloveniji, kjer so razmere za rast bukve optimalne.

Podatki o obdobju, ko je produkcija celic lesa najintenzivnejša, so za različne vrste različni. Pri iglavcih, ki rastejo v hladnejših področjih severne poloble, so raziskovalci zabeležili najbolj intenzivno nastajanje novih celic okoli poletnega solsticija, ko je dan najdaljši (Horacek in sod., 1999, Rossi in sod., 2006a, 2007, Gričar, 2006). V redkih študijah pri listavcih so največjo stopnjo celične produkcije zabeležili nekoliko prej; med drugo polovico maja in začetkom junija (Schmitt in sod., 2000, Gričar, 2008, Marion in sod., 2007). Podobno smo opazili tudi pri bukvah s Panške reke v rastni sezoni 2006 (Prislan, 2007), najnovejše analize iz leta 2008 pa kažejo, da so bili tedenski prirastki lesa na Panški reki in Menini planini največji okoli poletnega solsticija. Rezultati nakazujejo, da je maksimum debelinske rasti, poleg dolžine dneva, odvisen tudi od klimatskih razmer tekočega leta.

Kambijeve aktivnosti se je pri bukvah na Menini planini zaključila v juliju (od 30. junija do 25. julija), na Panški reki pa pri posameznih drevesih do en mesec kasneje (od 30. junija do 25. avgusta 2008). V letu 2006 se je kambijeve aktivnosti pri bukvah na Panški reki zaključila med 25. julijem in 16. avgustom, zadnje nastale celice pa so za popoln razvoj potrebovale še nadaljnje tri tedne (Prislan, 2007; Prislan in sod., 2009). Pri tem naj omenimo, da je bil

julij 2006 izjemno vroč in da so bile takrat po podatkih ARSO v Ljubljani, ki ima primerljivo klimo kot Panška reka, zabeležene julijske povprečne in maksimalne temperature 23,6°C in 30,2°C precej nad dolgoletnim (1960–2006) povprečjem, ki znaša 20,4 °C in 26,5 °C.

Van den Werf in sodelavci (2007) so pri bukvi na Nizozemskem kambijevo aktivnost zasledili tudi septembra. Podobno so za bukev v severni Nemčiji ugotovili tudi Schmitt in sodelavci (2000) ter za ostrolistni javor v Ljubljani Marion in sodelavci (2007). Gričar (2008) je pri gradnih v Ljubljani v letu 2007 zabeležila konec kambijeve aktivnosti v sredini avgusta, zadnje nastale celice pa so za popoln razvoj potrebovale 4–5 tednov.

Razvoj zadnjih nastalih celic po zaključku delitev v kambiju je potekal na Panški reki še 2 do 3 tedne, na Menini planini pa še 5 tednov. V letu 2006 je razvoj zadnjih nastalih celic pri bukvi trajal še 4 tedne po zaključku delitev v kambiju (Prislan in sod., 2009). Gričar in sodelavci (2005) so pri jelki ugotovili, da je zaključek diferenciacije terminalnih traheid kasnega lesa odvisen od trajanja kambijeve aktivnosti. Pri drevesih z ozkimi branikami se je razvoj zadnjih nastalih celic zaključil prej kot pri drevesih s širokimi branikami.

Dendroklimatološke analize bukve s Panške reke (Čufar in sod., 2008a) in dobro ujemanje lokalne kronologije Panške reke s kronologijami bukve z nadmorskih višin do 1000 m kažejo, da se bukev na teh rastiščih odzove na poletno sušo in vročino z zmanjšanjem prirastka. Pri tem so pomembne zlasti temperature (negativen vpliv) in padavine (pozitiven vpliv) v juniju, ko je dan najdaljši in je priraščanje lesa najintenzivnejše. Junijske razmere so v Sloveniji nasploh zelo variabilne, o njihovem pomenu pa smo podrobneje razpravljali v članku o rekonstrukciji junijske klime v osrednji Sloveniji in njenem vplivu na rast hrasta (Čufar in sod., 2008b).

Za bukev z Menine planine še ni bila opravljena dendroklimatološka analiza, lahko pa posredno sklepamo, da na rast drevja na tem rastišču, podobno kot na drugih alpskih rastiščih v Sloveniji, Italiji in Avstriji pozitivno vplivajo temperature v času vegetacijske dobe, predvsem v maju, juliju in avgustu (prim. Di Filippo in sod., 2007).

Rezultati nakazujejo, da se časovna dinamika nastajanja lesa pri bukvi med leti lahko precej razlikuje in da sta tako dinamika kot maksimum debelinske rasti odvisna od dolžine dneva in klimatskih razmer tekočega leta. Omenjene zakonitosti je mogoče bolje spoznati le, če raziskave potekajo več let zapored na istem rastišču. Poleg večje intenzivnosti priraščanja lesa (v povprečju 2,5-krat), je bila tudi kambijeve aktivnosti pri bukvah na Panški reki 2,5 krat daljša kot na Menini planini. Posledično so bile širine branik 2008 pri bukvah na Panški reki trikrat večje (približno

3 mm) kot na Menini planini (približno 1 mm). Poleg tega smo opazili večjo variabilnost med drevesi na Panški reki, kar so potrdile tudi dendrokronološke raziskave.

Raziskave na Panški reki v rastni sezoni 2006 in 2008 nakazujejo, da je časovna dinamika nastajanja lesa odvisna od klimatskih razmer v tekočem letu ter da obstajajo razlike med leti. V splošnem so večja intenzivnost priraščanja lesa, daljša kambijeva aktivnost in večji prirastek pri bukvah na Panški reki verjetno posledica bolj optimalne klime za rast bukve kot na Menini planini. Hkrati smo na Menini planini zabeležili manjšo variabilnost med drevesi, ki bi jo lahko pojasnili z bolj zaostrenimi pogoji za rast na tem rastišču. Na Menini planini je minimalna temperatura zraka najverjetneje med glavnimi omejujočimi dejavniki za kambijevo aktivnost, drevesa pa kratkotrajne ugodne temperature v pozni pomladi in zgodnjem poletju dobro izkoristijo za rast.

ZAHVALA

Avtorji se zahvaljujejo Javni agenciji za raziskovalno dejavnost republike Slovenije (ARRS) za finančno podporo v okviru programov Lesarstvo P4-0015 in Gozdna biologija, ekologija in tehnologija P4-0107 ter programa za usposabljanje mladih raziskovalcev. Terensko delo so nam omogočili in nam bili pri njem v veliko pomoč Marko Beber, Franc Koncila, Milko Detmar in podjetje Metropolitana d.o.o. Za njihovo pomoč se jim iskreno zahvaljujemo. Diplomantom Aljažu Sitarju, Dejanu Češnovarju in Aljažu Majerju se zahvaljujemo za njihovo pomoč pri laboratorijskem delu, ki so ga opravili v okviru priprave diplomskih nalog.

LITERATURA

1. Brus R. (2005) Dendrologija za gozdarje. Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo in obnovljive gozden vire, Ljubljana, 408
2. Čufar K. (2006) Anatomija lesa. Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Ljubljana, 185
3. Čufar K., de Luis M., Berdajs E., Prislán P. (2008a) Main patterns of variability in beech tree-ring chronologies from different sites in Slovenia and their relation to climate. Zbornik gozdarstva in lesarstva, 87: 123-134
4. Čufar K., de Luis M., Eckstein D., Kajfež-Bogataj L. (2008b) Reconstructing dry and wet summers in SE Slovenia from oak tree rings series. International Journal of Biometeorology, DOI 10.1007/s00484-008-0153-8
5. Čufar K., Prislán P., de Luis M., Gričar J. (2008c) Tree-ring variation, wood formation and phenology of beech (*Fagus sylvatica*) from a representative site in Slovenia, SE Central Europe. Trees, DOI 10.1007/s00468-008-0235-6
6. Čufar K., Prislán P., Gričar J. (2008d) Cambial activity and wood formation in beech (*Fagus sylvatica*) during the 2006 growth season. Wood Research, 53: 1-10
7. Di Filippo A., Biondi F., Čufar K., De Luis M., Grabner M., Maugeri M., Presutti Saba E., Schirone B., Piovesan G. (2007) Bioclimatology of beech (*Fagus sylvatica* L.) in the Eastern Alps: spatial and altitudinal climatic signals identified through a tree-ring network. Journal of Biogeography, 34: 1873-1892
8. Dittmar C., Zech W., Elling W. (2003) Growth variations of Common beech (*Fagus sylvatica* L.) under different climatic and environmental conditions in Europe—a dendroecological study. Forest Ecology and Management, 173: 63-78
9. Gričar J. (2006) Vpliv temperature in padavin na ksilogenezo pri jelki (*Abies alba*) in smreki (*Picea abies*). Doktorska disertacija. Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Ljubljana
10. Gričar J. (2008) Dinamika ksilogeneze pri gradnu v letu 2007. Zbornik gozdarstva in lesarstva, 86: 45 - 50
11. Gričar J., Čufar K., Oven P., Schmitt U. (2005) Differentiation of terminal latewood tracheids in silver fir trees during autumn. Annals of Botany, 95: 959-965
12. Levanič T. (1996) Dendrokronološka in dendroekološka analiza propadajočih vladajočih in sovladajočih jelk (*Abies alba* Mill.) v dinarski fitogeografski regiji. Doktorska disertacija. Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Ljubljana
13. Horacek P., Slezingerova J., Gandelova L. (1999) Effects of environment on the xylogenesis of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.). V: Wimmer R, Vetter RE, eds, Tree-ring analysis. Biological, methodological and environmental aspects. CAB International, Oxford, 33-54
14. Kirilyanov A., Hughes M., Vaganov E., Schweingruber F., Silkin P. (2003) The importance of early summer temperature and date of snow melt for tree growth in the Siberian Subarctic. Trees, 17: 61-69
15. Lipušček I., Tišler V. (2003) Les - skladišče ogljika. Zbornik gozdarstva in lesarstva, 71: 71-89
16. Marion L., Gričar J., Oven P. (2007) Wood formation in urban Norway maple trees studied by the micro-coring method. Dendrochronologia, 25: 97-102
17. Prislán P. (2007) Nastajanje lesa pri bukvi (*Fagus sylvatica* L.) v rastni sezoni 2006. Diplomsko delo. Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Ljubljana
18. Prislán P., Koch G., Čufar K., Gričar J., Schmitt U. (2009) Topochemical investigations of cell walls in developing xylem of beech (*Fagus sylvatica* L.). Holzforschung, 63
19. Rossi S., Anfodillo T., Menardi R. (2006a) Trephor: a new tool for sampling microcores from tree stems. IAWA Journal, 27: 89 - 97
20. Rossi S., Deslauriers A., Anfodillo T., Carraro V. (2007) Evidence of threshold temperatures for xylogenesis in conifers at high altitudes. Oecologia, 152: 1-12
21. Rossi S., Deslauriers A., Anfodillo T., Morin H., Saracino A., Motta R., Borghetti M. (2006b) Conifers in cold environments synchronize maximum growth rate of tree-ring formation with day length. New Phytologist, 170: 301-310
22. Rossi S., Deslauriers A., Gričar J., Seo J.W., Rathgeber C.W.G., Anfodillo T., Morin H., Levanič T., Oven P., Jalkanen R. (2008) Critical temperatures for xylogenesis in conifers of cold climates. Global Ecology and Biogeography, 17: 696-707
23. Rossi S., Deslauriers A., Morin H. (2003) Application of the Gompertz equation for the study of xylem cell development. Dendrochronologia, 21: 33-39
24. Schmitt U., Möller R., Eckstein D. (2000) Seasonal wood formation dynamics of beech (*Fagus sylvatica* L.) and black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) as determined by the "pinning" technique. Journal of Applied Botany, 74: 10-16
25. Zavod za gozdove Slovenije (2009) Poročilo Zavoda za Gozdove Slovenije o gozdovih za leto 2008. Zavod za Gozdove Slovenije, Ljubljana <http://www.zgs.gov.si> (15.3.2010)
26. Werf van der G.W., Sass-Klaassen U., Mohren G.M.J. (2007) The impact of the 2003 summer drought on the intra-annual growth pattern of beech (*Fagus sylvatica* L.) and oak (*Quercus robur* L.) on a dry site in the Netherlands. Dendrochronologia, 25: 103-112

POVEZAVA MED RAZMERJEM STABILNIH IZOTOPOV OGLJIKA V BRANIKI IN OKOLJSKIMI DEJAVNIKI

Linkage between stable carbon isotopic ratios in tree-rings and environmental factors

Povzetek: V prispevku so podane osnove teorije izotopske sestave rastlinskega tkiva. Predstavljeni so glavni dejavniki, procesi, ki vplivajo na razmerje stabilnih ogljikovih izotopov v branikah dreves, ter korekcije, ki jih je potrebno opraviti pred nadaljnjo analizo izotopske kronologije. Na študiji primera je prikazan klimatski signal kronologije $\delta^{13}\text{C}$ in njegov potencial za rekonstrukcijo temperatur v širšem prostorskem okviru.

Ključne besede: $\delta^{13}\text{C}$, CO_2 , dendroekologija, izotopska frakcionacija, klimatski signal, *Picea abies*, smreka, stabilna ogljikova izotopa

Abstract: In this article the basic of isotope theory of plant tissue is described. The emphasis is on the main factors and processes, which influence the stable carbon isotopic ratios in tree-rings and on the corrections, which have to be applied before further analysis of stable carbon isotope chronology. In the case study the climate signal in $\delta^{13}\text{C}$ chronology and its spatial climate reconstruction potential is shown.

Key words: $\delta^{13}\text{C}$, CO_2 , dendroecology, isotope fractionation, climate signal, *Picea abies*, spruce, stable carbon isotopes

UVOD

Drevesa so stalni in najdlje živeči element krajine, ki vzkljujejo ter nato na istem mestu rastejo tudi več stoletij, morda celo tisočletij. V tem času se bolj ali manj intenzivno odzivajo na biotske in abiotske dejavnike, ki delujejo v njihovi okolici (McCarroll in Loader, 2005). Iz okoliške atmosfere in talne vode privzemajo osnovne elemente ter iz njih preko številnih kompleksnih procesov vsako leto proizvedejo novo plast lesa, ki jo imenujemo branika. Informacije, ki jih hrani branika (širina, gostota, izotopska sestava ...) se iz leta v leto spreminjajo v skladu z razmerami v katerih je branika nastala. Morda največji potencial dreves za ekološke študije predstavlja prav vsakoletno arhiviranje osnovnih gradnikov organske snovi (ogljika, kisika in vodika) iz okolja v les ter selektivno vgrajevanje teh

elementov v branike. Selektivnost drevesa pri privzemanju snovi iz okolja se izraža v variacijah v izotopski sestavi branike. Izotopske kronologije predstavljajo arhiv podatkov za rekonstrukcijo klime in okoljskih razmer v preteklosti, tudi v obdobjih pred instrumentalnimi meritvami (McCarroll in Loader, 2004). Izotopska zgradba branike je pri rekonstrukciji okoljskih razmer pomemben podatek, ki dopolnjuje informacijo, ki je vsebovana v ostalih parametrih branike (širina, maksimalna gostota kasnega lesa ...). V prispevku predstavljamo:

- ▶ osnovne predpostavke teorije ogljikovih izotopov in glavne procese, ki vplivajo na izotopsko razmerje v rastlinskem tkivu,
- ▶ korekcije izotopskih kronologij zaradi spremenjene koncentracije in sestave CO_2 v atmosferi ter
- ▶ primer študije klimatskega signala v kronologiji ogljikovih izotopov v branikah smreke in njegov potencial za klimatsko rekonstrukcijo v širšem prostorskem okviru.

* Gozdarski inštitut Slovenije, Večna pot 2, SI-1000 Ljubljana, Slovenija, e-pošta: polona.hafner@gozdis.si

** Gozdarski inštitut Slovenije, Večna pot 2, SI-1000 Ljubljana, Slovenija, e-pošta: tom.levanic@gozdis.si

IZOTOP

Izotopi so atomi istega elementa, ki imajo v jedru enako število protonov (Z), med seboj pa se razlikujejo po različnem številu nevtronov (N) in različni atomski masi, ki je seštevek števila protonov in nevtronov ($A=Z+N$). V periodnem sistemu vsi izotopi enega elementa zasedajo isto mesto, na kar nakazuje tudi njihovo ime (iz grščine: *isos* = enak, *topos* = mesto) (Dawson in Brooks, 2001). Izotope ločimo na stabilne in nestabilne oz. radioaktivne izotope. Prvih poznamo okoli 300, radioaktivnih pa preko 1200. Radioaktivni izotopi se med seboj razlikujejo po različnih hitrostih razpada, medtem ko stabilni izotopi ne razpadajo, a se izotopska sestava elementov kljub temu spreminja (Pezdič, 1999).

Vsi trije glavni kemični gradniki lesa (ogljik 50 %, vodik 6% in kisik 44 %) so v naravi zastopani z več kot enim stabilnim izotopom. Kemične značilnosti izotopov oz. molekul, ki vsebujejo različne izotope posameznega elementa, so glede na klasično kemijsko definicijo enake. To v veliki meri drži, vendar pa z uporabo občutljivih merilnih instrumentov lahko opazimo drobne razlike v kemijskih in fizikalnih lastnostih t.i. izotopskih molekul (spojine, ki so sestavljene iz molekul z različnimi izotopi istega elementa) in so posledica razlik v njihovi masi. Pojav, ki povzroča te razlike, imenujemo izotopska frakcionacija. Frakcionacija se pojavi pri prehajanju spojine skozi različna agregatnega stanja (voda v tekočem stanju preide v stanje vodne pare) oziroma v drugo spojino (anorganski CO_2 se veže v spojino organske snovi – rastlinsko tkivo), pojavi pa se lahko tudi kot razlika v izotopski sestavi dveh spojin kot posledica težnje po kemijskem ali pa fizikalnem ravnotežju (Mook, 2000). Fizikalne in kemične lastnosti izotopskih spojin so odvisne predvsem od mase izotopov, ki spojino sestavljajo. Razlike med lažjimi in težjimi izotopi se kažejo v različnih hitrostih kemijskih reakcij ter v različni energiji kemijskih vezi (Mook, 2000). Za težji izotop je značilna manjša reaktivnost, večja gostota in viskoznost ter višje tališče in vrelišče. Razlike med lažjimi in težjimi izotopi se kažejo tudi v različnih hitrostih kemijskih reakcij. Pri transportnih procesih, kot so difuzija, izparevanje, kondenzacija in migracija ionov, lažji izotopi hitreje prehajajo iz enega mesta na drugo (Pezdič, 1999). Za možnost primerjave relativnih izotopskih meritev sta bila za določanje izotopske sestave ogljika, kisika in vodika sprejeta dva standarda. V-SMOW (Vienna Standard Mean Ocean Water) se uporablja za določevanje vrednosti izotopske sestave kisika in vodika v vodi, oksidih in ogljikovodikih, V-PDB (Vienna Pee Dee Belemnite Americana) pa za določevanje vrednosti izotopske sestave ogljika in kisika v karbonatih ter ogljika v organski snovi. Izotopsko sestavo določene snovi podajamo v promilah (‰) kot odklon od sprejetega standarda

za določen element. Tako majhna enota je sprejeta zato, ker je absolutna zastopanost izotopov posameznega elementa navadno manjša od 1 %. (Pezdič, 1999).

Relativno vrednost izotopske sestave oz. razmerja stabilnih izotopov označujemo z grško črko delta (δ) in jo podajamo kot relativni odklon od mednarodno določenega standarda. Za njen izračun uporabljamo enačbo 1

$$^{13}\text{C} (\text{‰}) = (R_{\text{vzorec}} / R_{\text{standard}} - 1) \times 1000 \quad (\text{enačba 1}),$$

kjer je R razmerje med težjim (^{13}C) in lažjim (^{12}C) izotopom v vzorcu in standardu. Po definiciji je vrednost δ standarda enaka 0‰. Pozitivna δ nakazuje, da vsebuje vzorec v primerjavi s standardom več težjega izotopa, medtem ko bolj negativna vrednost pomeni večjo vsebnost lažjega izotopa v vzorcu (Dawson in Brooks, 2001). Z vrednostjo izotopske sestave lahko podajamo tudi izmenjavo izotopov med zrakom (R_a) in rastlino (R_r) (enačba 2) (Treydte in sod., 2001):

$$\Delta = (R_a - R_r) / R_r \cong \delta^{13}\text{C}_a - \delta^{13}\text{C}_r \quad (\text{enačba 2}),$$

kjer $\delta^{13}\text{C}_a$ predstavlja izotopsko sestavo zraka in $\delta^{13}\text{C}_r$ izotopsko sestavo rastlinskega tkiva.

STABILNA OGLJIKOVA IZOTOPA V BRANIKAH DREVEV

Izotopska razmerja posameznih elementov v braniki se močno razlikujejo od njihovih razmerij v atmosferskem CO_2 , ki je vir v rastlino vgrajenega ogljika. Drevesa tako niso le pasivni zbiratelji elementov, saj je izotopska sestava posameznih elementov v braniki posledica odziva dreves na okoljske razmere v času njihovega nastanka (McCarroll in Loader, 2004). Za interpretacijo informacije, ki je vsebovana v izotopski sestavi ogljika, je potrebno poznavanje procesa frakcionacije. Glavni okoljski dejavniki, ki vplivajo na frakcionacijo ogljikovega izotopa v drevesu, so sončno obsevanje, izotopska sestava zraka, zračna vlažnost, temperature, padavine, taljenje snega, vodni status tal, globina in struktura korenin, morfologija listja, hidravlična prevodnost ksilema, recikliranje izdihanega CO_2 ter razdalja med listi in korenino (McCarroll in Loader, 2004).

FRAKCIONACIJA OGLJIKOVEGA IZOTOPA

Rastline v procesu fotosinteze iz atmosfere vežejo CO_2 , ki predstavlja edini vir ogljika za rastlino. Pri tem prihaja do encimatskih in difuznih procesov frakcionacije, ki vodijo do diskriminacije proti ^{13}C . Trenutno razmerje $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ v CO_2 v ozračju se odraža v $\delta^{13}\text{C}$ in znaša približno -8 ‰. Vrednosti izotopske sestavev listih ter lesu so posledica frakcionacije in so v primerjavi z vrednostjo v zraku precej manjše, pri C3 rastlinah variirajo med -21 ‰ in -35 ‰ (Badeck in sod., 2005). Frakcionacija ogljikovih izotopov se med vgra-

jevanjem ogljika iz CO₂ zunanega zraka v listne sladkorje pojavi na dveh točkah – pri difuziji CO₂ skozi listne reže in pri fiksaciji CO₂ (Warren in sod., 2001).

Razločevanje med težjim in lažjim ogljikovim izotopom se najprej pojavi pri prehajanju CO₂ skozi listne reže, skozi katere le-ta iz okoliškega zraka prehaja do kloroplasta. Lažji ¹²CO₂ prehaja na mesto vezave ogljika hitreje in zato CO₂ v listu v primerjavi z zunanjim CO₂ vsebuje manj ¹³C. Proces imenujemo frakcionacija pri difuziji in znaša -4,4 ‰ (McCarroll in Loader, 2004). Druga točka frakcionacije nastopi pri fiksaciji CO₂. Rastline so razvile različne poteke fotosintetske vezave ogljika, kar se odraža v precejšnjih razlikah v vrednosti izotopske sestave ogljika v rastlinskem tkivu. V veliki meri vsa drevesa spadajo med tako imenovane C3 rastline (rastline, pri katerih v procesu fiksacije ogljika kot prvi zaznavni produkt nastane spojina s tremi ogljikovimi atomi) (McCarroll in Loader, 2004). Glavni »krivec« diskriminacije proti ¹³C je primarni karboksilacijski encim RuBisCO, ki v procesu fiksacije ogljika raje veže ¹²C kot ¹³C, glavni vzrok za to diskriminacijo pa je manjša reaktivnost ¹³C (Farquhar in sod., 1982). Proces imenujemo frakcionacija pri karboksilaciji, ki je ocenjena na -27 ‰ (McCarroll in Loader, 2004).

UČINKOVITOST IZRABE VODE (WATER USE EFFICIENCY - WUE) IN VREDNOST IZOTOPSKE SESTAVE

Medtem ko odprte listne reže omogočajo sprejem CO₂ v rastlino, hkrati dopuščajo tudi izhajanje vodne pare iz listov v okolico. Z zapiranjem listnih rež rastlina omejuje izgubo vode, vendar hkrati omejuje tudi sprejem CO₂. Razmerje med asimiliranim CO₂ in transpiracijo vode se imenuje fotosintetska učinkovitost izrabe vode in predstavlja kvantitativno mero trenutne izmenjave plinov v listu. Vodna para in CO₂ se razlikujeta glede nekaterih osnovnih lastnosti, ki vplivajo na difuzijo plina. Koncentracijski gradient CO₂ med zunanjim zrakom in kloroplastom je manjši kot gradient vodne pare med notranjostjo lista in okoliško atmosfero, dokler se le-ta ne nasiči z vodno paro. Zato se transpiracija vode odvija precej hitreje kot sprejem CO₂. Vodne molekule so manjše kot molekule CO₂ in lahko hitreje prehajajo skozi listne reže v okoliško atmosfero. Med plinoma pa obstajajo tudi bistvene razlike v poti difuzije, ki je za CO₂ daljša in počasnejša (Larcher, 2001). V sušnih razmerah je za rastlino bolj pomembno omejevanje transpiracije (izgube vode) kot sprejem CO₂. Zaradi naštetih lastnosti obeh plinov se morajo listne reže bolj zapreti, da omejijo izhajanje vodnih molekul in s tem postanejo bolj nepropustne za CO₂ molekule (Kozłowski in Pallardy, 1997).

Glavni vpliv na $\delta^{13}\text{C}$ sladkorjev v listih in tudi na $\delta^{13}\text{C}$ branine ima razmerje med medcelično (c_i) in atmosfersko (c_a)

koncentracijo CO₂ (c_i/c_a), ki je posledica stopnje fotosinteze in prevodnosti listnih rež. Farquhar in sodelavci (1982) so za predstavitev izotopske sestave rastline uporabili model:

$$\delta^{13}\text{C}_{(\text{rastlina})} = \delta^{13}\text{C}_{(\text{zrak})} - a - (b - a)(c_i / c_a) \quad (\text{enačba 3}),$$

kjer je $a = -4,4 \text{ ‰}$ (frakcionacija pri difuziji) in $b = -27 \text{ ‰}$ (frakcionacija pri karboksilaciji). Najboljšo predstavo dobimo z ilustracijo dveh ekstremnih primerov. Ko je c_i v primerjavi s c_a visoka, je prevodnost listnih rež večja od fotosinteze in v tem primeru je karboksilacijska frakcionacija velika, kar se izkazuje v močni diskriminaciji rubisco proti ¹³C in manjšimi CO₂ ¹³C vrednostmi. $\delta^{13}\text{C}$ rastlin bi bila v tem primeru približno -38 ‰. Ob zmanjšani prevodnosti listnih rež oz. njihovem zaprtju medcelična koncentracija CO₂ upade, njegovo prehajanje v list pa je onemogočeno. Rastlina bo za fotosintezo porabila ves v listu še prisoten CO₂, rubisco zmanjša diskriminacijo proti ¹³C in ga veže v sladkorje, vrednost $\delta^{13}\text{C}$ naraste. Ob atmosferski vrednosti $\delta^{13}\text{C} -8 \text{ ‰}$ bi imelo rastlinsko tkivo s popolnoma zaprtimi listnimi režami hipotetično vrednost $\delta^{13}\text{C} -12,4 \text{ ‰}$ (-8 ‰ je $\delta^{13}\text{C}$ atmosferskega CO₂; -4,4 ‰ je diskriminacija pri prehajanju skozi listne reže).

Najpomembnejši okoljski dejavniki, ki kontrolirajo izotopsko sestavo rastlinskega tkiva (v našem primeru branine) so torej tisti, ki kontrolirajo tudi prevodnost listnih rež ter fotosintezo (McCarroll in Loader, 2004). Vrednost $\delta^{13}\text{C}$ v rastlini je lahko indikator WUE, saj je izotopska diskriminacija funkcija razmerja med medcelično in atmosfersko koncentracijo CO₂. Če predpostavimo, da je vrednost $\delta^{13}\text{C}$ atmosfere konstantna (-8 ‰), potem izotopska diskriminacija neposredno odseva sezonske spremembe v branki, kjer višja vrednost $\delta^{13}\text{C}$ odgovarja zmanjšani izotopski diskriminaciji in veliki WUE (Leavitt, 1992). Poleg diskriminacije proti ¹³C pri difuziji skozi listne reže ter fiksaciji ogljika v kloroplastu je razmerje stabilnih ogljikovih izotopov v različnih rastlinskih tkivih odvisno tudi od sekundarnih biokemičnih reakcij pri premeščanju in pretvorbah produktov fotosinteze (D'Alessandro in sod., 2004).

SPREMEMBE KONCENTRACIJE CO₂ V ATMOSFERI IN ORGANSKI SNOVI

LETNE SPREMEMBE

Sezonski cikel spremenjenih vrednosti razmerja ¹³C/¹²C v atmosferi s povišano koncentracijo ¹³C v poletnih mesecih se pojavlja zaradi diskriminacije pri prehajanju CO₂ v list in pri fotosintezi. Z letnim merjenjem variiranja $\delta^{13}\text{C}$ atmosferskega CO₂ neposredno nad plastjo krošenj dobimo podatek o učinku spremenjenih vrednosti v atmosferi na razmerje ¹³C/¹²C v organski snovi. Dobljeni rezultati so kljub majhnemu številu meritev potrdili dejstvo o manj-

ših vrednostih v zimskem obdobju in višjih v vegetacijski sezoni, saj $\delta^{13}\text{C}$ v atmosferskem CO_2 poleti naraste za približno 1 ‰. Vendar pa ta sprememba $\delta^{13}\text{C}$ atmosferskega CO_2 ne razloži porasta vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ mladega listja za 2 ‰ do 3 ‰ ob pojavu listov spomladi. V obdobju med majem in junijem sta trenda $\delta^{13}\text{C}$ atmosferskega CO_2 in organske snovi celo popolnoma nasprotna (Helle in Schleser, 2004). Vpliv spremembe koncentracije in izotopske sestave atmosferskega CO_2 je zato potrebno opazovati skozi daljši časovni okvir.

DOLGOROČNE GLOBALNE SPREMEMBE IN POVEZAVA S KLIMATSKIMI DEJAVNIKI

Pred industrijsko revolucijo je bila ocenjena koncentracija CO_2 v ozračju na povprečni ravni 280 ppm. Podatki observatorija Mauna Loa na Havajih prikazujejo 19,4 % porast povprečne letne koncentracije CO_2 v atmosferi med leti 1959 (316 ppm) in 2004 (377 ppm). Med letoma 1997 in 1998 je zabeleženo največje povečanje koncentracije atmosferskega CO_2 (za 2,9 ppm letno), odkar potekajo meritve. Povprečno letno povečanje sicer znaša 1,4 ppm (Atmospheric carbon, 2008). Mnogo polemik se poraja okoli vprašanja ali so spremembe v atmosferskem CO_2 zares posledica človekovega delovanja. Enega od odgovorov na to vprašanje nam podajajo meritve izotopske sestave branike (RealClimate, 2008). Fosilna goriva so organskega izvora in torej imajo nižje vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ kot ozračje. Antropogeno pogojena povečana koncentracija CO_2 zaradi izgorevanja fosilnih goriv se odraža v zmanjševanju vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ zraka za približno 1,5 ‰ od začetka industrializacije, ta trend pa se odseva tudi v branikah dreves (McCarroll in Loader, 2004). Na številnih lokacijah je bil opažen dolgoročni padajoči trend nestandardiziranih izotopskih kronologij. Ta trend lahko odraža naraščajočo koncentracijo atmosferskega CO_2 (129-360 ppm v zadnjih 100 letih) in je povezan z upadom vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ v organski snovi. Obstajajo pa tudi raziskave, kjer tega trenda ni bilo moč zaznati. Nekateri avtorji odsotnost padajoče vrednosti izotopske sestave CO_2 in trend razlagajo z različnimi možnimi razlogi, npr. reasimilacijo izdihanega CO_2 v sestoji (Treydte in sod., 2001).

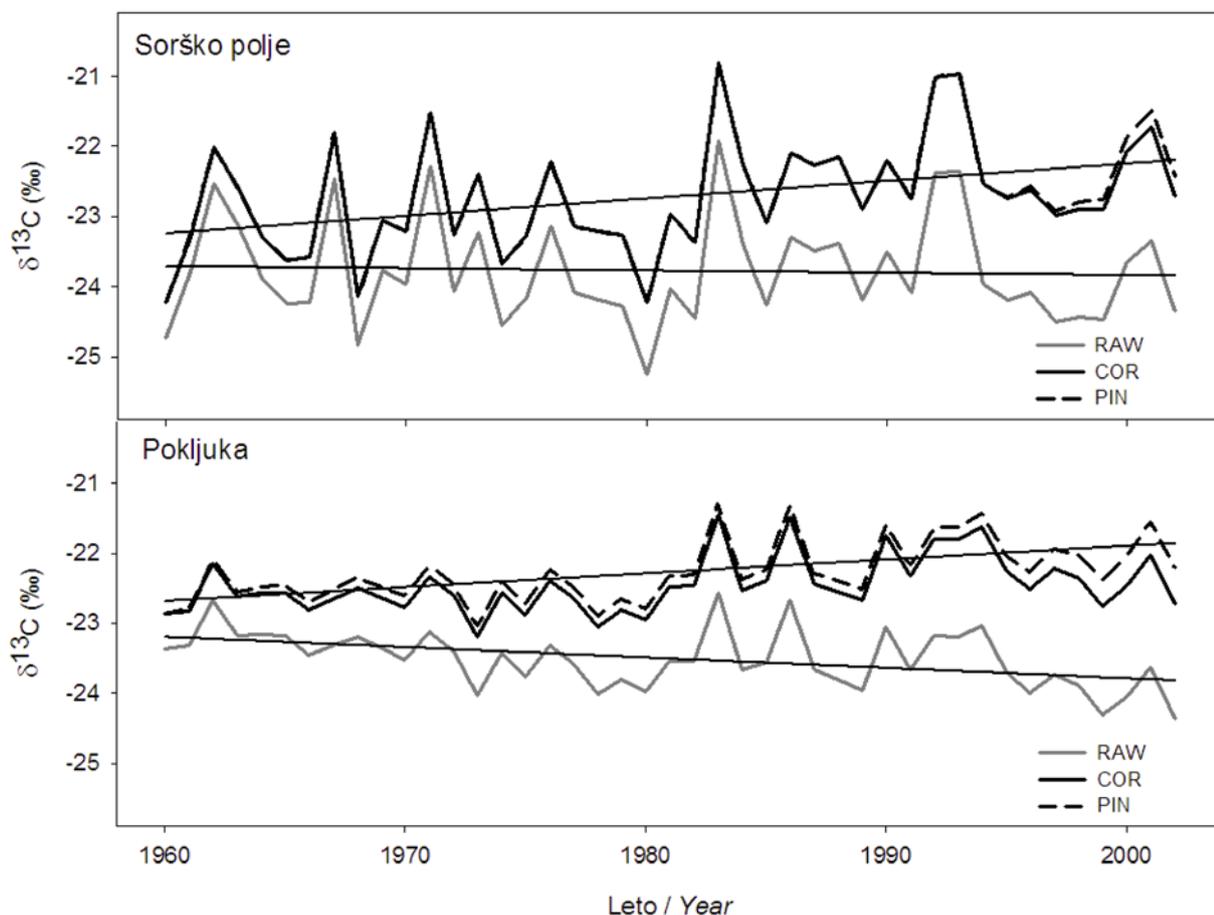
Izotopske kronologije je potrebno pred nadaljnimi analizami standardizirati. Odstranitev trenda, ki je posledica spremenjene koncentracije in izotopske sestave CO_2 v atmosferi je potrebna zato, ker nas v dendroklimatoloških raziskavah zanima odziv dreves na klimatske dejavnike, ne pa na spremenjeno količino in izotopsko sestavo CO_2 (Gagen in sod., 2007). Pred nadaljno analizo zato uvedemo dve korekciji surovih (RAW) podatkov. Namen teh dveh korekcij je oceniti, kakšna bi bila $\delta^{13}\text{C}$ branike, če bi ta nastala v pogojih, kakršni so bili pred industrijsko revolucijo (leto 1850).

Prva korekcija upošteva spremembe v izotopski zgradbi atmosferskega CO_2 , ki ima zaradi izgorevanja fosilnih goriv nižje $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti. Korekcija je razmeroma preprosta in preračuna izmerjene vrednosti na predindustrijsko izotopsko razmerje ogljika v atmosferi, ki je ocenjeno na -6,4 ‰ (Gagen in sod., 2007). Na ta način dobimo korigirano kronologijo (COR). Tudi po odstranitvi vpliva $\delta^{13}\text{C}$ atmosferskega CO_2 je pogosto še opazen padajoči trend $\delta^{13}\text{C}$ branik, ki se ne ujema s klimatskimi spremembami. Verjetna razlaga tega pojava je v fiziološkem odzivu rastlin na povečano c kot neposreden odziv na povišano koncentracijo CO_2 v atmosferi. Koncentracijo CO_2 v listu uravnava prevodnost listnih rež in stopnja fotosinteze. Če je ca stabilna, potem dvig $\delta^{13}\text{C}$ pomeni zmanjšanje prevodnosti listnih rež, zvišanje stopnje fotosinteze ali pa kombinacijo obojega. Klimatski dejavniki, ki jih potencialno lahko rekonstruiramo iz $\delta^{13}\text{C}$ kronologije branik, so torej tisti, ki kontrolirajo prevodnost listnih rež in stopnjo fotosinteze. Pri tem je nujno upoštevanje tudi značilnosti drevesne vrste, rastišča in klimatskega režima (McCarroll in Loader, 2004). Na sušnih rastiščih s plitvo plastjo prsti ima glavni vpliv prevodnost listnih rež in posledično dobimo visoke korelacije med $\delta^{13}\text{C}$ ter relativno zračno vlažnostjo in padavinami. V bolj vlažnem okolju pa prevladuje vpliv stopnje fotosinteze in višje korelacije s sončnim obsevanjem in temperaturo. S t.i. PIN korekcijo pretvorimo izotopsko razmerje v vrednosti c_i in nato ocenimo, kakšne bi bile vrednosti c_i v predindustrijski dobi. Dobimo kronologijo PIN, ki jo uporabimo za vse nadaljne analize (McCarroll in sod., 2009).

ŠTUDIJ PRIMERA KLIMATSKEGA SIGNALA V $\delta^{13}\text{C}$ KRONOLOGIJI SMREKE NA SORŠKEM POLJU IN NA POKLJUKI IN NJEGOVA PROSTORSKA DIMENZIJA

Teoretična izhodišča in modele smo preverili na študiji primera. V nadaljevanju predstavljeni rezultati so bili pridobljeni v okviru raziskovalnega projekta PINE (EVK2-CT-2002-00136) (Levanič in sod., 2008; Hafner in Levanič, 2009). Cilji študije primera so bili preveriti klimatski signal v izotopski kronologiji smreke na nižinskem in visokogorskem rastišču, preveriti njegovo rekonstrukcijsko moč in testirati klimatski signal tudi v širšem prostorskem okviru.

Raziskava je potekala na dveh smrekovih rastiščih, na nižinskem na Sorškem polju (350 m n.m.v.) in na visokogorskem na Pokljuki (1200 m n.m.v.). Nižinsko rastišče na Sorškem polju je za rast smreke sicer dokaj ugodno, je pa v poletnih mesecih podvrženo suši, zaradi tega in zaradi plitvih korenin je smreka podvržena sušnemu stresu in se zelo senzitivno odziva na pomanjkanje padavin. Viskogorsko rastišče smreke na Pokljuki spada med optimalna smrekova rastišča, poletja so relativno hladna in dobro



Slika 1: RAW, COR in PIN kronologija smreke na Sorškem polju in na Pokljuki ter trend v RAW in PIN kronologiji za obdobje 1960-2002. RAW – osnovna izotopska kronologija, surovi podatki; COR – korigirana kronologija, ki upošteva spremembe izotopske sestave atmosfere; PIN – korekcija, ki upošteva koncentracijo stabilnega izotopa ogljika v predindustrijski dobi.

preskrbljena s padavinami. Zaradi hladnega rastišča se smreka na Pokljuki pozitivno odziva, s širšo braniko, na nadpovprečno tople poletne mesece. Na vsakem rastišču smo petim drevesom z 12 mm svedrom odvzeli vzorce lesa, ki smo jih analizirali v izotopskem laboratoriju Univerze v Swansea, Wales (VB). Vse meritve razmerja stabilnega izotopa ogljika v branikah so bile izvedene na α -celulozi, ki smo jo ekstrahirali iz lesa posamezne branike. Meteorološke podatke za korelacijsko in kalibracijsko analizo smo pridobili od Agencije republike Slovenije za okolje (ARSO), za prostorsko analizo pa smo uporabili podatke CRU TS 1.2 meteorološke baze (Mitchell, 2008). V analizi smo se zaradi juvenilnega efekta v izotopski kronologiji omejili samo na obdobje 1960-2002 (Levanič in sod., 2008; Hafner in Levanič, 2009).

Na sliki 1 so prikazane vse tri v uvodnem delu opisane kronologije (RAW, COR in PIN). RAW vrednosti so bolj ne-

gativne in imajo padajoč trend, ki je na Pokljuki bolj izrazit kot na Sorškem polju. Po vpeljavi korekcije zaradi spremenjene izotopske sestave atmosferskega CO_2 se vrednosti kronologije nekoliko dvignejo. Bolj ko se približujemo sedanjosti, večji vpliv ima korekcija na kronologijo, saj $\delta^{13}\text{C}$ atmosferskega CO_2 s približevanjem sedanjosti postaja vedno bolj negativna. Na Sorškem polju se vpliv spremenjene koncentracije CO_2 pokaže le v zadnjem desetletju. Na Pokljuki pa PIN korekcija vpliva na $\delta^{13}\text{C}$ branik celotnega analiziranega obdobja. To pomeni, da je odklon $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti v kronologiji na Sorškem polju skoraj popolnoma pojasnjen s spremenjeno $\delta^{13}\text{C}$ atmosfere, medtem ko je na Pokljuki bolj prisoten tudi vpliv spremenjene koncentracije atmosferskega CO_2 .

Osnovna korelacijska analiza med klimatskimi podatki in PIN korigirano izotopsko kronologijo pokaže, da na razmerje stabilnih ogljikovih izotopov v braniki najbolj vpli-

vata povprečje julijskih in avgustovskih povprečnih mesečnih temperatur ter vsota mesečnih padavin v juliju in avgustu. Smreke na nižinskem rastišču Sorško polje imajo nekoliko slabši odziv na nadpovprečne temperature v juliju in avgustu in nekoliko močnejši odziv na nadpovprečne količine padavin v juliju in avgustu in obratno, na visokogorskem rastišču Pokljuka se smreke nekoliko močnejše odzivajo na nadpovprečne temperature v juliju in avgustu ter nekoliko šibkeje na nadpovprečne padavine v juliju in avgustu.

Iz slike 2 in 3 je razviden odziv $\delta^{13}\text{C}$ branik na spremembo temperatur in padavin. Ob porastu temperature vrednost $\delta^{13}\text{C}$ branik naraste (je manj negativna) in obratno, ob nižjih temperaturah je tudi vrednost $\delta^{13}\text{C}$ branik nižja (je bolj negativna). Variabilnost v $\delta^{13}\text{C}$ branik posameznih let je na Sorškem polju bolj izrazita kot na Pokljuki. Smreka na Sorškem polju je zaradi plitvejšega koreninskega sistema, višjih poletnih temperatur in pogostega pomanjkanja padavin v najbolj kritičnih mesecih v sušnem stresu. Zaradi

Preglednica 1: Vrednosti Pearsonovega korelacijskega koeficienta med PIN korigirano izotopsko kronologijo in klimatskimi podatki za posamezne mesece od aprila do septembra in za različne kombinacije poletnih mesecev od maja do septembra za obe analizirani rastišči – Sorško polje in Pokljuka za obdobje 1960–2002.

	Temperature		Padavine	
	Sorško polje	Pokljuka	Sorško polje	Pokljuka
Apr	0.26	0.31	0.05	-0.14
Maj	0.50	0.47	-0.09	0.02
Jun	-0.01	0.11	-0.26	0.10
Jul	0.52	0.57	-0.37	-0.40
Avg	0.54	0.62	-0.29	-0.16
Sept	-0.11	-0.09	0.09	0.05
JJ	-	-	-0.47	-0.17
JA	0.61	0.67	-0.51	-0.50
MJ	0.31	0.39	-0.16	0.15
JJA	0.52	0.61	-0.54	-0.31
MJJ	0.53	0.62	-0.54	-0.31
MJJA	0.59	0.65	-0.47	-0.25
MJJAS	0.50	0.56	-0.46	-0.23

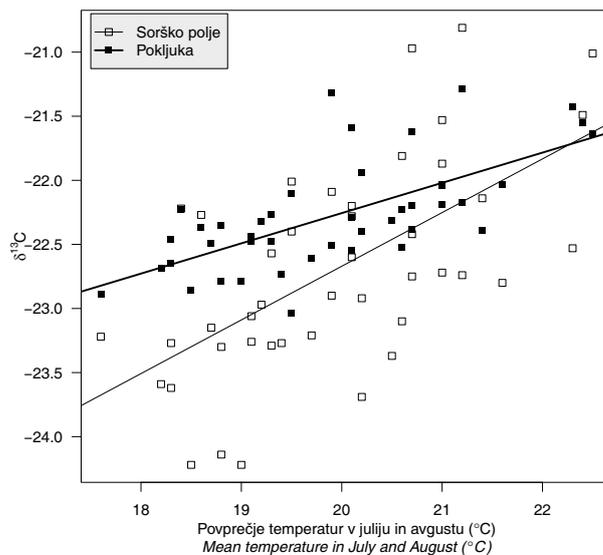
Kombinacija vpremskih parametrov za:

JJ ... junij in julij; JA ... julij in avgust; MJ ... maj in junij; JJA ... junij, julij in avgust; MJJ ... maj, junij in julij; MJJA ... maj, junij, julij in avgust; MJJAS ... maj, junij, julij, avgust in september.

tega se intenzivneje odziva na spremembe okoljskih dejavnikov. Na Pokljuki, kjer so razmere za rast smreke optimalne do suboptimalne, je nizka temperatura omejujoč dejavnik, zato višje temperature ugodno vplivajo na rast, to se vidi tudi iz višjih vrednosti regresijskega koeficienta – preglednica 2.

Padavine so v negativni korelaciji z izotopskimi vrednostmi v branikah. Na sušnejšem rastišču, na Sorškem polju, imajo padavine v rastni sezoni ugoden vpliv na rast drevesa, kar ima za posledico bolj negativne vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ v branikah. Na Pokljuki pa so nadpovprečne padavine večinoma povezane tudi z nekoliko nižjimi temperaturami v rastni sezoni. Naklon regresijske premice je posledično manjši, tako kot tudi korelacija med meteorološkimi parametri in $\delta^{13}\text{C}$ branik – preglednica 2 in slika 3. Poleg tega pa imajo vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ branik nekoliko manjšo variabilnost in se manj občutljivo odzivajo na okoljske spremembe.

Visoke korelacijske vrednosti med stabilnimi izotopi ogljika v branikah smreke in klimatskimi podatki, nam ob pogoju, da ustrezajo še ostali statistični kriteriji (RE, CE in MSE), omogočajo rekonstrukcijo klime v obdobje pred instrumentalnimi meritvami. Statistični kazalci, ki kažejo robustnost statistične rekonstrukcije klime v preteklosti so RE - »reduction of error statistics« oz. statistika odprave napake (Fritts, 1976) in CE - »coefficient of efficiency« oz. koeficient učinkovitosti (Cook in sod., 1994) v preglednici 3. Tako RE kot CE morata biti večja od nič, da na kronolo-



Slika 2: Vpliv povprečnih mesečnih temperatur v juliju in avgustu na razmerje stabilnih izotopov ogljika v branikah smrek na Sorškem polju (tanki črta, prazni kvadrati) in Pokljuki (debela črta, polni kvadrati) v obdobju 1960–2002.

Preglednica 2: Osnovni parametri regresijskih enačb odvisnosti razmerja stabilnega izotopa ogljika v branih od kombinacije povprečnih mesečnih temperatur v juliju in avgustu ter skupne vsote mesečnih padavin v juliju in avgustu na Sorškem polju in Pokljuki v obdobju 1960–2002. Vsi regresijski koeficienti so visoko značilni - ***

Lokacija	Parameter	Meseci	r ²	b ₀	b ₁
Sorško polje	Temperature	julij-avgust	0,38	-31,05 ***	0,42 ***
	Padavine	julij-avgust	0,37	-20,22 ***	-0,0061 ***
Pokljuka	Temperature	julij-avgust	0,45	-26,98 ***	0,24 ***
	Padavine	julij-avgust	0,12	-21,53 ***	-0,0018 ***

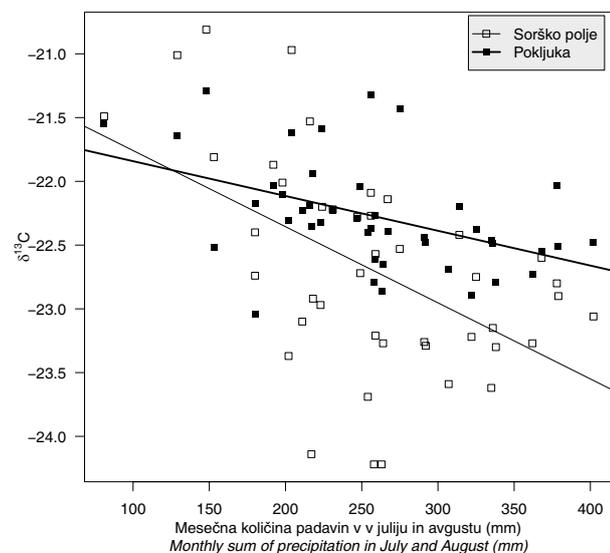
r² ... regresijski koeficient / coefficient of determination

b₀ ... presečišče regresijske črte z Y osjo / intercept of the regression curve with Y axis

b₁ ... naklon regresijske črte / slope of the regression curve

giji stabilnih ogljikovih izotopov temelječa rekonstrukcija verodostojno prikazuje klimo v obdobju pred instrumentalnimi meritvami. V našem primeru je RE večji od 0. CE statistika ne zadošča kriteriju pozitivne vrednosti, kar glede na relativno kratko kalibracijsko in verifikacijsko obdobje in posledično majhno število stopinj prostosti niti ni presenetljivo in je v skladu z viri (Anonymous, 2006).

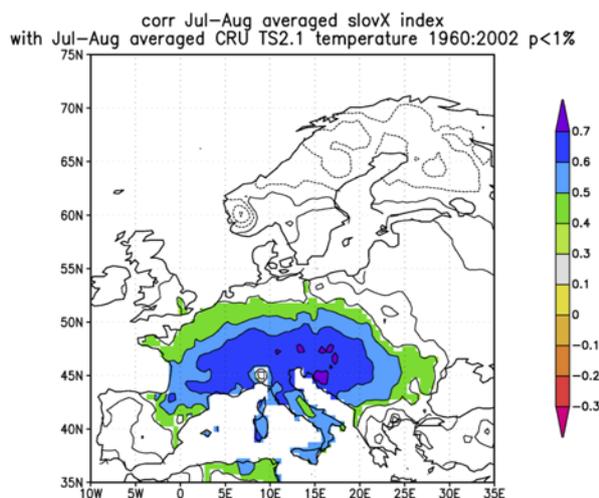
Visoka korelacija s povprečno temperaturo v juliju in avgustu ($r = 0,61$ na Sorškem polju in $r = 0,67$ na Pokljuki) in padavinami v juliju in avgustu ($r = 0,51$ na Sorškem polju in $r = 0,50$ na Pokljuki) potrjuje možnost razmeroma natančne rekonstrukcije poletnih temperatur v preteklosti



Slika 3: Vpliv skupne količine padavin v juliju in avgustu na razmerje stabilnih izotopov ogljika v branih smrek na Sorškem polju (tanka črta, prazni kvadrati) in Pokljuki (debela črta, polni kvadrati) v obdobju 1960–2002.

ob predpostavki, da imamo na razpolago daljše obdobje za kalibracijo in verifikacijo (zaradi negativnega CE).

Preizkusili smo tudi rekonstrukcijski potencial izotopskega signala v smrekah s Pokljuke in s Sorškega polja v širšem prostorskem okviru. S pomočjo spletne aplikacije za izračun prostorske statistike (Van Oldenborgh, 1999) smo izračunali korelacije med rekonstruiranim povprečjem julijske in avgustovske temperature ter izmerjenimi meteorološkimi podatki. Rezultati so pokazali, da ima rekonstrukcija povprečnih julijskih in avgustovskih temperatur, ki temelji na razmerju stabilnega izotopa ogljika v brani, ne samo močan lokalni, pač pa tudi zelo močan regionalni signal. Klimatski signal v razmerju ogljikovih izotopov



Slika 4: Prikaz prostorske korelacije med rekonstruiranim povprečjem za julijske in avgustovske temperature in izmerjenimi povprečnimi julijskimi in avgustovskimi mesečnimi temperaturami za obdobje 1960–2002 (Van Oldenborgh, 1999). Prikazane so samo značilne korelacije ($p < 0.01$).

Preglednica 3: Kalibracijska in verifikacijska statistika izotopskih smrekovih kronologij s Sorškega polja ($\delta^{13}\text{C}_{\text{sor}}$) in Pokljuke ($\delta^{13}\text{C}_{\text{pok}}$). Tabela prikazuje parametre za kalibracijsko (1982-2002) in verifikacijsko obdobje (1960-1981). Kalibracijo in verifikacijo smo izvedli tudi v obratni smeri.

	Kalibracija 1982–2002					Kalibracija 1960–1981			
	Pearsonov r	r^2_{ver}	MSE	RE	CE	r^2_{ver}	MSE	RE	CE
$\delta^{13}\text{C}_{\text{sor}}$	0,61	0,30	1,76	0,43	-1,54	0,14	1,97	0,41	-1,01
$\delta^{13}\text{C}_{\text{pok}}$	0,67	0,12	1,37	0,55	-0,98	0,20	1,52	0,55	-0,55

v branikah smreke je tako robusten, da tudi na majhnem številu dreves in omejenem številu lokacij temelječe kronologije vsebujejo potencial za rekonstrukcijo klime na širšem prostorskem nivoju (slika 4).

Študija primera je pokazala, da imajo izotopske kronologije zelo kvaliteten in robusten (stabilen) klimatski signal, ki ima poleg lokalnega tudi zelo velik regionalni signal. V primerjavi s kronologijami širin branik ali kronologijami maksimalnih gostot kasnega lesa v braniki je sestava izotopskih kronologij z vidika priprave in analize vzorcev bolj zahtevna in dolgotrajna, vendar je za primerljiv ali boljši klimatskih signal potrebnih bistveno manj vzorcev kot za prvi dve kronologiji. Nekaj razlike je tudi v samem klimatskem signalu oziroma odzivu. V primerjavi s kronologijami širin branik, kjer je odziv na klimo vezan predvsem na zgodnje poletne mesece (večinoma maj ali junij), je klimatski odziv v izotopskih kronologijah najpogosteje vezan na pozno poletne mesece (julij in avgust), kar je podobno kot pri kronologijah maksimalnih gostot kasnega lesa.

LITERATURA

- Atmospheric carbon dioxide record from Mauna Loa. (2008)** CDIAC. <http://cdiac.ornl.gov/trends/CO2/sio-mlo.htm> (19.8.2008)
- Anonymous (2006)** Surface Temperature Reconstructions for the Last 2,000 Years. Washington, D.C., The National Academies Press, 145
- Badeck F.-W., Tcherkez G., Noguéz S., Piel, C. Ghashghaie J. (2005)** Post-photosynthetic fractionation of stable carbon isotopes between plant organs - a widespread phenomenon. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 19, 11: 1382-1391
- Cook E. R., Briffa K. R., Jones P. D. (1994)** Spatial regression methods in dendroclimatology: a review and comparison of two techniques. International Journal of Climatology, 14: 379-402.
- D'Alessandro C. M., Guerrieri M. R., Saracino A. (2004)** Comparing carbon isotope composition of bulk wood and holocellulose from *Quercus cerris*, *Fraxinus ornus* and *Pinus radiata* tree rings. Forest, 1: 51-57
- Dawson T. E., Brooks P. D. (2001)** Fundamentals of Stable Isotope Chemistry and Measurement. V: Stable Isotope Techniques in the Study of Biological Processes and Functioning of Ecosystems. Unkovich, M. (Ur.), Pate, J. (Ur.), McNeill, A. (Ur.), Gibbs, D. J. Dordrecht. 40: 1-18
- Farquhar G. D., Leary M. H. O., Berry, J. A. (1982)** On the Relationship between Carbon Isotope Discrimination and the Inter-cellular Carbon Dioxide Concentration in Leaves. Australian Journal of Plant Physiology, 9: 121-137
- Fritts H. C. (1976)** Tree rings and climate. London, New York, San Francisco, Academic Press, 567
- Gagen M., McCarroll D., Loader N. J., Robertson I., Jalkanen R., Anchukaitis K. J. (2007)** Exorcising the segment length curse summer temperature reconstruction since AD 1640 using non-detrended stable carbon isotope ratios from pine trees in northern Finland. The Holocene, 17: 435-446
- Hafner P., Levanič T. (2009)** Stable carbon isotopes in norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) tree rings at two sites in Slovenia. Zbornik gozdarstva in lesarstva, 88: 43-52
- Helle G., Schleser G. H. (2004)** Beyond CO_2 -fixation by Rubisco – an interpretation of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ variations in tree rings from novel intra-seasonal studies on broad-leaf trees. Plant, Cell and Environment, 27: 367-380
- Kozłowski T. T., Pallardy S. G. (1997)** Physiology of Woody Plants. California, London, Academic Press, 411
- Larcher W. (2001)** Physiological Plant Ecology. Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Springer, 511
- Leavitt S. W. (1992)** Seasonal $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ changes in tree rings: species and site coherence, and a possible drought influence. Canadian Journal of Forest Research, 23: 210-218.
- Levanič T., Gričar J., Gagen M., Jalkanen R., Loader N. J., McCarroll D., Oven P., Robertson I. (2008)** The climate sensitivity of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in the southeastern European Alps. Trees, 23: 169-180
- McCarroll D., Gagen M. H., Loader N. J., Robertson I., Anchukaitis K. J., Los S., Young G. H. F., Jalkanen R., Kirchhefer A., Waterhouse J. S. (2009)** Correction of tree ring stable carbon isotope chronologies for changes in the carbon dioxide content of the atmosphere. Geochimica et Cosmochimica Acta, 73: 1539-1547
- McCarroll D., Loader N. J. (2004)** Stable isotopes in tree rings. Quaternary Science Reviews, 23: 771-801
- McCarroll D., Loader N. J. (2005)** Isotopes In Tree Rings. V: Isotopes in Palaeoenvironmental Research. Leng M. J., Springer. 67-116.
- Mitchell T. (2008)** CRU TS 1.2. <http://www.cru.uea.ac.uk/~timm/index.html> (4.8.2008)
- Mook W. G. (2000)** Environmental isotopes in the hydrological cycle. Principles and applications - Introduction. Theory Methods Review. Mook, W. G., IHP-V. Technical Documents in Hydrology.
- Pezdič, J. (1999)** Izotopi in geokemijski procesi. Naravoslovnotehniška fakulteta, Oddelek za geologijo, Ljubljana, 269
- Treydte K., Schleser G. H., Schweingruber F. H., Winiger M. (2001)** The climatic significance of ^{13}C in subalpine spruces (Latschental, Swiss Alps) - A case study with respect to altitude, exposure and soil moisture. Tellus, 53B: 593-611
- Van Oldenbourg G. J. (1999)** KNMI Climate explorer. <http://climexp.knmi.nl> (16.3.2010)
- Warren C. R., Mcgrath J. F., Adams M. A. (2001) Water availability and carbon isotope discrimination in conifers. Oecologia, 127: 476-486

INVAZIVNI ŠKODLJIVI ORGANIZMI SPREMINJAJO GOZD

Invasive harmful organisms change forest

Povzetek: Ksilofagne in floemofagne vrste žuželk v gozdu s svojimi prehranjevalnimi navadami pripomorejo k mehanski drobitvi lesne mase. Mnogo vrst gliv razgrajuje les s procesi trohnenja. Vsi organizmi v biocenozah so vpleteni v kroženje snovi in pretakanje energije v ekosistemu. Delovanje ekosistema je občutljivo in se lahko hitro nepopravljivo spremeni, če v njem nastopi nova enota, ki poseže v njegovo delovanje. Obstaja velika verjetnost, da bodo v slovenske gozdove z globalno trgovino prineseni invazivni škodljivi organizmi. Mnogi tujerodni organizmi bi lahko povzročili drastično propadanje naših najbolj pogostih drevesnih vrst. Spremenijo lahko podobo gozda, kot ga poznamo. To se je v preteklosti že večkrat zgodilo. Zgled: kostanjev rak in holandska brestova bolezen. Zdaj slovenskemu gozdu pretijo nove nevarnosti. Odgovornost države in stroke je, da naredi vse, da prepreči vnos novih invazivnih škodljivih organizmov v slovenske gozdove. Ohranimo in varujemo eno naših največjih vrednot - gozd!

Ključne besede: motnja, sprememba, trohnenje, karantena, *Phytophthora ramorum*, *Anoplophora chinensis*, *Bursaphelenchus xylophilus*, *Gibberella circinata*

Abstract: Xylophagous insects in forest with their feeding habits and activity break wood into small pieces. Many fungi decompose wood with the process of decay. All organisms in the biocenosis are part of matter circulation and energy flow in the ecosystem. The ecosystem function is sensitive and can quickly and irreversibly change when new unit appear that affects its function. There is high probability that new invasive pests will be introduced to Slovenian forest with global trade. Many invasive pests have a potential to induce drastic dieback of our most frequent tree species. They can change the outlook of forest as we know it. This already happened in the past, e.g. with sweet chestnut blight and Dutch elm disease. There are new threats to Slovenian forests now. The responsibility of the country and forestry is to do everything necessary to prevent introduction of new invasive harmful organisms. Protect one of ours greatest value - forest!

Keywords: disturbance, change, decay, quarantine, *Phytophthora ramorum*, *Anoplophora chinensis*, *Bursaphelenchus xylophilus*, *Gibberella circinata*

UVOD

Žuželke so daleč najštevilčnejša skupina organizmov na Zemlji, številne so povezane z drevjem in mu lahko škodijo. Žrejo, vrtajo, grizejo, glodajo, izjedajo in sesajo vse dele lesnih rastlin. Glive so gonilna sila pri kroženju organskega ogljika na kopnem, saj so ključni člen pri razgradnji lesa, trohnenju, to je procesu, kjer se celuloza in hemiceluloza razgradita na ogljikov dioksid in vodo. Trohnenje je proces, ki vrne vezan ogljik v lesu v kroženje v gozdni ekosistem. Žuželke in glive imajo moč, s katero lahko popolnoma spremenijo gozdni ekosistem in definirajo zdravje gozda.

Z globalno trgovino in prometom k nam vnašamo nove invazivne vrste gliv in druge škodljive organizme za gozd, ki s svojim pojavom, namnožitvijo in aktivnostjo spremenijo kroženje snovi in pretok energije v gozdnem ekosistemu. Povzročajo poškodbe drevja in vplivajo na zdravje gozda. Z veliko verjetnostjo lahko pričakujemo, da bodo v prihodnosti k nam prineseni škodljivi organizmi, katerim ne bomo mogli preprečiti ustatitve v naših gozdovih s predpisanimi karantenskimi ukrepi. Takšni škodljivi organizmi so npr. kitajski kozliček (*Anoplophora chinensis* Forster) in azijski kozliček (*A. glabripennis* Motschulsky), fitoftorna sušica vejic (*Phytophthora ramorum* Werres, De Cock & Man in 't Veld, P. kernoviae Brasier, Beales & S.A. Kirk), borov smolasti rak (*Gibberella circinata* Nirenberg & O'Donnell) in borova

* Gozdarski inštitut Slovenije, Večna pot 2, 1000 Ljubljana, e-pošta: nikica.ogris@gozdis.si

ogorčica (*Bursaphelenchus xylophilus* /Steiner & Buhrer/ Nickle). Našteti škodljivci organizmi in mnogi drugi so lahko vzrok za drastično propadanje naših najpogostejših drevesnih vrst (bukve, hrastov, borov in javorov).

Fitoftorna sušica vejic je v Veliki Britaniji povzročila propad večjih površin bukve in rododendronov (Brasier in sod., 2005). V Kaliforniji povzroča bolezen "Sudden oak death". Takšen naziv je bolezen dobila z razlogom, ker povzroča izredno hiter - nenaden propad hrastov (Brasier in sod., 2004). V Sloveniji upravičeno pričakujemo, da bi lahko fitoftorna sušica vejic povzročila obsežno in hitro sušenje bukve ter hrastov. V Veliki Britaniji imajo v podrasti rododendrone, na katerih *Phytophthora* sporulira. Pri nas raste borovnica, ki bi lahko prevzela vlogo rododendronov. Bolezen prepoznamo po značilnih črnih madežih na svetli skorji bukve, iz katerih se pogostokrat izceja črna tekočina (slika 1). Pod takšnim madežem je skorja nekrotična in obarvana od svetlo rjave do temno rjave, včasih je rahlo vijoličaste barve. V Slovenskih gozdovih še nismo zabeležili invazivnih vrst *P. ramorum* ali *P. kernoviae*. Zastopane so druge domače vrste fitofter, npr. vrsti *P. cambivora* in *P. plurivora*. Vse vrste fitofter povzročajo enake simptome. Zato moramo za vsak primer bolezni posebej odvzeti vzorec in ga poslati v pooblaščen laboratorij za natančno določitev vrste. Vsako leto prestrežemo okužene okrasne rododendrone s *P. ramorum* ali *P. kernoviae*. Leta 2004 so pri nas odkrili uvožene okužene okrasne rododendrone (Žerjav in Munda, 2005). Samo vprašanje časa je, ko karantenski ukrepi in fitosanitarni pregledi ne bodo dovolj ter se bo bolezen razširila v naše gozdove in jih spremenila za vedno.

Na Portugalskem se izjemno hitro širi borova ogorčica, ki uničuje obširne površine borov. Vsi ukrepi in poskusi



Slika 1: Črni madeži na skorji bukve, okužene s *Phytophthora* spp. (foto: Nikica Ogris, 2009)

omejitve širjenja škodljivega organizma na Portugalskem so bili do zdaj neuspešni. Borova ogorčica navadno v eni sezoni povzroči propad odraslega drevesa. Med zelo občutljive drevesne vrste, ki rastejo v Sloveniji, spadajo rdeči bor, črni bor in evropski macesen. Napad se lahko zelo hitro širi iz sestoja v drug sestoj tudi do en kilometer v stran, ker borovo ogorčico prenašajo kozlički iz rodu žagovinarjev (*Monochamus*). Slednji so vektorji karantenskega škodljivca. V Sloveniji so prisotni in zato obstaja velika potencialna nevarnost hitrega širjenja borove ogorčice v primeru, ko se bo vnos zgodil. Predvidevamo, da se bo vnos borove ogorčice zgodil z uvozom okuženega lesa, lubja, ali lesenega pakirnega materiala. Najbolj verjeten način vnosa je z uvozom lesa, v katerem bodo okuženi kozlički, ki bi lahko prenesli borovo ogorčico na gostitelja (EPPO, 1986; Jurc in sod., 2003).

Gliva *Gibberella circinata* (anamorf *Fusarium circinatum*) povzroča bolezen borov, ki jo po značilnih rakastih tvorbah na deblu in vejah ter obilnem izcejanju smole imenujemo borov smolasti rak (EPPO, 2005). Borov smolasti rak so leta 2005 zasledili v Španiji, 2007 v Italiji in 2008 na Portugalskem. Bolezen so odkrili v sestojih bora *Pinus radiata* D. Don (Španija, Portugalska) in na posamičnih alepskih borih (*P. halepensis* Miller) ter pinijah (*P. pinea* L.), rastočih v urbanem okolju (Italija). Borov smolasti rak v prvi vrsti predstavlja grožnjo drevesnicam, saj lahko tam uniči celotno pridelavo sadik vseh vrst borov. Predvidevamo, da bomo bolezen v Slovenijo nehote zanesli z okuženim semenom okrasnih vrst borov, lahko pa tudi z okuženimi sadikami bora.

Kitajski in azijski kozliček sta od 25 mm do 35 mm velika hrošča črne barve z belimi točkami nepravilne oblike na pokrovkah (slika 2). Tipalke so sestavljene iz 11 lenov, so belo modre barve na osnovi in so od 1,3 do 2,5 krat daljše kot telo hrošča (EPPO, 1999). Največjo škodo povzročajo ličinke, ki dolbejo rove v deblu. Ličinke azijskega kozlička napadajo večinoma veje v krošnji, za razliko od ličink kitajskega kozlička, ki napadajo korenine in korenčnik. Kozlička napadeta veliko število lesnatih rastlin. Najpogosteje ju najdemo na javorju, divjem kostanju, topolu, vrbah, jelši, brezi, platani, gabru, bukvi in hrastu. V Evropo je bil kitajski kozliček že večkrat vnesen. Vnesen je bil s sadikami javorja ter bonsajev iz daljnega vzhoda, predvsem iz Kitajske. Škodljivec je zdaj navzoč v Italiji na območju pokrajine Lombardija na več kot 100 km², kjer se pojavlja predvsem v urbanem okolju. Večkrat je bil prestrežen na sadikah javorja na Nizozemskem, v Nemčiji in Veliki Britaniji. S sadikami javorja je bil zanesen tudi v Nemčijo in Avstrijo. Azijski kozliček je bil v Evropo vnesen z lesenim pakirnim materialom pri uvozu granita s Kitajske. Večkrat se je pojavil na drevesih v okolici skladišč uvoznikov. Doslej je bil v Evropski uniji najden v Avstriji, Nemčiji, na Poljskem, v Franciji in Italiji. Ker

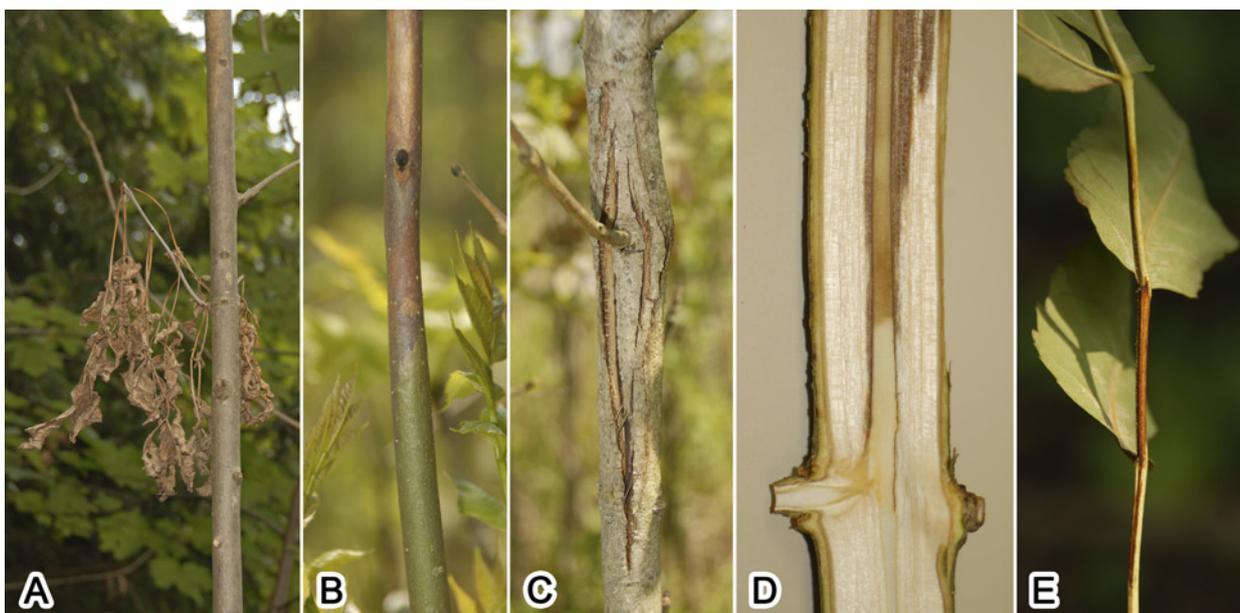


Slika 2: Odrasla žuželka *Anoplophora glabripennis* (foto: Michael Bohne, Bugwood.org)

sta kitajski in azijski kozliček že prisotna v sosednji Italiji in Avstriji, je samo še vprašanje časa, kdaj se bosta škodljivca razširila v Slovenske gozdove in urbano okolje.

V slovenskem gozdarstvu pomnimo vsaj dve epifitociji zaradi tujerodnih organizmov: kostanjev rak (*Cryphonectria parasitica* /Murrill/ M.E. Barr) in holandska brestova bolezen (*Ophiostoma ulmi* /Buisman/ Nannf. in O. novo-ulmi Brasier), ki so skoraj iztrebili pravi kostanj in breste (Jurc, 2002). Parazita sta v relativno kratkem času povzročila propad ogromne količine dreves ter spremenila strukturo in sestavo gozda. V gozdovih sta sprožila drugačno pot sukcesije in intenzivnejše kroženje snovi v gozdnem ekosistemu.

Pred kratkim smo v gozdovih Slovenije zabeležili nove invazivne organizme, npr. jesenov ožig (*Chalara fraxinea* T. Kowalski), javorov rak (*Eutypella parasitica* R.W. Davidson & R.C. Lorenz) in kostanjevo šižkarico (*Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu) (Jurc in sod., 2006; Piškur in sod., 2007; Ogris in sod., 2009; Seljak, 2007) Jesenov ožig se je v Evropi najprej pojavil v Litvi in na Poljski v sredini 90. let prejšnjega stoletja. V vsega 15. letih se je razširil na večji del Evrope, vse do Francije, Italije in Norveške. Glivo *C. fraxinea*, povzročiteljico jesenovega ožiga, smo v Sloveniji odkrili leta 2006 (Ogris in sod., 2009). Jesenov ožig se je samo v enem letu razširil na območje cele države. Povzroča propadanje tako mladih kot tudi starih jesenov. Okuženi mladi jeseni navadno propadejo v enem ali dveh letih, starejši jeseni pa se posušijo v 5 do 15 letih. Če bo razvoj boleznici pri nas podoben kot v Litvi, potem obstaja verjetnost, da bo v naslednjih 15 letih propadlo do 60 % vseh jesenov v Sloveniji. To bo predstavljalo zelo veliko količino odmrle lesne mase in motnjo, spremembo v gozdovih, kjer se pojavlja jesen. Jesenov ožig prepoznamo po naslednjih simpto-



Slika 3: Bolezenska znamenja jesenovega ožiga (*Chalara fraxinea*): (A) venenje listov, (B) nekroza skorje, (C) rak, ki se razvije v okolici odmrlega poganjka, (D) rjavkasto obarvan les in stržen, (E) nekroza na listnem peclju (foto: Nikica Ogris, 2009)

mih (slika 3): venenje listov, nekroza skorje, rak, ki se razvije navadno v okolici odmrlega poganjka, rjavkasto obarvan les pod nekrotično skorjo, nekroza na listnem peclju. Bolezen povzroča sušenje poganjkov, vej in celih dreves. Zaradi nje lahko jesen prezgodaj zgubi liste, npr. že meseca avgusta. Med vrstami jesena je najbolj občutljiv poljski ali ozkolistni jesen (*Fraxinus angustifolia* Vahl) in veliki jesen (*Fraxinus excelsior* L.). Med posameznimi drevesi opažamo individualno odpornost, kar daje kanček upanja za obstoj jesena v Sloveniji.

Javorov rak je v nasprotju z jesenovim ožigom počasi predujoča bolezen, vendar je specializirana in prilagojena na svojega gostitelja (Davidson in Lorenz, 1938). V Sloveniji je javorov rak ustaljena bolezen, katere izvor je Severna Amerika, in v manjši meri vpliva na razvoj sestoja, kjer se pojavlja. Kostanjeva šiškarica redko uniči svojega gostitelja, vendar zmanjša asimilacijsko površino s tvorbo šišk in posledično letni prirastek lesa ter tako posredno vpliva na kroženje snovi v gozdu. Ni pomembno, kateri del drevesa poškoduje škodljiv organizem, vedno se to neposredno in / ali posredno kaže na spremenjenem poteku kroženja snovi in pretoka energije najprej na ravni drevesa potem pa še na ravni ekosistema.

V prihodnosti pričakujemo vnos novih škodljivih organizmov za gozd, ki bodo povzročili odmiranje večje količine dreves v gozdu. Pri tem je prostorska dimenzija spremembe od posameznega drevesa do ravni celega sestoja in gozda. V časovni dimenziji pa so takšne spremembe v gozdu večinoma ireverzibilne. Zato moramo tako na nivoju države kot na nivoju stroke storiti vse, da preprečimo vnos novih invazivnih škodljivih organizmov v slovenske gozdove.

Ko se vnos škodljivega invazivnega organizma enkrat zgodi, je njegovo širjenje zelo težko omejiti, še posebej v primerih, ko se organizem prenaša s pomočjo vektorja, ki leti na večje razdalje. Takšen primer je borova ogorčica na Portugalskem, kjer so v 3 km širokem varovalnem pasu na površini 130.000 ha okoli začetnega karantenskega območja posekali vse bore in druge gostitelje do konca leta 2007 (Rodrigues, 2008). Kljub drastičnemu ukrepu, ki naj bi preprečil širjenje borove ogorčice, se je borova ogorčica razširila na nova območja za varovalnim pasom. Na podoben problem omejitve širjenja škodljivega invazivnega organizma bomo naleteli, ko bomo vnesli kitajskega ali / in azijskega kozlička, saj oba letita. Preventivni ukrepi so v primerjavi s sanacijskimi veliko bolj učinkoviti, ker z njimi ukrepamo, preden se invazivni organizem vnese in ustali v novem okolju. Gozd opravlja številne funkcije in zato predstavlja eno največjih vrednot, ki jih ima Slovenija. Gozd želimo ohraniti in varovati pred škodljivimi dejavniki. Z vlaganjem v preprečevanje vnosa invazivnih vrst bomo zagotovo naredili zelo veliko za varstvo gozdov.

ZAHVALA

Zahvaljujemo se Programski skupini za gozdno biologijo, ekologijo in tehnologijo (P4 0107) za finančno podporo in doc. dr. Dušanu Jurcu za izboljšave prispevka.

LITERATURA

1. **Brasier C.M., Beales P.A., Kirk S.A., Denman S., Rose J. (2005)** *Phytophthora kernoviae* sp. nov., an invasive pathogen causing bleeding stem lesions on forest trees and foliar necrosis of ornamentals in the UK. *Mycological Research*, 109: 853-859
2. **Brasier C.M., Denman S., Brown A.V., Webber J.F. (2004)** Sudden oak death (*Phytophthora ramorum*) discovered on trees in Europe. *Mycological Research*, 108, 10: 1108-1110
3. **Davidson R.W., Lorenz R.C. (1938)** Species of *Eutypella* and *Schizoxylon* associated with cankers of maple. *Phytopathology*, 28: 733-745
4. **EPPO (1986)** *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Bühner) Nickle et al. Data sheets on quarantine pests. *EPPO Bulletin*, 16: 55-60
5. **EPPO (1999)** *Anoplophora glabripennis*. Data sheets on quarantine pests. *EPPO Bulletin*, 29: 497-501
6. **EPPO (2005)** *Gibberella circinata*. Data sheets on quarantine pests. *EPPO Bulletin*, 35: 383-386
7. **Jurc D. (2002)**. An overview of the history of the chestnut blight epidemic in Slovenia. *Zbornik gozdarstva lesarstva*, 68: 33-59
8. **Jurc D., Ogris N., Slipers B., Stenlid J. (2006)**. First report of *Eutypella* canker of *Acer pseudoplatanus* in Europe. *Plant Pathology*, 55: 577
9. **Jurc M., Urek G., Širca S., Mikulič V., Glavan B. (2003)**. Borova ogorčica, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Bühner, 1934) Nickle, 1970 - nova nevarnost za slovenske gozdove? *Zbornik gozdarstva lesarstva*, 72: 121-156
10. **Ogris N., Hauptman T., Jurc D. (2009)**. *Chalara fraxinea* causing common ash dieback newly reported in Slovenia. *Plant Pathology*, 58: 1173
11. **Piškur B., Ogris N., Jurc D. (2007)**. Species-specific primers for *Eutypella parasitica*, the causal agent of *Eutypella* canker of maple. *Plant disease*, 91: 1579-1584
12. **Rodrigues J.M. (2008)** National eradication programme for the pinewood nematode. V: *Pine wilt disease: a worldwide threat to forest ecosystems*. Mota M.M. in Vieira P. (Ur.). Springer: 5-14
13. **Seljak G. (2007)** Kostanjeva šiškarica: *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu. *Gozdarski vestnik*, 65: 234-237
14. **Žerjav M., Munda A. (2005)** Nadzor fitoftorne sušice vejic (*Phytophthora ramorum* Werres, De Cock & Man in 't Veld) v Sloveniji v letih 2003 in 2004. V: *Zbornik predavanj in referatov 7. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, Zreče, 8.-10. marec 2005*. Maček J. (Ur.), Društvo za varstvo rastlin, Ljubljana: 377-381

DINAMIKA OGLJIKA V GOZDNIH EKOSISTEMIH: ŠTUDIJA PRIMERA ZA BUKOV GOZD V JV SLOVENIJI

Carbon dynamics in forest ecosystems: a case study of beech forest in SE Slovenia

Povzetek: Gozdovi imajo pomembno vlogo pri globalnem kroženju ogljika. Globalne podnebne spremembe vplivajo na delovanje in potek procesov v gozdnih ekosistemih, njihovi učinki pa se odražajo tako ekonomsko (proizvodne funkcije gozdov) kot tudi politično (kjotski protokol). Za to so potrebne meritve posameznih komponent tokov ogljika v različnih gozdnih ekosistemih, ki so vezane na letni prirast in razkroj ter dolgotrajno shranjevanje ogljika v lesu, koreninah, ostali rastlinski biomasi in drugih organizmih in organskih snoveh. Hkrati poteka razvoj modelov, ki združujejo znanje o fizičnem in funkcionalnem delovanju gozdnih ekosistemov in omogočajo napovedovanje učinkov globalnih podnebnih sprememb na gozdne ekosisteme. V prispevku so predstavljene dejavnosti Gozdarskega inštituta Slovenije na področju študija in modeliranja dinamike ogljika v gozdnih ekosistemih. V prispevku so predstavljeni rezultati rabe izbranega mehanicističnega determinističnega modela rasti gozda (GOTILWA+), s katerim smo modelirali posamezne komponente ogljika v izbranem sestoju bukve.

Ključne besede: celokupna primarna produkcija (GPP), GOTILWA+, modeliranje, nadzemna biomasa, neto izmenjava v ekosistemu (NEE), neto primarna produkcija (NPP), organska snov v tleh (SOM), talna biomasa

Abstract: Forests play an important role in global carbon cycling. As much as the consequences of global climate changes affect the processes in forest ecosystems they are economically (production) and politically (Kyoto protocol) important. Therefore in-situ measurements of different carbon pools and allocation processes are needed in different forest ecosystems, related to annual growth and decomposition, long-term carbon pools in wood, roots, plant biomass and other organic matter. At the same time different models are developed in order to integrate the knowledge about physical and functional processes in forest ecosystems. These models are also used to predict the effects of global climate change on forest ecosystems. In this paper we present the activities at the Slovenian forestry institute, related to carbon dynamics measurements and modelling in forest ecosystems. Original results from a case study in a beech stand are presented, where a mechanistic deterministic model of forest growth GOTILWA+ was applied in order to estimate carbon pools in the selected forest stand.

Keywords: Gross primary production (GPP), GOTILWA+, Modelling, Above-ground biomass, Net ecosystem exchange (NEE), Net primary production (NPP), Soil organic matter (SOM), Soil biomass

UVOD

Gozdni ekosistemi imajo pomembno vlogo pri uravnavanju ponorov in kroženja ogljika v kopenskih ekosistemih (D'Arrigo in sod., 1987; Kauppi in sod., 1992; Becker in sod., 1994; Cannell in sod., 1998; Myneni in sod., 2001). Kopenski ekosistemi, predvsem gozdovi, so eden največjih zbiralnikov

in dolgotrajnih hranilnikov ogljika, ki se shranjuje v vegetaciji in gozdnih tleh (Myneni in sod., 1997; Fan in sod., 1998; Houghton in sod., 1998; Houghton in sod., 1999; Barber in sod., 2000; Kutsch in sod., 2005). V luči podnebnih sprememb, z njimi povezanim segrevanjem ozračja ter povišanimi koncentracijami CO₂ pričakujemo povečanje gozdne biomase, opada in kapacitete shranjevanja ogljika izbranega gozda (Nadelhoffer in sod., 1999; Richter in sod., 1999; Giardina in Ryan, 2000; Schlesinger in sod.,

* Gozdarski inštitut Slovenije, Večna pot 2, SI-1000 Ljubljana, Slovenija
e-pošta: ursa.vilhar@gozdis.si

2000), v veliki meri tudi na račun talne biomase (Bowden in sod., 1993). Manj je znanega o možnostih delovanja klimatskih sprememb na aktivacijo stabilnih (anorgansko) vezanih oblik ogljika in s tem možnostjo učinka predvidenih sprememb (Van Veen in sod., 1991) na povečano mikrobiološko aktivnost, krajšo življenjsko dobo korenin in njihovih simbiotov, povečano dihanje tal, hitrost razkroja organske snovi, posledice ekstremnih vremenskih dogodkov in ujum ... ali pa napovedane povečane sečnje v gozdovih (primer Slovenija: ReNGP 2007). Napovedovanje učinkov globalnih podnebnih sprememb na gozdne ekosisteme je bistvenega pomena, saj bodo posledice tako ekonomske (proizvodne funkcije gozdov) kot tudi politične (kjotski protokol). Za to kot prvo potrebne meritve posameznih komponent tokov ogljika v različnih razmerah kot drugo pa razvoj modelov, ki združujejo znanje o delovanju gozdnih ekosistemov (Simončič in sod., 2007).

V Sloveniji potekajo sistematične raziskave predvsem o bukovih gozdovih, saj le-ti obsegajo več kot 87 % vse gozdne površine in predstavljajo 31,7 % lesne zaloge vseh gozdov v Sloveniji. V Sloveniji so na ravni ekosistema in biotske raznovrstnosti posameznih skupin med boljše raziskanimi prav gozdni ekosistemi (Kraigher in sod., 2002; Kutnar in Urbančič, 2006). Na izbranih ploskvah smo tako v zadnjem desetletju podrobneje analizirali pestrosti višjih rastlin (Kutnar in sod., 2002), mahov (Ódor in sod., 2006), gliv (Piltaver in sod., 2002) in bakterij razkrojevalk (Grebenc in sod., 2009a) ter ektomikoriznih gliv na bukvi (Grebenc in sod., 2007). Biotska raznovrstnost sicer ni neposredno vključena v modeliranja dinamike ogljika, predstavlja pa pomembno informacijo o splošnem stanju gozda. S stališča modeliranja so pomembnejši klimatski in hidrološki podatki ter meritve zalog in procesov prehajanja ogljika med posameznimi zbiralniki, ki jih izvajamo neposredno v analiziranem gozdnem ekosistemu (Vilhar 2009, 2010 v tisku) in so neposredno uporabni za modeliranje kot vhodni podatki ali za preverjanje rezultatov modelov.

Številne parametre nadzemne biomase spremljamo s standardiziranimi postopki za pridobivanje podatkov v gozdarstvu (Kušar in sod., 2009, Kovač, 2009) ali usmerjeno (raziskovalno) za spremljanje vplivov okolja ali gospodarjenja na drevesno vrsto z možnostjo nadaljnjih modeliranja (Simončič in sod., 2009). Vzporedno z inventurami nadzemne biomase (ogljik v nadzemni biomasi in mrtvem lesu), potekajo inventure gozdnih tal, s pomočjo katerih pridobivamo podatke za oceno zalog organske snovi oz. ogljika v izbranih sestojih na bukovih rastiščih (Kobal in sod. 2008, Urbančič in sod. 2007, 2009a,b). Podatki inventur in ekspertnih ocen (npr. raba lesa) so osnova izračunom po metodi IPCC (2003) za nacionalna poročila o ponorih in emisijah CO₂ za sektor gozdarstvo (spremembe zalog

ogljika v času za gozd) za poročanje za LULUCF UNFCCC in KP (Mihelič in sod., 2009).

Pomemben podatek o stanju nadzemnih delov drevja je fiziološko stanje, npr. fotosintetska aktivnost glede na razmere v okolju (Čater in Batič, 2006, Čater in sod., 2008, Čater in Simončič, 2008, Potočič in sod., 2009, Čater in Simončič, 2010). Spremljanje rasti drevja in odzivnost drevja na številne okoljske dejavnike (klima, rastišča, gospodarjenje, vremenske razmere, osvetljenost, vodne razmere ...) potekajo tudi s pomočjo uporabe dendrokronoloških, dendrometrijskih in lesno-anatomskih metod v okviru raziskovalnih projektov in monitoringa gozdov (Levanič, 2006, Levanič in Slapnik, 2006, Hafner in Levanič, 2008, Levanič in sod., 2009, Hafner in Levanič, 2009). Na pretok in dinamiko ogljika v rastlini vpliva neto fotosinteza, poraba asimilatov za metabolne procese, npr. reakcijske mehanizme rastline ob stresu, poraba asimilatov za izgradnjo različnih rastlinskih tkiv in organskih sistemov, npr. poraba za rast in razvoj asimilacijskega aparata, cvetov in plodov, stebela, korenin, koreninskih simbiotov in različnih patogenov, ki preusmerjajo asimilate v svojo korist, ter dihanje vseh posameznih komponent v rastlini in sistemu rastlina - tla - rizosfera (Finér in sod., 2007, Matyssek in sod., 2007).

Za razliko od nadzemnih delov in procesov so gozdna tla kompleksnejši sistem, zato mnogi procesi v tleh še niso zadostno raziskani in posledično v modeliranju celotnega gozda bodisi spregledani ali posplošeni. Za uspešno kvantifikacijo dinamike ogljika v gozdnih tleh potrebujemo najmanj osnovne informacije o tipu tal, sestavi in hitrosti razkroja posameznih komponent opada, dinamiki rasti (življenjski dobi) korenin in biotski raznovrstnosti razkrojevalcev in simbiotov. Na Gozdarskem inštitutu Slovenije smo posegli na vsa omenjena področja, začenši s pripravo ocen količine ogljika v mineralnem delu tal ter opadu glede na rastišča in rabo tal (t.i. ocena zalog ogljika; Urbančič in sod., 2005 in 2009a), in situ spremljanja dinamike rasti in odmiranja korenin z minirizotroni in vrstnimi mrežicami (Železnik in sod., 2009) ter na osnovi morfoloških in molekularnih znakov identificirali večje število mikoriznih gliv na bukvi (Grebenc in sod., 2009b). Na osnovi številčnosti posameznega tipa ektomikorize v različnih gozdnih ekosistemih smo prvič izračunali prispevek posamezne vrste glive k skladiščenju ogljika v ektomikorizi in v zgornjih plasteh tal (Grebenc in Kraigher, 2009c). Podatki so pripravljene za vključevanje v talne module modelov dinamike ogljika v gozdnih tleh oziroma so bili poskusno že analizirani (Grebenc in sod., 2005), v teku pa so raziskave življenjske dobe in delovanja mikoriznega micelija pod vplivi različnih dejavnikov v okolju.

Del raziskav dinamike ogljika v gozdnih ekosistemih so raziskave stabilnih izotopov ogljika in dušika. Pri spre-

mljanju dinamike ogljika na ravni ekosistemov se stabilne izotope ogljika uporablja za določitev posameznih prispevkov emisij CO₂; npr. preučevanje vpliva karbonatnih ravnotežij in vpliva emisij CO₂ iz podzemnih jam na krasu. Drugi del raziskav vključuje uporabo in meritve izotopske sestave ogljika v drevesnih branikah v povezavi z ugotavljanjem vpliva klime na rast drevja. V tretjem delu raziskav pa raziskujemo vpliv temperature na izotopsko sestavo koreninskega sistema v gozdnih tleh. Poleg eksperimentalnih raziskav potekajo meritve stabilnih izotopov na trajni raziskovalni ploskvi intenzivnega monitoringa gozdov (Forest Focus, FutMon) Brdo pri Kranju. Poleg izotopske sestave ogljika se spremlja izotopska sestava kisika v talni raztopini v povezavi s kroženjem vode v gozdnemu sestoji rdečega bora.

Oceno izmenjave ogljika med zaraščajočimi se terestričnimi ekosistemi in atmosfero lahko ocenimo s pomočjo mikrometeoroloških meritev, npr. z metodo Eddy kovariance. Od poletja 2008 potekajo v okviru raziskav zaraščanja kraških travnišč in sprememb njihove ponorne aktivnosti za ogljik meritve parametrov za oceno neto izmenjave v ekosistemu (NEE) s tehniko Eddy covariance na zaraščajoči površini – opuščnem pašniku na Podgorskem krasu (meritve fotosinteze, vnosa opada, hitrosti dekompozicije, dihanja tal, neto-svetlobnega obsevanja, globalnega obsevanja, meteoroloških parametrov, vlage in temperature tal, toplotnega toka v tleh ...). Vzporedno z meritvami na zaraščajoči se površini potekajo meritve na pašniku, pri delu pa sodelujejo raziskovalci štirih institucij. Poleg ocene NEE se ocenjuje tudi posamezne faze kroženja ogljika, kot so respiracija tal, dinamika vnosa in razkroja opada idr.

MODELIRANJE V GOZDOVIH Z BUKVIJO – PREGLED

Bukovi gozdovi JV Slovenije so že vključeni v velikoprostorski model vplivov predvidenih klimatskih sprememb na pričakovano prostorsko prerasporeditev tipov gozdne vegetacije. Rezultati modelov predvsem po pesimističnih scenarijih za gozdove z bukviijo niso spodbudni (Kutnar in sod., 2009). Modelni pristop smo upoštevali tudi pri pridobivanju ključnih informacij in zbiralnikov ogljika za potrebe gozdarske politike v Sloveniji, pri čemer so ocenjeni zbiralniki (prilagojeno po IPCC 2003) pokazali zanimive rezultate, na primer velik delež odmrle organske biomase v slovenskih gozdvih (Golob, 2007). Isti modeli na ravni države so pokazali tudi relativno majhen delež ogljika iz gozdnih ekosistemov, shranjenega v lesnih proizvodih (2%). Kljub majhnemu deležu predstavljajo lesni proizvodi pomembno neposredno ali posredno zamenjavo za uporabo fosilnih goriv (Golob, 2007). V okviru študije dinamike ogljika v bukovih sestojih so bili testirani nekateri modeli GOTILWA+ (Vilhar in sod., 2008) in CASTANEA

(Davi in sod., 2008) za raziskovalne objekte na Rogu. Objavljeni so bili tudi rezultati modeliranja dinamike ogljika v semenskih sestojih bukve na osnovi kvantitete in kvalitete lesa pri različnih ukrepih nege (Deckmyn in sod., 2009), pri spremljanju odzivov posameznih vrst gliv na spremembe v okolju (Grebenc in sod., 2009b) in v okviru raziskave vpliva vrzeli na kroženje vode v gospodarjenih gozdvih in pragozdnih rezervatih bukve in jelke (Vilhar, 2005, 2006).

V predstavitvi študijskega primera je prikazana metodologija in rezultati številnih prej omenjenih raziskav, ki že potekajo na izbranih raziskovalnih ploskvah in jih je moč uporabiti za natančnejše analize dinamike ogljika v izbranem sestoji bukve z modelom GOTILWA+. GOTILWA+ je mehanicistični deterministični model rasti gozda z možnostmi aplikacije na širokem naboru gozdnih ekosistemov. Model združuje več podmodelov (fotosinteza, alokacija ogljika, rastni modul, dihanje tal in hidrologijo), ki omogočajo simulacijo ravnih procesov in vpliv strukture sestaja, tehnike gospodarjenja v sestoji, talnih lastnosti in podnebnih dejavnikov nanje. Model je namenjen aplikaciji v enomernih sestojih, kjer prevladuje le ena drevesna vrsta (Gracia in sod., 2004).

METODE

Za simulacijo z modelom GOTILWA+ smo uporabili podatke, pridobljene na raziskovalnem objektu Snežna jama (Dinaridi, Kočevje). Dnevne meteorološke podatke na ploskvi smo zbrali za obdobje 2004–2006 (Vilhar in sod., 2006), manjkajoče pa privzeli z meteorološke postaje Kočevje in Iskrba (vir: arhivi ARSO). Zaloge ogljika v sestoji smo ocenili na podlagi polne premerbe dreves na raziskovalni ploskvi, lokalnih deblovnic (Kotar, 2003) in količnikov za gostoto lesa (Lipoglavšek, 1980) oziroma za podzemni del sledili vrednostim, ki jih navajata Offenthaler in Hochbichler (2006). Merjene vrednosti fotosintetske aktivnosti smo povzeli po Čater in Simončič (2010), meritve respiracije tal po Čater in Ogrinc (2008), podatke o hitrosti razkroja komponent opada po Grebenc in sod. (2007) in širine branik po Levanič (2007). Kemijske analize in vodno-zračne lastnosti tal smo povzeli po Vilhar (2009). Naštete podatke smo vnesli v podatkovno bazo modela GOTILWA+ in izvedli simulacijo dinamike ogljika za izbrani sestoj v letih 1997–2006. Ujemanje merjenih in simuliranih vrednosti za vsebnost vlage v tleh, temperaturo tal, respiracijo tal in širino branik smo ovrednotili s »Pearsonovim koeficientom korelacije r« in »Indeksom ujemanja D« (Aitken, 1973).

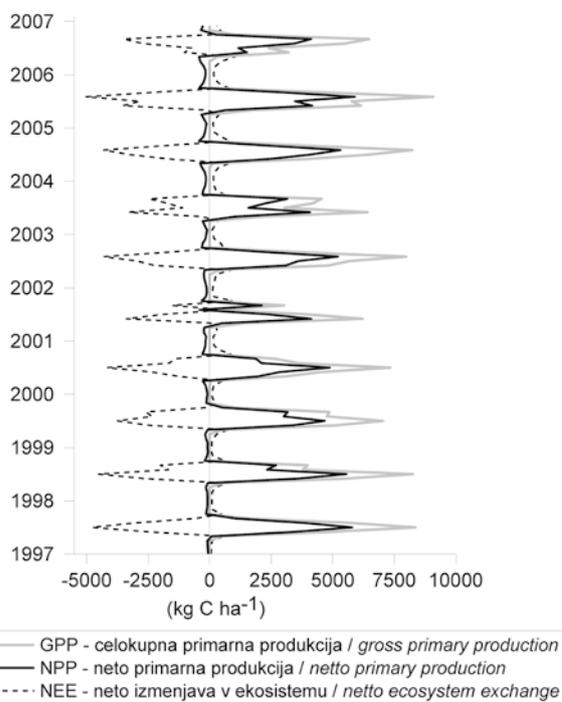
REZULTATI

Vse zbrane in izmerjene podatke za izbrano raziskovalno ploskev smo v podatkovni bazi modela GOTILWA+ razvrstili v 8 sklopov, ki opisujejo ekofiziološke procese v

gozdnem sestoju (fotosinteza, prevodnost listnih rež, lastnosti drevesnih krošenj, lokacija in reliefne značilnosti raziskovalne ploskve, horizontalna in vertikalna zgradba gozda, gostota dreves, ogljik v tleh, vodno-zračne in toplotne lastnosti tal, gospodarjenje z gozdom) in konstante, skupaj 91 parametrov (za podrobnosti glej Vilhar, 2008).

Simulirane vrednosti za vsebnost vlage v tleh so se dobro ujemale z merjenimi, saj je Pearsonov koeficient korelacije r znašal 0,76; indeks ujemanja D pa 0,65. Ujemanje simuliranih in merjenih vrednosti za temperaturo tal je bilo še boljše, saj je bil r 0,93; D pa 0,75. Simulirana respiracija tal se je nekoliko slabše ujemala z merjenimi vrednostmi ($r = 0,37$; $D = 0,50$), prav tako širine branik ($r = 0,14$; $D = 0,44$).

Z modelom smo pridobili simulacije spreminjanja nadzemne biomase, talne biomase, organske snovi v tleh (SOM), celokupne primarne produkcije (GPP), neto primarne produkcije (NPP) in neto izmenjave v ekosistemu (NEE). Za obdobje modeliranja (1997–2006) se je nadzemna biomasa povečala za 68 %, količina SOM je rahlo upadla (4 %), rastlinska biomasa v tleh pa je v vseh letih predstavljala okoli 16 % celokupne nadzemne biomase. Povprečna vrednost za GPP modeliranega sestoja je $21445 \text{ kg C ha}^{-1}$



Slika 1: Celokupna primarna produkcija (GPP), neto primarna produkcija (NPP) in neto izmenjava v ekosistemu (NEE) (kg C ha^{-1}), simulirana z modelom GOTILWA+ v letih 1997–2006 za raziskovalno ploskev Snežna jama

leto⁻¹, za neto primarno produkcijo pa $11954 \text{ kg C ha}^{-1} \text{ leto}^{-1}$. Modelirane vrednosti NEE sledijo letnim gibanjem z negativnimi vrednostmi v vegetacijskem obdobju in pozitivnimi vrednostmi v mesecih mirovanja (zima), v letnem povprečju za modelirana leta $-7896 \text{ kg C ha}^{-1} \text{ leto}^{-1}$.

DISKUSIJA

Mehanicistični deterministični model rasti gozda GOTILWA+ se je v gozdnih sestojih, kjer je prevladujoča drevesna vrsta bukev, izkazal s statistično podprtimi rezultati primerjav preverjeno orodje za modeliranje zbiralnikov ogljika in procesov prehajanja ogljika med posameznimi zbiralniki v gozdni vegetaciji in gozdnih tleh. V postopku preverjanja rezultatov modela smo za vse izbrane neodvisne fiziološke meritve v gozdnem sestoju ugotovili zadovoljivo ujemanje modeliranih podatkov in dejanskih meritev s terena. Simulirane zaloge ogljika so v izbranem bukovem sestoju nekoliko večje kot vrednosti, ocenjene za sestoj bukve v Španiji (Merino in sod., 2007) in Nemčiji (Joonsten in sod., 2004). Rezultati odstopajo od poročanih tako za GPP kot za NEE. Modelirane vrednosti za bukov sestoj v Snežni jami so večje tudi glede na podatke za bukove gozdove iz mreže EUROFULX (Granier in sod., 2003). Odstopajoče modelirane vrednosti pa ne izpodbijajo rezultatov in ustreznega delovanja modela GOTILWA+, saj smo za isti sestoj ugotovili večje vrednosti GPP od primerljivih bukovih sestojev tudi z uporabo modela CASTANEA (Davi in sod., 2008). Ta odstopanja lahko razložimo s starostjo gozda in velikim številom debelega drevja, kar značilno poveča obseg zbiralnikov ogljika v tvrstnih gozdnih ekosistemih (Merino in sod., 2007).

ZAHVALE

Analiza objavljenih rezultatov, modeliranja in priprava prispevka je bila financirana v okviru raziskovalnega programa P4-0107, projektov L1-6706, L4-6232, L4-4450, L4-7163, Z4-7578, J4-1009, J7-7397, CRP V1-0296, CRP V4-0492, Z4-9641-0404-06, V4-0350-06, BI-FR/07-08-INRA-002, V4-0539, L4-9653, L7-2393, L4-2265, programa MR (UV, TG) in mednarodnih projektov NATMAN (SOP EU), CASIROZ (SOP EU) in »CARBON-PRO« (Interreg III B CADSES, EU Neighbourhood programe).

Za tehnično podporo pri delu in pisanju se zahvaljujemo Andreju Verliču.

LITERATURA

1. Aitken P. A. (1973) Assessing systematic errors in rainfall-runoff model. *Journal of Hydrology*, 20: 121–136
2. Barber V.A., Juday G.P., Finney B.P. (2000) Reduced growth of Alaskan white spruce in the twentieth century from temperature-induced drought stress. *Nature*, 405: 668–673
3. Becker M., Nieminen T.M., Gériemia F. (1994) Short-term variations and long term changes in oak productivity in northeastern Fran-

- ce. The role of climate and atmospheric CO₂. *Annals of Forest Science*, 51: 477–492
4. **Bowden R.D., Nadelhoffer K.J., Boone R.D., Melillo J.M., Garrison J.B. (1993)** Contributions of aboveground litter, below ground litter, and root respiration to total soil respiration in a temperate mixed hardwood forest. *Canadian Journal of Forest Research*, 23: 1402–1407
 5. **Cannell M.G.R., Thornley J.H.M., Mobbs D.C., Friend A.D. (1998)** UK conifer forests may be growing faster in response to increased N deposition, atmospheric CO₂ and temperature. *Forestry*, 71: 277–296
 6. **Čater M., Batič F. (2006)** Groundwater and light conditions as factors in the survival of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) seedlings. *European journal of forest research*, 125, 4: 419–426
 7. **Čater M., Bobinac M., Levanič T., Simončič P. (2008)** Water status, nutrients and radial increment of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) in northern Serbia and comparison with selected sites in Slovenia. *Vodne razmere, hranila in debelinski prirastek doba (Quercus robur L.) v severni Srbiji ter primerjava z izbranimi rastišči v Sloveniji*. Zb. gozd. lesar., 87: 135–144
 8. **Čater M., Simončič P. (2009)** Photosynthetic response of young beech (*Fagus sylvatica* L.) on research plots in different light conditions. *Fotosintetski odziv mladih stabala bukve (Fagus sylvatica L.) na odabranim plohama u različitim svetlosnim uvjetima*. *Šumar. list*, 83, 11/12: 569–576
 9. **Čater M., Simončič P. (2010)** Root distribution of under-planted European beech (*Fagus sylvatica* L.) below the canopy of a mature Norway spruce stand as a function of light. *European journal of forest research: v tisku*. <http://dx.doi.org/10.1007/s10342-009-0352-9> (Published online: 8.1.2010)
 10. **Čater M., Ogrinc N. (2008)** Soil respiration in natural beech forest (*Fagus sylvatica* L.) and different light conditions (canopy vs. gap conditions) / Dihanje tal v naravnem bukovem gozdu (*Fagus sylvatica* L.) in različnih svetlobnih razmerah (primerjava zastora in vrzeli). *Carbon dynamics in natural beech forest*. Simončič P. *Gozdarski inštitut Slovenije*, Ljubljana (v tisku)
 11. **D'Arrigo R.D., Jacoby G.C., Fung I.Y. (1987)** Boreal forests and atmosphere-biosphere exchange of carbon dioxide. *Nature*, 329: 321–323
 12. **Davi H., Vilhar U., Čater M., Grebenc T., Kraigher H., Levanič T., Simončič P. (2008)** Comparison of carbon budget between virgin and managed Slovenian beech stands. *Carbon dynamics in natural beech forest*. P. Simončič. *Studia forestalia Slovenica*, *Gozdarski inštitut Slovenije*, Ljubljana (v tisku).
 13. **Deckmyn G. I., Mali B., Kraigher H., Torelli N., Op ed Beeck M., Ceulemans R.J.M. (2009)** Using the process-based stand model ANAFORE including bayesian optimisation to predict wood quality and quantity and their uncertainty in Slovenian Beech. *Silva Fenn.*, 43, 3: 523–533
 14. **Fan S., Gloor M., Mahlman J., Pacala S., Sarmiento J., Takahashi T., Tans P. (1998)** A large terrestrial carbon sink in North America implied by atmospheric and oceanic carbon dioxide data and models. *Science*, 282: 442–446
 15. **Finér L., Helmisääri H. S., Löhmus K., Majdi H., Brunner I., Børja I., Eldhuset T., Godbold D., Grebenc T., Konôpka B., Kraigher H., Möttönen M. R., Ohashi M., Oleksyn J., Ostonen I., Uri V., Vanguelova E. (2007)** Variation in fine root biomass of three European tree species: Beech (*Fagus sylvatica* L.), Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.), and Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Plant Biosystems*, 141, 3: 394–405
 16. **Giardina C.P., Ryan M.G. (2000)** Evidence that decomposition rates of organic carbon in mineral soil do not vary with temperature. *Nature*, 404: 858–861
 17. **Golob S. (2007)** Some scenarios of the impact of forest policy on the carbon cycle on the example of Slovenia. *Gozd. Vest.*, 65, no. 5-6: 254–261
 18. **Gracia C., Sabaté S., Sanchez A. (2004)** GOTILWA+. An integrated model of forest growth. Model documentation and User's guide. <http://www.creaf.uab.es/gotilwa+/download.htm>. s.
 19. **Grainer A., Aubinet M., Epron D., Falge E., Gudmundsson J., Jensen N.O., Koestner B., Matteucci G., Pilegaard K., Schmidt M.G., Tenhunen J. (2003)** Deciduous Forests: Carbon and Water Fluxes, Balances and Ecophysiological Determinants. *Fluxes of Carbon, water and Energy of European Forests*. R. Valentini, Springer - Verlag, Berlin, Heidelberg, 270
 20. **Grebenc T., Deckmyn G.I., Janssens I., Kraigher H. (2005)** Implementation of mycorrhizae into the existing soil module of Mefyque mechanistic model. V: *Rhizosphere management in soils contaminated with organic and inorganic pollutants : COST action 631, Understanding and Modelling Plant-Soil Interactions in the Rhizosphere Environment (UMPIRE)* : Kraków-Tomaszowice, Poland, 12–14 May, 2005. [Kraków: European Union, Ministry of Scientific Research and Information Technology: Institute of botany of the Jagiellonian University], s. 31
 21. **Grebenc T., Štupar B., Kraigher H. (2007)** Pomen korenin in mikorize za ponor ogljika. The role of roots and mycorrhizae in carbon sequestration. V: *Podnebne spremembe : vpliv na gozd in gozdarstvo: impact on forest and forestry*, (*Studia forestalia Slovenica*, 130. Jurc M. (ur.). *Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire*, Ljubljana: 399–413
 22. **Grebenc T., Bajc M., Kraigher H. (2009a)** Razkroj lesa in biotska raznovrstnost gliv in bakterij v opadu naravnih sestojev z bukvijo = Wood decomposition and the biodiversity of seed decomposing fungi and bacteria in natural beech stands. V: *Trajnostna raba lesa v kontekstu sonaravnega gospodarjenja z gozdovi*. (*Studia forestalia Slovenica*, 135). Humar M. (ur.), Kraigher H. (ur.). *Gozdarski inštitut Slovenije*, *Silva Slovenica*, Ljubljana, 47–54
 23. **Grebenc T., Christensen M., Vilhar U., Čater M., Martin P.M., Simončič P., Kraigher H. (2009b)** Response of ectomycorrhizal community structure to gap opening in natural and managed temperate beech-dominated forests. *Can. j. for. res.*, 39, no. 7: 1375–1386
 24. **Grebenc T., Kraigher H. (2009c)** Interakcije v mikorizosferi določajo dinamiko ogljika v ekosistemu bukovih gozdov. *Zb. gozd. lesar.*, 88: 11–19
 25. **Hafner P., Levanič T. (2008)** Vpliv klime na maksimalno gostoto karsnega lesa v branih smreke (*Picea abies* (L.) Karst.) na dveh rastiščih v Sloveniji. The influence of climate on tree-ring maximum latewood density in Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) at two sites in Slovenia. *Zb. gozd. lesar.*, 85: 3–10
 26. **Hafner P., Levanič T. (2009)** Stable carbon isotopes in Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) tree rings at two sites in Slovenia. *Stabilna ogljikova izotopa v branih smreke (Picea abies (L.) Karst.) na dveh rastiščih v Sloveniji*. *Zb. gozd. lesar.*, 88: 43–52
 27. **Houghton R.A., Davidson E.A., Woodwell G.M. (1998)** Missing sinks, feedbacks, and understanding the role of terrestrial ecosystems in the global carbon balance. *Global Biogeochem. Cycles*, 12, 1: 25–34
 28. **Houghton R.A., Hackler J.L., Lawrence K.T. (1999)** The U.S. carbon budget: Contributions from land-use change. *Science*, 285: 574–578
 29. **IPCC (2003)** Good Practice Guidance for Land Use, Land-Use Change and Forestry. IPCC National Greenhouse Gas Inventories Programme Technical Support Unit, IGES, Japan, <http://www.ipcc-nggip.iges.or.jp>.
 30. **Joosten R., Schumacher J., Wirth C., Schulte A. (2004)** Evaluating tree carbon predictions for beech (*Fagus sylvatica* L.) in western Germany. *Forest Ecology and Management*, 189, 1: 87–96
 31. **Kauppi P.E., Mileikakainen K., Kuusela K. (1992)** Biomass and carbon budget of European forests, 1971 to 1990. *Science*, 256, 5053: 70–74
 32. **Kobal M., Eeler K., Urbančič M., Zupan M., Mihelič R., Simončič P. (2008)** Organic carbon content of forest and agricultural soils in Slovenia. V: *Eurosoil 2008 : University of Natural Resources and Applied Life Sciences (BOKU), Vienna, Austria, August 2008-08-04 : book of abstracts*. Blum, W. E. H. (ur.), Gerzabek, M. H. (ur.), Vodrazka, M. (ur.). *University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna*, 13 s.
 33. **Kotar M. (2003)** *Gozdarski priročnik*. Oddelek za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, 414
 34. **Kovač M. (2009)** Statistična moč kontrolne vzorčne metode – primer monitoringa gozdov in gozdnih ekosistemov. *Statistical power of the control sampling method – the case of forest and forest ecosystem condition survey*. V: *Kontrolna vzorčna metoda v Sloveniji - zgodovina, značilnosti in uporaba*. *Studia forestalia Slovenica* (134). Planinšek Š. (ur.), Kovač M. *Gozdarski inštitut Slovenije*, Založba *Silva Slovenica*, Ljubljana, 97–103
 35. **Kraigher H., Jurc D., Kalan P., Kutnar L., Levanič T., Rupel M., Smolej I. (2002)** Beech coarse woody debris characteristics in two virgin forest reserves in Southern Slovenia = Značilnosti odmrlih velikih lesnih ostankov bukve v dveh gozdnih rezervatih v južni Sloveniji. *Zb. gozd. lesar.*, 69: 91–134
 36. **Kušar G., Kovač M., Simončič P. (2009)** Metodološke osnove moni-

- toringa gozdov in gozdnih ekosistemov = Methodological bases of the forest and forest ecological condition survey. V: Kontrolna vzorčna metoda v Sloveniji - zgodovina, značilnosti in uporaba. (Studia forestalia Slovenica, 134). Planinšek Š. (ur.), Kovač M. Gozdarski inštitut Slovenije, Založba Silva Slovenica, Ljubljana, 85–96
37. **Kutnar L., Kobler A., Bergant K. (2009)** Vpliv podnebni sprememb na pričakovano prostorsko prerezporeditev tipov gozdne vegetacije = The impacts of climate change on the expected spatial redistribution of forest vegetation types. Zb. gozd. lesar., 89: 33–42
 38. **Kutnar L., Ódor P., van Dort K. (2002)** Vascular plants on beech dead wood in two Slovenian forest reserves = Vaskularne rastline na odmrlem bukovem drevju v dveh gozdnih rezervatih v Sloveniji. Zb. gozd. lesar., 69: 135–153
 39. **Kutnar L., Urbančič M. (2006)** Vpliv rastiščnih in sestojnih razmer na pestrost tal in vegetacije v izbranih bukovi in jelovo-bukovi gozdovih na Kočevskem = Influence of site and stand conditions on diversity of soil and vegetation in selected beech and fir-beech forests in the Kočevje region. Zb. gozd. lesar., 80: 3–30
 40. **Kutsch W.L., Bahn M., Heinemeyer A. (2005)** Soil Carbon Dynamics. An Integrated Methodology. Cambridge University Press, 286
 41. **Levanič T. (2006)** Vpliv klime na debelinsko rast macesna (*Larix decidua* Mill.) na zgornji gozdni meji v JV Alpah. Effect of climate on growth of european larch (*Larix decidua* Mill.) at the upper treeline in the southeastern Alps. Zb. gozd. lesar., 78: 29–55
 42. **Levanič T., Slapnik A. (2006)** Dendroekološka analiza rasti smreke (*Picea abies* (L.) Karst.) v okolici dveh termoelektrarn. Dendroecological study of spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) growth around two coal-fired power plants. Zb. gozd. lesar., 79: 3–18
 43. **Levanič T. (2007)** ATRICS - a new system for image acquisition in dendrochronology. Tree Ring Research, 63, 2: 117–122
 44. **Levanič T., Gričar J., Gagen M., Jalkanen R., Load N.J., Mccarol D., Oven P., Robertson I. (2009)** The climate sensitivity of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst) in the southeastern European Alps. Trees (Berl. West), 23, 1: 169–180
 45. **Lipoglavšek M. (1980)** Gozdni proizvodi. Učbenik za gozdarstvo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za gozdarstvo, Ljubljana, 211
 46. **Matyssek R., Bahnweg G., Ceulemans R., Fabian W., Grill D., Hanke D.E., Kraigher H., Osswald W., Rennenberg H., Sandermann H., Tausz M., Wieser G. (2007)** Synopsis of the CASIROZ case study: Carbon sink strength of *Fagus sylvatica* L. in a changing environment – experimental risk assessment of mitigation by chronic ozone impact. Plant Biol, 9: 163–180
 47. **Merino A., Real C., Álvarez-González J.G., Rodríguez-Guitián M.A. (2007)** Forest structure and C stocks in natural *Fagus sylvatica* forest in southern Europe: The effects of past management. Forest Ecology and Management, 250: 206–214
 48. **Mihelič M., Krajnc N., Piškur M., Simončič P., Kušar G., Kobler A. (2009)** Slovenia's national inventory report 2009 for Sector LULUCF. Slovenian Forest Institute, Ljubljana, 46 http://unfccc.int/national_reports/annex_i_ghg_inventories/national_inventories_submissions/items/4771.php.
 49. **Myneni R.B., Keeling C.D., Tucker C.J., Asrar G., Nemani R.R. (1997)** Increased plant growth in the northern high latitudes from 1981 to 1991. Nature, 386: 698–702
 50. **Myneni R.B., Dong J., Tucker C.J., Kaufmann R.K., Kauppi P.E., Liski J., Zhou L., Alexeyev V., Hughes M.K. (2001)** A large carbon sink in the woody biomass of northern forests. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 26: 14784–14789
 51. **Nadelhoffer K.J., Emmett B.A., Gundersen P., Kjonaas O.J., Koopmans C.J., Schleppi P., Tietema A., Wright R.F. (1999)** Nitrogen deposition makes a minor contribution to carbon sequestration in temperate forests. Nature, 398: 145–148
 52. **Ódor P., Kosec J., Piltaver A., Kraigher H., Grebenc T. (2006)** Diversity of dead wood inhabiting fungi and bryophytes in semi-natural beech forests in Europe. Biol. Conserv., 131, 1: 58–71
 53. **Offenthaler I., Hochbichler E. (2006)** Estimation of root biomass of Austrian forest tree species. Austrian Journal of Forest Science, Centralblatt für das gesamte Forstwesen, 123, 1/2: 65–86
 54. **Piltaver A., Matočec N., Kosec J., Jurc D. (2002)** Macrofungi on beech dead wood in the Slovenian forest reserves Rajhenavski Rog and Krokar = Glive na odmrlem bukovem lesu v slovenskih gozdnih rezervatih Rajhenavski Rog in Krokar. Zb. gozd. lesar., 69: 171–196
 55. **Potočić N., Seletković I., Čater M., Čosić T., Šango M., Vedriš M. (2009)** Ekofiziološki odziv suncu izloženih sadnica običajne bukve (*Fagus sylvatica* L.) pri različitim razinama gnojilbe. Ecophysiological response of sun-exposed common beech (*Fagus sylvatica* L.) seedlings under different fertilization levels. Šumar. list, 133, 5/6: 289–300
 56. **Read D.J. (1998)** Plants on the web. Nature, 396: 22–23
 57. **ReNGP: Resolucija o nacionalnem gozdnem programu, 2007.** Uradni list RS, št. 111/2007 z dne 5. 12. 2007 : 15252–15323; <http://www.uradni-list.si/1/objava.jsp?urlurid=20075510>
 58. **Richter D.D., Markewitz D., Trumbore S.E., Wells C.G. (1999)** Rapid accumulation and turnover of soil carbon in a re-establishing forest. Nature, 400: 56–58
 59. **Schlesinger W.H., Winkler J.P., Meonigal J.P. (2000)** Soils and the global carbon cycle. V: The Carbon Cycle. Wigley T.M.(ur.), Schimel D.S., (ur.). Cambridge Univ. Press, 93–101
 60. **Simončič P., Kušar G., Kovač M. (2009)** Monitoring gozdov in gozdnih ekosistemov kot merilo okoljskih vplivov = Monitoring of forests and forest ecosystems as a measure for the ecological influences. Gozd. vestn., 67, 7/8: 321–332
 61. **Simončič P., Ogrinc N., Vilhar U., Grebenc T., Kraigher H. (2007)** CO₂ sequestration: state of the art. V: Local strategies for land use management according to Kyoto protocol : exploring new management tools for CO₂ sequestration in agricultural lands and forests. Peresotti, A. (ur.). Forum Editrice Universitaria, Udine, 17–23
 62. **Urbančič M., Simončič P., Kutnar L., Prus T. (2005)** Atlas gozdnih tal Slovenije. Ljubljana: Zveza gozdarskih društev Slovenije: Gozdarski vestnik: Gozdarski inštitut Slovenije, Ljubljana, 100
 63. **Urbančič M., Kobal M., Zupan M., Šporar M., Eler K., Simončič P. (2007)** Organska snov v gozdnih tleh. V: Strategija varovanja tal v Sloveniji: zbornik referatov Konferenca ob svetovnem dnevu tal 5. decembra 2007. Knapič M. (ur.). Pedološko društvo Slovenije, Ljubljana, 217–230
 64. **Urbančič M., Kobal M., Vilhar U., Simončič P. 2009a.** Zaloge organske snovi v izbranih sestojih na bukovi rastiščih = Organic carbon matter pools in selected beech sites. V: Trajnostna raba lesa v kontekstu sonaravnega gospodarjenja z gozdovi. (Studia forestalia Slovenica, 135). Humar M. (ur.), Kraigher, H. (ur.). Gozdarski inštitut Slovenije, Ljubljana, Silva Slovenica, 19–29
 65. **Urbančič M., Kutnar L., Kralj T., Kobal M., Simončič P. 2009.** Rastiščne značilnosti trajnih ploskev slovenske 16 x 16-kilometrsko mreže. Gozd. vestn., 67, 1: 17–48
 66. **Van Veen J.A., Liljeroth E., Lekkerkerk L.J.A., van de Geijn S.C. (1991)** Carbon fluxes in plant-soil systems at elevated atmospheric CO₂ levels. Ecological Applications, 1, 2: 175–181
 67. **Vilhar U. (2006)** Vodna bilanca dinarskega jelovo-bukovega gozda na Kočevskem rogu. Biotehniška fakulteta, Odd. za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire, Ljubljana, 246
 68. **Vilhar U., Simončič P., Kajfež-Bogataj L., Katzensteiner K., Diaci J. (2006)** Mikroklimatske razmere v vrzelih in sestojih dinarskega jelovo-bukovega gozda = Microclimate conditions in gaps and mature stands of Dinaric silver fir-beech forests. Zb. gozd. lesar., 81: 21–36
 69. **Vilhar U., Starr M., Urbančič M., Smolej I., Simončič P. (2005)** Gap evapotranspiration and drainage fluxes in a managed and a virgin dinaric silver fir-beech forest in Slovenia : a modelling study. European journal of forest research, 124, 3: 165–175
 70. **Vilhar U., Gracia C., Simončič P. (2008)** C dynamic of a beech stand in SE Slovenia – first results of the GOTILWA+ model. Carbon dynamics in natural beech forests. P. Simončič. Studia Forestalia Slovenica. Gozdarski inštitut Slovenije, Ljubljana (v tisku)
 71. **Vilhar U. (2009)** Vpliv gospodarjenja na vodno bilanco jelovo-bukovi gozdov dinarskega krasa = Influence of management on water balance of the silver fir-beech forests in the Dinaric karst. (Studia forestalia Slovenica, 133). Gozdarski inštitut Slovenije, Ljubljana, Silva Slovenica, 2009. XVI, 122
 72. **Vilhar U. (2010)** Estimation of carbon stocks in a beech stand in SE Slovenia : a modeling study = Procjena zaliha ugljika u bukovej šumi u jugoistočnoj Sloveniji : modelska studija. Šumar. list, 2010 (84) [v tisku]
 73. **Železnik P., Božič G., Sinjur I., Kraigher H. (2009)** Dinamika razvoja drobnih korenin treh provenienc navadne bukve (*Fagus sylvatica* L.) v letih 2007 in 2008 = Dynamics of fine root development of three provenances of common beech (*Fagus sylvatica* L.) in 2007 and 2008. V: Trajnostna raba lesa v kontekstu sonaravnega gospodarjenja z gozdovi. (Studia forestalia Slovenica, 135). Humar M. (ur.), Kraigher H. (ur.), Gozdarski inštitut Slovenije, Ljubljana, Silva Slovenica, 31–40

MERITVE NETO IZMENJAVE OGLJIKA ZA ZARAŠČAJOČE SE TRAVIŠČE NA KRASU V JZ SLOVENIJI

Net ecosystem exchange measurement above abundant
grassland in Karst in SW Slovenia

Povzetek: V submediteranskem delu Slovenije na Podgorskem krasu poteka od leta 2008 preučevanje vpliva spremembe rabe tal na izmenjavo ogljika med ekosistemom in atmosfero. Meritve potekajo na zapuščenem in z lesnimi vrstami zaraščanem travišču z Eddy Covariance metodologijo. V prispevku so predstavljene metodološke osnove in rezultati enoletnih meritev.

Ključne besede: Eddy Covariance, NEE, zaraščanje travišč, Kras, ekosistem, ekosistemske meritve.

Abstract: In the submediterranean part of Slovenia at Podgorski Karst a research plot was established in year 2008 to estimate the impact of land use change on carbon exchange between ecosystems and atmosphere. For measurements above grassland with woody species Eddy Covariance methodology was used. The article presents the methodological basis of measurements and results of first year of measurements.

Keywords: Eddy Covariance, NEE, woody plant encroachment, Karst ecosystem, ecosystem measurements

UVOD

Zaraščanje travišč s lesnatimi rastlinami ima vpliv na vodni režim, biokemične procese in rastlinsko pestrost. V splošnem naj bi ta proces vodil k povečanju zaloga ogljika v zaraščajočih ekosistemih v primerjavi s travišči. Nekatere raziskave (Jackson in sod., 2002) navajajo, da lahko zaraščanje povzroči tudi izgube ogljika iz ekosistema. Redki avtorji (npr. Scott in sod., 2006) poročajo o meritvah izmenjave plinov med ekosistemom in atmosfero (NEE = net ecosystem exchange) za opuščena in zaraščajoča se travišča. Te študije nakazujejo intenzivno vezavo ogljika v zaraščajočih ekosistemih. V sušnih predelih je vezava ogljika odvisna od letne razporeditve padavin (Potts in sod., 2006). V prispevku so predstavljeni rezultati enoletnih meritev NEE in ocena za zaraščajoče travišče v submediteranskem delu Slovenije z Eddy Covariance metodologijo.

* Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Ljubljana, Slovenija,
e-pošta: mitja.ferlan@gozdis.si

** Gozdarski inštitut Slovenije, Ljubljana, Slovenija

MATERIALI IN METODE

Na Podgorskem krasu v JZ Sloveniji so bile avgusta 2008 na raziskovalni ploskvi vzpostavljene mikrometeorološke in meteorološke meritve. Za omenjeno območje je značilno prehodno podnebje med mediteranskim in celinskim; povprečna temperatura je 11°C, količina padavin pa 1300 mm (obdobje 1970–2000, ARSO). Kljub dokaj obilnim padavinam je vegetacija sklerofilna, saj prevladujejo plitva tla (sprsteninaste (Ol-Of-Ah-AC-C) in rjave rendzine (Ol-Of-Ah-BiC-C)), razvite na paleogenskem apnencu. Globina tal se na kratki razdalji spreminja od 0 cm (površinska skalovitost) do dveh metrov in več v žepih med skalami. Maksimalni naklon ploskve je 3°. V zadnjih desetletjih je območje podvrženo intenzivnim spremembam rabe tal. Predhodno intenzivno izkoriščana travišča so se pričela opuščati in preraščati z grmovjem in drevjem. Za raziskovalno ploskev smo izbrali zaraščajoče travišče, ki zadnjih 30 let ni več v kmetijski rabi. Ploskev je pokrita z manjšim drevjem in grmovjem v povprečju okoli 40 % površine.

Preglednica 1: Nadzemna lesna biomasa po drevesnih in grmovnih vrstah, ocenjena po metodologiji TCO-GTOS.

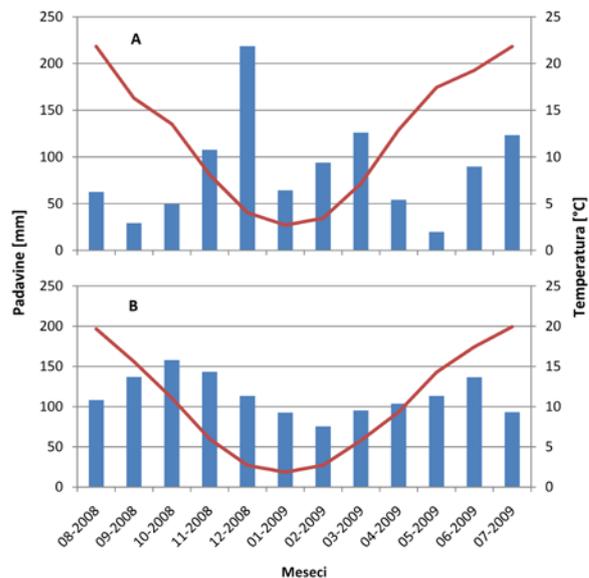
	m ³ /ha
<i>Quercus pubescens</i>	78.8
<i>Fraxinus minor</i>	2.2
<i>Juniperus communis</i>	4.7
<i>Prunus s.p.</i>	4.4
Ostalo	6.2
Skupaj	96.3

Povprečna drevesna višina je okoli 7 metrov. V glavni drevesni plasti prevladuje puhasti hrast (*Quercus pubescens*). Nadzemna lesna biomasa je bila ocenjena na okoli 100 m³ ha⁻¹ po metodologiji TCO-GTOS (Terrestrial Carbon Observations panel of the Global Terrestrial Observing System).

Na izbrani ploskvi je bil leta 2008 postavljen 15 m visok stolp, opremljen za meteorološke meritve in meritve NEE po metodi Eddy Covariance. Poenostavljeno lahko to metodo predstavimo kot meritve številnih vrtincev zraka nad merjenim ekosistemom. Vsaka celica zraka, ki se nahaja v vrtincu, ima svojo koncentracijo ogljikovega dioksida in vodne pare, temperaturo in smer. Parametre posameznega vrtinca uspemo zaznati z dovolj natančno in hitro odzivno (20 Hz) merilno opremo. Tako pridobljene meritve nato obdelamo po metodologiji evropskega projekta Euroflux z vsemi potrebnimi korekcijami in izračunamo vertikalni tok CO₂ na enoto površine izbranega ekosistema. Površina ekosistema, ki jo zajamemo z zgoraj opisanimi meritvami, je odvisna od višine postavitve merilne opreme, ta pa od hrapavosti zgornjega sloja obravnavanega ekosistema, ki je v interakciji z atmosfero. V našem primeru si to površino lahko predstavljamo kot elipso z daljšo osjo obrnjeno proti prevladujoči smeri vetra in površino okoli 1 km². Za to površino lahko ocenimo NEE, ki je rezultat meritev tokov kroženja ogljika, pri čemer predstavlja glavni vnos ogljika v kopenske ekosisteme fotosinteza zelenih rastlin (bruto primarna produkcija), glavni tok ogljika iz ekosistema pa je njegovo dihanje, h kateremu pomembno prispeva dihanje tal.

REZULTATI IN RAZPRAVA

V prvem letu meritev NEE (od 1. 8. 2008 do 1. 8. 2009) je izbrana ploskev vezala malo ogljika (63 g C m⁻²). Na osnovi kratkega enoletnega časovnega obdobja ne moremo sklepati, kako močan ponor oziroma vir je preučevani ekosistem. Vezava ogljika je v suhih ekosistemih precej odvisna od vremenskih razmer (porazdelitve padavin) merjenega obdobja. To se kaže tudi v našem primeru, saj



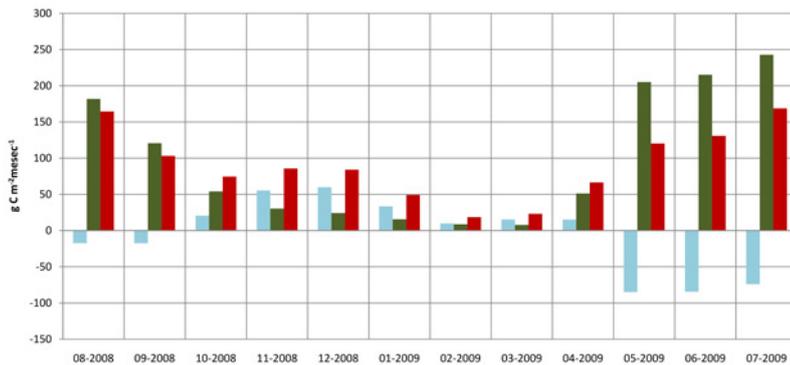
Slika 1: Mesečne količine padavin (mm) in temperatura zraka (°C) za A) izbrano ploskev v obdobju od 1. 8. 2008 do 1. 8. 2009 in B) za dolgoletno povprečje (1970–2000) meteoroloških postaj arhiv ARSO (Postojna, Godnje, Ilirska Bistrica, Koper, Beli križ, Portorož)

padavinski vzorci na ploskvi precej odstopajo od klimatske normale za izbrano področje (ARSO). (Slika 1)

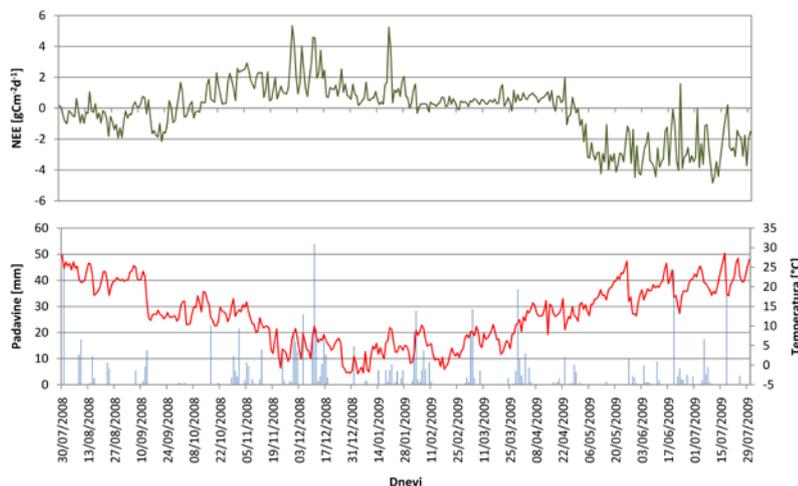
Po metodologijah projekta Euroflux lahko izmerjeni NEE, ki ob določenih predpostavkah Eddy Covariance metodologije predstavlja oceno neto primarne produkcije ekosistema (NEP), razdelimo na bruto primarno produkcijo (GPP), in dihanje celotnega ekosistema (Reco). Ključni dejavnik delitve sta temperatura in globalno sevanje. Ta dva parametra pridobimo iz spremljajočih meteoroloških meritev (Slika 2).

Proučevani ekosistem preide iz neto vira v neto ponor ogljika v maju 2009 (slika 3). Fenološki razvoj zeliščne plasti se začne že mesec prej, a ta prehod je očitno posledica razvoja drevesne fenologije, saj sovпада z brstenjem prevladujoče drevesne vrste. Opazovana ploskev nato ostane ponor ogljika vse do konca opazovanega obdobja, ponorna aktivnost pa je dokaj variabilna, na kar še posebej vplivajo padavinski dogodki.

Po večjih padavinskih dogodkih, še posebno v jesenskem in zimskem času, vrednost NEE močno naraste (slika 3). V poletnem času bi to lahko bila posledica zmanjšane vezave CO₂ zaradi zmanjšane globalnega sevanja, kar vpliva na zmanjšano fotosintetsko aktivnost, v zimskem obdobju pa vira CO₂ ni možno povsem jasno razložiti, saj ni zgolj posledica dihanja ekosistema, ki je pogojeno z višjimi temperaturami, saj so te v jesenskem in zimskem obdobju



Slika 2: Mesečne vrednosti izmenjave ogljika med ekosistemom in atmosfero (NEE), bruto primarne produkcije (GPP) in dihanja celotnega ekosistema (Reco) za izbrano zaraščajočo raziskovalno ploskev (od 1. 8. 2008 do 1. 8. 2009).



Slika 3: Dnevne vrednosti NEE ($\text{gCm}^{-2}\text{d}^{-1}$), padavin (mm) in temperature zraka ($^{\circ}\text{C}$) za izbrano zaraščajočo raziskovalno ploskev (od 1. 8. 2008 do 1. 8. 2009).

razmeroma nizke. Možna razlaga za tovrsten pojav je izpodrivanje CO_2 iz por v tleh ob obilnih padavinah in izhajanje CO_2 zaradi spremembe zračnega tlaka in konvekcije (Inglima in sod., 2009, Serrano-Ortiz in sod., 2009), pri čemer je ta CO_2 lahko tako organogenega (dihanje organizmov) kot tudi geogenega nastanka (obarjanje karbonatov).

SKLEP

Raziskave ponorne aktivnosti ekosistemov morajo temeljiti na daljšem časovnem nizu meritev. Zaradi tega iz enoletnih meritev težko ocenimo ponorno moč opazovanega ekosistema. Preučevana zaraščajoča se površina vsekakor deluje kot ponor ogljika. Spremljajoče meritve na ekstenzivno rabljenih pašnikih za isto odboje nakazujejo izgube ogljika iz ekosistema (Ferlan in sod., 2010, neobjavljeno), razlike med obema sukcesijskima stadijema

pa so v skladu s predhodnimi opažanji (Scott in sod., 2006).

Za podroben vpogled v samo kroženje ogljika v ekosistemu pa metoda Eddy Covariance ne zadošča. Potrebne so še spremljajoče meritve dihanja tal, fotosinteze, hitrosti razgradnje odmrle biomase itn. Nepojasnjeno ostaja povečanje izpustov NEE po večjih padavinskih dogodkih, posebej v jesenskem in zimskem času. V prihodnjih raziskavah, ki bodo potekale vzporedno z meritvami NEE, bomo poskušali nanj odgovoriti. Pestrost in heterogenost terena bo pri tem velika ovira, saj s spremljajočimi točkovnimi meritvami le težko pokrijemo celotno območje, ki ga pokrivajo Eddy Covariance meritve.

LITERATURA

1. Jackson R.B., Banner J.L., Jobbágy E.G. Pockman W.T., Wall D.H. (2002) Ecosystem carbon loss with woody plant invasion of grasslands. *Nature*, 418: 623–626
2. Potts D.L., Huxman T.E., Scott R.L., Williams D.G., Goodrich D.C. (2006) The sensitivity of ecosystem carbon exchange to seasonal precipitation and woody plant encroachment. *Oecologia*, 150: 453–463
3. Scott R.L., Huxman T.E., Williams D.G., Goodrich D.C. (2006) Ecohydrological impacts of woody-plant encroachment: seasonal patterns of water and carbon dioxide exchange within a semiarid riparian environment. *Global Change Biology*, 12: 311–324
4. Inglima I., Alberti G., Bertolini T., Vaccari F. P., Gioli B., Miglietta F., Cotrufo M. F., Peressotti A. (2009) Precipitation pulses enhance respiration of Mediterranean ecosystems: the balance between organic and inorganic components of increased soil CO_2 efflux. *Global Change Biology*, 15: 1289–1301
5. Serrano-Ortiz P., Roland M., Sanchez-Moral S., Janssens I.A., Domingo F., Goddésis I., Kowalski A.S. (2010) Hidden, abiotic CO_2 flows and gaseous reservoirs in the terrestrial carbon cycle: Review and perspectives. *Agricultural and Forest Meteorology* 150: 321–329

VSEBNOST SKUPNIH FENOLOV V BELJAVI, RDEČEM SRCU IN PORANITVENEM LESU PRI BUKVI (*FAGUS SYLVATICA*)

Total phenol content in sapwood, red heart and wound-wood in beech (*Fagus sylvatica*)

Izvleček: S preliminarno preiskavo smo želeli preveriti primernost UV-VIS spektrofotometrične analize po Folin–Ciocâltău metodi za določevanje deleža skupnih fenolnih spojin v različnih delih drevesnega debla bukve (*Fagus sylvatica* L.). Kvantitativno določitev vsebnosti skupnih fenolov v različnih tipih lesnih tkiv smo izrazili v ekvivalentih dveh standardnih spojin, kvercetin in galne kisline. Rezultati spektrofotometrične analize so pokazali, da se delež skupnih fenolov med posameznimi kategorijami lesnih tkiv razlikuje. Visok delež skupnih fenolnih spojin je značilen predvsem za reakcijsko cono in poranitveni les, v beljavi in diskoloriranem lesu pa je skupnih fenolov manj. Uporaba Folin–Ciocâltău reagenta v kombinaciji z UV-VIS spektrofotometrijo predstavlja primerno metodo za določanje vsebnosti skupnih fenolov v različnih tipih lesa.

Ključne besede: Fenoli, UV-VIS spektrofotometrija, Folin–Ciocâltău reagent, kvercetin, galna kislina, bukovina, beljava, diskoloriran les, poranitveni les

Abstract: With the preliminary investigation we wanted to verify the suitability of spectrophotometric analysis by means of Folin–Ciocâltău method for the purpose of determining the total phenolic compounds in different parts of the tree trunk. The contents of total phenol compounds for different types of beech wood tissue were expressed with equivalents of two reference compounds, quercetin and gallic acid. The results of spectrophotometric analysis indicate the variability of total phenol content between different categories of wounded beech wood tissue. Higher amount of the total phenols was observed in the reaction zones and wound-wood, while in the sapwood and discoloured heartwood the content of total phenolic compounds was lower. The use of Folin–Ciocâltău reagent in combination with UV-VIS spectrophotometry represents a suitable method for determination of total phenols in different types of wood.

Key words: Phenols, UV-VIS spectrophotometry, Folin–Ciocâltău reagent, quercetin, gallic acid, beech wood, sapwood, discoloured wood, wound-wood

UVOD

Sekundarni ksilem je biokemijski proizvod dreves, ki ga sestavljajo polimerni gradniki celične stene in ekstraktivi. V splošnem je kemijska sestava lesa izredno variabilna in

odvisna od številnih dejavnikov kot so drevesna vrsta, rastišče, del drevesa ali debla in sekundarnih sprememb v lesnem tkivu (Dinwoodie, 2000; Panshin in Zeeuw, 1980; Tsoumis, 1991). Z izrazom sekundarne spremembe v lesu običajno opisujemo nastanek jedrovine in nastanek diskoloriranega lesa. Kljub različnemu izvoru je za jedrovino in diskoloriran les značilnih nekaj podobnih anatomskih sprememb, kot so okluzije trahej s tilami in/ali gumoznimi snovmi, suberizacija til in parenhimskih celic (Merela in sod., 2005; Oven in sod., 2008; Parameswaran in sod., 1985; Schmitt in Liese, 1993; Torelli in sod., 1994) ter depozicija nizkomolekularnih sekundarnih metabolitov v je-

* Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, e-pošta: viljem.vek@bf.uni-lj.si

** Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, dr. e-pošta: primoz.oven@bf.uni-lj.si

*** Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, e-pošta: gregor.rep@bf.uni-lj.si

drovini in snovi z večjo molekulsko maso v diskoloriranem lesu (Albert in sod., 2003; Koch in sod., 2003; Torelli, 2003).

Diskoloriran les nastane kot odziv ksilemskih tkiv na mehansko poškodovanje, razvije pa se lahko v osrednjem delu ali na periferiji debla, odvisno od tipa mehanske poškodbe (Torelli, 2001). Od zdrave beljave je diskoloriran les zamejen z reakcijskimi conami, ki predstavljajo mesto aktivnega odziva parenhimskih celic beljave na spremenjene mikrookoljske razmere v poškodovanem lesu (Shain, 1967; Shortle in sod., 1996; Shortle in sod., 1995). Po poškodovanju nastanejo tudi nova poranitvena tkiva, ki poizkušajo prerasti poškodbo in tako vzpostaviti sklenjenost vaskularnih tkiv.

Bukev je ena izmed gospodarsko najpomembnejših lesnih vrst v slovenskih gozdovih. Zaradi uporabe težke mehanizacije pri poseku dreves in spravi hlovovine se povečuje delež mehansko poškodovanih bukev, s tem pa tudi delež z ranitvijo spremenjenih tkiv, ki v gozdarsko-lesarski verigi praviloma predstavljajo odpadke. Anatomija diskoloriranega lesa, t.j. rdečega srca, in poranitvenih tkiv je prav pri bukvi relativno dobro raziskana, manj pa je podatkov o vsebnosti in karakterju ekstraktivov v tako spremenjenem tkivu. Koch in sodelavci (2003) so identificirali nekatere ekstraktive, ki se pojavljajo v rdečem srcu bukke, Albert in sodelavci (2003) pa so ugotavljali vsebnosti fenolnih ekstraktivov v rdečem srcu bukke pri različnih režimih sušenja. Kot kaže pregled literature, praktično v celoti manjkajo podatki o vsebnosti ekstraktivov v reakcijskih conah in poranitvenem lesu bukke. Glede na to, da je kompartmentalizacijskim tkivom pripisano zaščitno in obrambno funkcijo mogoče pojasniti z anatomske in biokemične spremembe, domnevamo, da bi se prav v teh tkivih utegnile pojaviti bioaktivne fenolne komponente, ki jih v normalnem lesu sicer ni ali pa bi bila koncentracija morebitnih bioaktivnih snovi znatno višja kot v normalnem lesu, kar je primer v lesu grč iglavcev (Willfor in sod., 2003). V tej preliminarni študiji smo želeli ugotoviti, ali obstajajo razlike v vsebnosti fenolnih ekstraktivov med različnimi kategorijami lesa bukke. Za kvantitativno analizo fenolnih snovi v ekstraktih lesa se uporablja kolorimetrična metoda, ki temelji na uporabi reagenta Folin-Ciocalteu, pri čemer je vsebnost ekstraktivov izražena v ekvivalentih standardne spojine (Scalbert in sod., 1989). Scalbert in sodelavci so na ta način preiskovali vsebnost fenolnih snovi v ekstraktih lesa 5 iglavcev in 12 listavcev, med njimi tudi pri bukvi (*Fagus sylvatica*), vendar ne navajajo kategorije lesnega tkiva, ki so ga pri tej vrsti proučevali.

V pričujočem prispevku smo zato želeli preveriti primerčnost metode, ki temelji na uporabi reagenta Folin-Ciocalteu, za določitev vsebnosti skupnih fenolov v normalnem, delno razkrojenem in poranitvenem lesu ter v rdečem srcu in reakcijskih conah pri bukvi (*Fagus sylvatica*). Ovre-



Slika 1. Rožnik Tivoli: posek in razrez bukke (*Fagus sylvatica* L.). Vzorce za analizo vseh fenolov smo odvzeli na deblu z več metrov dolgo mehansko poškodbo.

dnotiti smo želeli tudi primernost oz. ustreznost standardne spojine, zato smo vsebnost fenolov izrazili v ekvivalentih kvercetina in galne kisline.

MATERIAL IN METODA

V raziskavo smo vključili material, ki smo ga pridobili pri poseku mehansko poškodovane bukke (*Fagus sylvatica* L.) v primestnem gozdu Rožnik Tivoli v Mestni občini Ljubljana. Drevo je raslo na blagem jugozahodnem pobočju v sestoji, kjer prevladujejo odrasle bukke. Iz debla posekanega drevesa smo 26. 2. 2009 izžagali več kolotov (slika 1), sveže vzorce prenesli v delavnico Oddelka za lesarstvo, jih grobo razrezali in shranili v zamrzovalni skrinji do nadaljnje obdelave.

Pred razrezom smo material skrbno pregledali in ga makroskopsko opisali, zatem pa na osnovi rastnih posebnosti označili bodoče vzorce, ki smo jih namenili za ekstrakcijo. Odvzeli smo vzorce intaktne beljave, poranitvenega lesa, rdečega srca, reakcijskih con in razkrojenega lesa. Velikost vzorcev je bila 40 mm x 40 mm x 50 mm, v primeru reakcijskih con in poranitvenega lesa pa je bila velikost vzorcev prilagojena obliki in velikosti tkiv. Z uporabo modelarske tračne žage in dleta smo vzorce predelali v iveri in jih shranili v ustrezno označene petrijevke, jih posušili do zračno suhega stanja in nato zmlili v laboratorijskem mlinu z vodnim hlajenjem IKA A10. Lesni prah smo presejali skozi sito s 400 µm odprtini. Tako pridobljeno frakcijo vzorca smo nato shranili v tesno zaprte plastične posode.

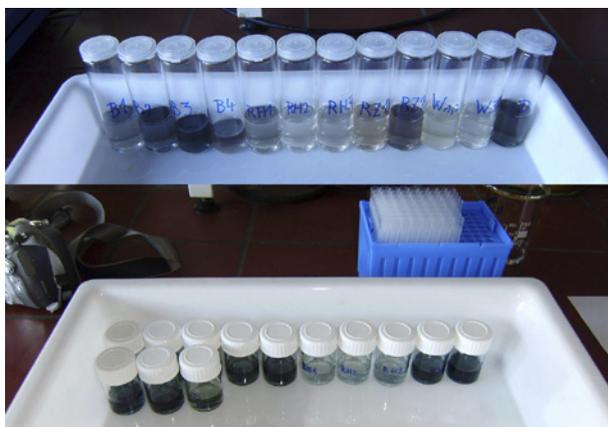
Določili smo tudi delež suhe snovi v vzorcu, pri čemer smo vlažnost lesnega prahu določili skladno s TAPPI stan-

dardom (T264-cm-97, 2002). Nato smo izvedli ekstrakcijo fenolnih spojin tako, da smo v ustrezno označene 100 mL čaše natehtali 0,25 g lesnega vzorca in dodali 25 mL 80 % vodne raztopine metanola. Ob stalnem mešanju na magnetnih mešalih smo vzorce ekstrahirali 6 ur (Albert in sod., 2003), nato smo metanolne ekstrakte prefiltrirali in jih do pričetka nadaljnjih analiz hranili pri 4 °C.

Delež skupnih fenolov v ekstraktih bukovine smo določili spektrofotometrično z uporabo Folin-Ciocalteu reagenta po postopku, ki ga je predlagal Scalbert s sodelavci (1989). Pripravili smo vodno raztopino Folin-Ciocalteu reagenta (Sigma) (redčenje z vodo v razmerju 1/9, v/v), vodno raztopino natrijevega karbonata (Riedel-de Haën) (7,5 g/L) ter raztopine kvercetina (Sigma) s koncentracijami (151,2, 75,6, 37,8, 18,3, 9,5, 4,7 in 2,4) mg/L in raztopine galne kisline (Fluka) s koncentracijami (500, 250, 125, 100 in 50) mg/L. Slednje so služile za določitev umeritvenih krivulj.



Slika 2. Rastopine različnih koncentracij kvercetina in galne kisline po dodatku Folin-Ciocalteu reagenta.



Slika 3. Metanolni ekstrakti bukovine pred dodatkom Folin-Ciocalteu reagenta in po njem.

Pred spektrofotometričnimi meritvami smo k 0,5 mL metanolnega ekstrakta oz. standardne raztopine dodali 2,5 mL razredčenega Folin-Ciocalteu reagenta ter po 30 sekundah še 2 mL raztopine natrijevega karbonata. Tako pripravljene vzorce smo nato dobro premešali (sliki 2 in 3).

Po 2-urni inkubaciji pri 20 °C smo z UV-VIS spektrofotometrom Perkin-Elmer Lambda 2 določili absorbance vzorcev pri 765 nm, kot navaja Scalbert s sodelavci (1989). Pri tem smo uporabili kvarčne kivete z 10 mm optično potjo, meritve pa izvedli proti 80 % metanolu. Slepí vzorec smo pripravili kot zmes 80 % metanola, raztopine Folin-Ciocalteu reagenta in raztopine natrijevega karbonata v razmerju 1:5:4 (v:v:v).

Vsebnost skupnih fenolnih snovi v vzorcih smo določili na osnovi absorbance A_{765} s pomočjo enačbe regresijskih premic umeritvenih krivulj za obe referenčni spojini, torej kot ekvivalente masnih koncentracij kvercetina oziroma galne kisline [mg/L]. Vsebnost fenolov smo podali tudi kot množino fenolov na 100 gramov lesa [mmol/100g les], izraženo v ekvivalentih kvercetina ter galne kisline.

REZULTATI IN DISKUSIJA

Prečni prerez mehansko poškodovanega dela debla bukke, na katerem so označeni vzorci, ki smo jih odvzeli za ekstrakcijo, je prikazan na sliki 4. Prečni prerez izkazuje prostorsko definirane spremembe, ki v lesnem tkivu nastanejo kot posledica mehanske poškodbe. Tako je mogoče brez težav locirati mesto poškodbe ter razlikovati les, ki je nastal do trenutka poškodovanja, od lesa, ki je nastal po poškodbi. Poranitveni les raste preko poškodovanega lesnega cilindra. Na robovih rane je debelina poranitvenega lesa največja, distalno tangencialno od poškodbe je debelina lesa, ki nastaja po poškodbi, vse bolj podobna debelini normale ksilemske branike.

Na lokaciji lesa, ki je nastal pred poškodbo, je mogoče jasno ločiti barvno spremenjeno tkivo od neprizadete beljave. V območju barvno spremenjenega tkiva pa je že s prostim očesom mogoče ločiti več različnih sprememb lesa. Lesno tkivo tik pod površino poškodbe je podvrženo biološkemu razkroju, kar potrjuje tudi intenzivno temno obarvanje. Pod razkrojenim tkivom se nahaja domnevno abiotska diskoloracija. Obe kategoriji obarvanega lesa razmejuje reakcijska cona. Četudi diskoloracija jezičasto sega v beljavo, ki je nastala že pred poškodbo, so neugodne posledice poškodovanja (razkroj in diskoloracija) učinkovito kompartmentalizirane; neprizadeto beljavo ščiti temno obarvana reakcijska cona (slika 4).

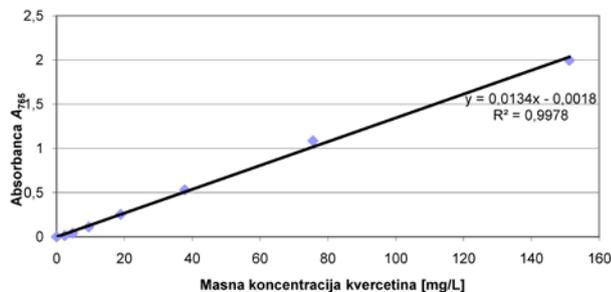
Umeritveni krivulji za kvercetin in galno kislino sta prikazani na slikah 5 in 6. Ključno za to, da smo dosegli visok koeficient determinacije R^2 med masno koncentracijo



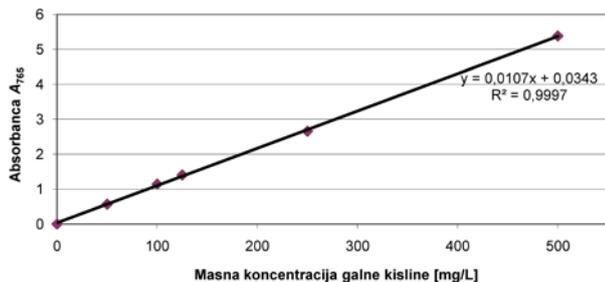
Slika 4. Topografija tkiv na prečnem prerezu poškodovanega dela debla bukve. B = vzorci beljave, W = poranitveni les, RH = vzorci rdečega srca, RZ = reakcijska cona. Odvzeli smo tudi vzorec razkrojenega lesa in ga označili z D, vendar oznaka na sliki ni razločna.

referenčne snovi in njeno absorbanco, je bila skrbna in natančna priprava raztopin ter vzdrževanje čistoče vse steklovine, vključno s kivetami spektrofotometra.

Preglednica 1 prikazuje vsebnost skupnih fenolov v 12 vzorcih različnih kategorij lesa bukve. Množina skupnih fenolov, izražena v ekvivalentih kvercetina na 100 gra-



Slika 5. Umeritvena krivulja za kvercetin z enačbo premice in vrednostjo koeficienta determinacije R^2 . Absorbanca je bila merjena pri valovni dolžini 765 nm.



Slika 6: Umeritvena krivulja za galno kislino z enačbo premice in vrednostjo koeficienta determinacije R^2 . Absorbanca je bila merjena pri valovni dolžini 765 nm.

mov lesa je največja v reakcijskih conah RZ1 in RZ2 (3,240 mmol/100g les in 2,558 mmol/100g les) ter v poranitvenem lesu W1-2 in W3 (2,683 mmol/100g les in 2,353 mmol/100g les), najmanj fenolnih spojin pa smo določili v rdečem srcu (0,502 mmol/100g les, 0,505 mmol/100g les in 0,825 mmol/100g les) (Preglednica 1).

Primerjava množine skupnih fenolov po posameznih kategorijah tkiv bukovine, preračunanih na ekvivalent galne kisline kaže, da so absolutne vrednosti koncentracij fenolnih spojin opazno višje kot v primeru preračunavanja na ekvivalent kvercetina, kar je mogoče pojasniti z manjšo absorbanco galne kisline pri enaki koncentraciji, trend razporeditve po posameznih tkivih pa je seveda enak.

Visoka vsebnost fenolnih ekstraktivov je bila značilna za reakcijske cone in poranitveni les, v diskoloriranem rdečem srcu pa je bilo fenolnih ekstraktivov najmanj (slika 7). Poranitveni les vsebuje več skupnih fenolov kot normalna beljava. V neprizadeti beljavi je nakazana radialna variabilnost vsebnosti fenolnih snovi, pri čemer jih je v perifernih delih beljave več kot v osrednjem delu debla.

Pojav fenolnih snovi v reakcijskih conah sovпада s kompartmentalizacijsko funkcijo teh tkiv, ki nastanejo kot aktiven obrambni odziv živih parenhimskih celic lesa na prodiranje patogenih organizmov ali abiotskih sprememb v poškodovanih tkivih (Schwarze in Baum, 2000; Shain, 1967). Poleg značilnih anatomskih sprememb, ki spremljajo nastanek reakcijskih con (Merela in sod., 2005), se v teh tkivih očitno kopičijo tudi fenolne snovi, ki prispevajo k njeni kompartmentalizacijski učinkovitosti. Večjo vsebnost skupnih fenolov so v reakcijskih conah oziroma mejnih plasteh diskoloracijskih stolpccev zasledili tudi pri drugih drevesnih vrstah (Shortle in Smith, 1990). Povečano koncentracijo fenolnih snovi v reakcijskih conah, t.j. na meji med beljavo in rdečim srcem, nekateri avtorji pojasnjujejo z nastankom fenolov in situ, v tkivu, ki se nahaja v neposredni bližini reakcijske cone (Albert in sod., 2003). Verjetno je to eden izmed razlogov za pojav relativno visoke vsebnosti skupnih fenolov v starejših delih beljave. Relativno skromna vsebnost fenolnih snovi v rdečem srcu kaže, da fenolne snovi verjetno sodelujejo pri nastanku barvnih substanc. Rdeče-rjavi kromofori diskoloriranega lesa pri bukvi verjetno nastajajo med oksidacijo in polimerizacijo fenolnih snovi v kemičnem ali encimatskem procesu (Albert in sod., 2003; Torelli, 2001).

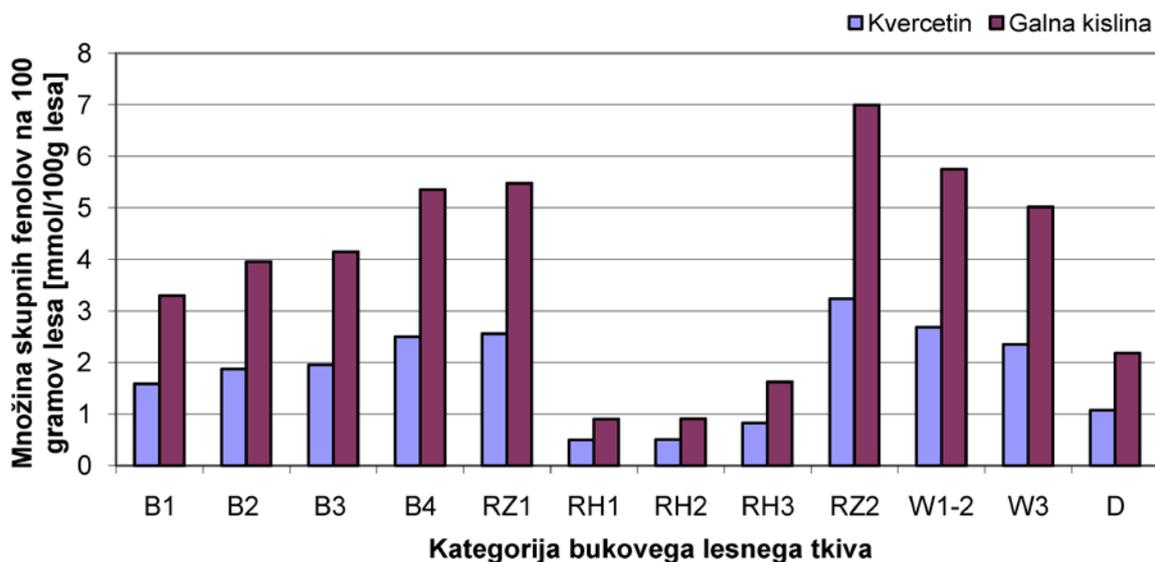
Visoka vsebnost fenolov v poranitvenem lesu bi utegnila biti povezana z zaščitno funkcijo teh tkiv, saj so ključna za preživetje kambija po poškodovanju. Možno je, da se vsebnost skupnih fenolov v teh tkivih poveča zaradi obrambnega odziva parenhimskih celic na kolonizacijo z glivami, ki vanj prodirajo iz okuženega lesa, kljub temu, da

Preglednica 1. Vsebnost skupnih fenolov v različnih kategorijah lesa bukve. B = beljava, W = poranitveni les, RH = rdeče srce, RZ = reakcijska cona, D = razkrojen les.

Vzorec	m vzorca, u ₀ [g]	Absorbanca vzorca pri 765 nm	Ekvivalenti kvercetina		Ekvivalenti galne kisline	
			Masna koncentracija [mg/L]	Množina na 100 g lesa [mmol/100g les]*	Masna koncentracija [mg/L]	Množina na 100 g lesa [mmol/100g les]**
B1	0,2243	0,5739	42,96	1,584	50,43	3,303
B2	0,2323	0,7043	52,69	1,876	62,62	3,960
B3	0,2323	0,7356	55,03	1,959	65,54	4,146
B4	0,2282	0,9245	69,13	2,505	83,20	5,357
RH1	0,2318	0,1866	14,06	0,502	14,23	0,902
RH2	0,2323	0,1883	14,19	0,505	14,39	0,911
RH3	0,2311	0,3072	23,06	0,825	25,50	1,622
W1-2	0,2317	1,0054	75,16	2,683	90,76	5,756
W3	0,2311	0,8791	65,74	2,353	78,95	5,022
RZ1	0,2311	0,9557	71,46	2,558	86,11	5,476
RZ2	0,2315	1,2134	90,69	3,240	110,20	6,994
D	0,2314	0,4023	30,16	1,078	34,39	2,184

*Množina fenolov, izraženih v ekvivalentih kvercetina na 100 g lesa.

**Množina fenolov, izraženih v ekvivalentih galne kisline na 100 g lesa.



Slika 7. Primerjava vsebnosti skupnih fenolov, izraženih v ekvivalentih kvercetina in galne kisline (B = beljava, W = poranitveni les, RH = rdeče srce, RZ = reakcijska cona.)

je med njima učinkovita kompartmentalizacijska bariera, stena 4 modelnega koncepta CODIT (Compartmentalization Of Decay In Trees) (Shigo in Marx, 1977). Povečana vsebnost skupnih fenolov v vzorcih beljave in porani-

tvenega lesa bi utegnila biti posledica uporabljenega reagenta, saj je znano, da lahko prisotnost reducirajočih sladkorjev, ki se nahajajo v beljavi, ne pa tudi v lesu, ki ne vsebuje več živih parenhimskih celic, vpliva na rezultat

(Scalbert in sod., 1989). Kljub enoznačnim in primerljivim rezultatom, ki smo ji pridobili z uporabo standarda kvercetina in galne kisline, se zdi, da je galna kislina bolj primerna za tovrstne analize, saj je dosegljiva kot stabilna in čista substanca, poleg tega pa je tudi cenejša od kvercetina.

Metoda določanja vsebnosti skupnih fenolov z uporabo Folin-Ciocalteu reagenta v kombinaciji s spektrofotometričnimi meritvami je primerna metoda za ugotavljanje vsebnosti skupnih fenolov v različnih kategorijah lesnih tkiv. Rezultati pričujoče preliminarne preiskave bukovine nakazujejo, da vsebnost fenolov odraža fiziološko funkcijo različnih kategorij lesa v drevesu.

ZAHVALA

Avtorji se zahvaljujemo Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije za finančno podporo programske skupine P4-0015-0481.

LITERATURA

1. **Albert L., Hofmann T., Németh, Z. I., Rétfalvi T., Koloszár J., Varga S., Csepregi I. (2003)** Radial variation of total phenol content in beech (*Fagus sylvatica* L.) wood with and without red heartwood. *Holz als Roh- und Werkstoff*, 61, 3: 227-230
2. **Dinwoodie J. M. (2000)** Timber: Its nature and behaviour. E & FN spon, London, New York, 257
3. **Koch G., Puls J., Bauch J. (2003)** Topochemical characterisation of phenolic extractives in discoloured beechwood (*Fagus sylvatica* L.). *Holzforschung*, 57, 4: 339-345
4. **Merela M., Straže A., Zupančič M., Torelli N., Oven P. (2005)** Osnovna gostota, permeabilnost in zgradba reakcijskih con pri bukvi. *Les*, 57, 1-2: 11-16
5. **Oven P., Merela M., Mikac U. A., Serša I. (2008)** 3D magnetic resonance microscopy of a wounded beech branch. *Holzforschung*, 62, 3: 322
6. **Panshin A. J., Zeeuw C. D. (1980)** Textbook of Wood Technology. Structure, Identification, Properties and Uses of a Commercial Woods of the United States and Canada. McGraw-Hill Book, New York, 722
7. **Parameswaran N., Knigge H., Liese W. (1985)** Electron microscopic demonstration of a suberised layer in the tylosis wall of beech and oak. *IAWA Bulletin*, 6, 3: 269-271
8. **Scalbert A., Monties, B., Janin, G. (1989)** Tannins in wood: comparison of different estimation methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37, 5: 1324-1329
9. **Schmitt U., Liese W. (1993)** Response of xylem parenchyma by suberization in some hardwoods after mechanical injury. *Trees*, 8, 23-30
10. **Schwarze F. W. M. R., Baum S. (2000)** Mechanisms of reaction zone penetration by fungi in wood of beech (*Fagus sylvatica* L.). *New Phytol.*, 146, 129-140
11. **Shain L. (1967)** Resistance of Sapwood in Stems of Loblolly Pine to Infection by *Fomes Annosus*. *Phytopathology*, 57, 1034-1045
12. **Shigo A. L., Marx H. G. (1977)** Compartmentalization of decay in trees. *USDA Forest Service Agriculture Information Bulletin*, 405, 73
13. **Shortle W., Smith K., Dudzik K. R. (1996)** Decay diseases of stemwood: detection, diagnosis, and management. *Forest Trees and Palms*, 95-109
14. **Shortle W. C., Smith K. T. (1990)** Decay column boundary layer formation in maple. *Biodeterioration research*, 3, 377-389
15. **Shortle W. C., Smith K. T., Dudzik K. R., Parker S. (1995)** Response of Maple Sapwood to Injury and Infection. *European Journal of Forest Pathology*, 25, 241-252
16. **T264-Cm-97 (2002)** Preparation of wood for chemical analysis.
17. **Torelli N. (2001)** Odziv drevja na globoke in površinske poškodbe na primeru bukve (*Fagus sylvatica* L.) s poudarkom na nastanku in ekologiji ranitvenega lesa ("rdeče srce"). *Gozdarski vestnik*, 59, 2: 85 - 94
18. **Torelli N. (2003)** Ojedritev - vloga in proces. *Les*, 55, 368-379
19. **Torelli N., Križaj B., Oven P. (1994)** Barrier zone (CODIT) and wound-associated wood in beech (*Fagus sylvatica* L.). *Holzforschung und Holzverwertung*, 46, 49-51
20. **Tsoumis G. T. (1991)** Science and technology of wood: structure, properties, utilization. Van Nostrand Reinhold, New York, 494
21. **Willfor S., Hemming J., Reunanen M., Eckerman C., Holmbom B. (2003)** Lignans and Lipophilic Extractives in Norway Spruce Knots and Stemwood. *Holzforschung*, 57, 1: 27-36

NOVA NMR METODA ZA NATANČNO IN HITRO DOLOČEVANJE VLAŽNOSTI LESA

A new NMR method for accurate and rapid determination of wood moisture content

Izvleček: V prispevku je predstavljena nova metoda za natančno določanje vlažnosti lesa na osnovi jedrske magnetne resonance (NMR). Poskusi so bili narejeni na vzorcih lesa navadne bukve in hrasta doba v svežem stanju in pri različnih ravnovesnih vlažnostih vzorcev ($\approx 88\%$, 76% , 65% , 34% in 20%). Kot kontrola za izmerjene vlažnosti z NMR metodo je bila uporabljena konvencionalna gravimetrična metoda. NMR metoda za določevanje vlažnosti v lesu temelji na linearnem razmerju med amplitudo signala proste precesije (FID) in maso vode znotraj vlažnega vzorca lesa. S pomočjo določene korelacije med FID in maso vode ter tehtanjem vlažnega vzorca lahko, brez dodatnega sušenja, določimo vlažnost vzorca. NMR je nedestruktivna, zelo natančna in hitra metoda za merjenje vlažnosti lesa.

Ključne besede: merjenje vlažnosti lesa; jedrska magnetna resonanca; NMR; signal proste precesije; FID; gravimetrična metoda.

Abstract: This paper presents a new method for accurate determination of wood moisture content based on nuclear magnetic resonance (NMR). Experiments were done on common beech and pedunculate oak wood samples at green moisture content and at different equilibration moist states ($\approx 88\%$, 76% , 65% , 34% and 20%). As a control for NMR moisture content method the conventional gravimetric method has been used. The NMR method for determination of moisture in wood is based on the linear relationship between the amplitude of the NMR FID signal and the mass of water in the wet woody sample. The wood moisture content is determined using the correlation between the FID signal and the mass of water, and weighing of the wet sample. The presented method for wood moisture content measurement requires no further sample drying, therefore it is non-destructive. In addition it is very accurate and rapid.

Key words: moisture content determination; nuclear magnetic resonance; NMR; free-induction-decay; FID; gravimetric method.

UVOD

Les je naraven higroskopen material, katerega lastnosti so odvisne od več faktorjev. Poleg anatomije lesa posameznih drevesnih vrst ter variabilnosti zgradbe znotraj vrste je vlažnost lesa eden najpomembnejših dejavnikov, ki vplivajo predvsem na fizikalne in mehanske lastnosti tega materiala. Za uporabnike lesa je bistvenega pomena, da

so sposobni hitro in natančno določiti vlažnost tako na makroskopskem kot tudi na mikroskopskem nivoju. Pri obdelavi je npr. pomembno spremljanje vlažnosti lesa med sušenjem, spremljane vlage v lesnih kompozitih, med impregnacijo lesa z zaščitnimi sredstvi, pri površinski obdelavi, med lepljenjem ipd. Za določevanje vsebnosti vode v lesu je bilo razvitih mnogo metod (Kollmann, 1951; Skaar, 1988), med ostalimi se pojavi tudi metoda jedrske magnetne resonance (NMR). NMR se v lesarski znanosti uspešno uporablja tudi za proučevanje interakcij med lesom in vodo, za spremljanje absorpcije in desorpcije vode in tudi za proučevanje prostorske porazdelitve vode zno-

* Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, e-pošta: maks.merela@bf.uni-lj.si

** Institut Jožef Stefan, Ljubljana, Jamova cesta 39, 1000 Ljubljana

traj vzorcev (Almeida in sod., 2007; Araujo in sod., 1992; Hall in Rajanayagam, 1986; Labbe in sod., 2002; Sharp in sod., 1978; Van Houts in sod., 2004; Wang in Chang, 1986). NMR metoda omogoča opazovanje migracij vode med posameznimi lesnimi tkivi, kot tudi daljinski transport oz. tok vode znotraj dreves (Van As, 2007); slikanje struktur lesa na makroskopskem (Chang in sod., 1989; Morales in sod., 2004; Wang in Chang, 1986) in mikroskopskem nivoju (Merela in sod., 2005); karakterizacijo napak oz. rastnih anomalij v lesu (Coates in sod., 1998; Morales in sod., 2004); preiskave kolonizacij in okužb lesa z različnimi glivami (Meder in sod., 2003; Müller in sod., 2001); študije obrambnih mehanizmov in odziv dreves na ranitve in morebitne okužbe (Barry in sod., 2001; Oven in sod., 2008; Pearce in sod., 1994) in tudi razvoj nekroznih tkiv v steblih okuženih dreves (Kuroda in sod., 2006).

Povzeto po Sharp in sod. (1978), obstajata dve glavni NMR tehniki za spremljanje vlažnosti v lesu. Prva je stacionarna (angl. steady state) in druga dinamična (angl. unsteady state) metoda. Statično NMR metodo je med prvimi na lesu preskusil Nanassy (1973). Pri tej metodi je uporabljeno statično elektro-magnetno polje z ustreznim frekvenco ter magnetno polje s spreminjajočo se intenziteto. Če se radio-frekvenčno (RF) valovanje ujema z resonančno frekvenco jeder v vzorcu, le-ta absorbirajo določeno energijo radio-frekvenčnega (RF) valovanja. Jakost absorpcije se odraža kot funkcija RF frekvence in na ta način iz krivulje funkcije lahko sklepamo na količino vode znotraj vzorca. Nekoliko kasneje razvita dinamična NMR metoda je t.i. pulzna NMR (Sharp in sod., 1978), pri kateri se spremlja signal proste precesije (FID) jeder znotraj vzorca. V tem primeru je vzorec vstavljen v RF tuljavo, ki jo obdaja statično magnetno polje. Na RF tuljavo priključimo kratkotrajen sunek RF napetosti, ki v tuljavi ustvari vrteče se magnetno polje, posledica katerega je odklon povprečne orientacije jeder (jedrske magnetizacije) vzorca v smer pravokotno na statično magnetno polje. RF sunki tako povzročijo vzbujanje jeder v precesijo. Hkrati s precesijo začne potekati tudi relaksacija oz. povrnitev jeder v prvotni ravnovesni položaj. Posledica precesije jeder je inducirana napetost v RF tuljavi, ki jo lahko zabeležimo kot signal proste precesije jeder; angl. free induction decay (FID) signal.

Eksperimenti, opravljeni na lesu javorja in smreke (Sharp in sod., 1978), so razkrili, da se amplituda FID signala linearno povečuje s količino vode v lesu. Kasneje je bilo ugotovljeno (Menon in sod., 1987), da ob upoštevanju določenih kemijskih dejstev na ta način lahko spremljajo oz. opazujejo vodo v lesu. Vsebnost vode v lesu (MC) so tako izrazili kot:

$$MC = \frac{M_0}{S_0 - M_0} \cdot \frac{\rho_{H_{wood}}}{\rho_{H_{water}}} \cdot 100 \quad [\%]; \quad (1)$$

kjer je M_0 -magnetizacija vzorca v ravnovesnem stanju in S_0 - magnetno resonančni signal, zaznan v času relaksacije; $\rho_{H_{wood}}$ označuje protonsko gostoto v obliki števila protonov na gram lesa (t.j. celuloze in lignina), medtem ko $\rho_{H_{water}}$ izraža protonsko gostoto vode.

FID je torej najpreprostejši signal NMR, ki ga proizvede RF sunek, ki odkloni jedra v smer pravokotno na smer statičnega magnetnega polja. Idejo, da bi bilo mogoče vlažnost lesa znotraj vzorca določiti neposredno iz amplitude FID signala in iz mase vlažnega vzorca, smo podprli z našimi eksperimenti in tako razvili hitro NMR metodo za določevanje vlažnosti.

MATERIAL IN METODE

PRIPRAVA VZORCEV

Prvi eksperimenti so bili opravljeni na vzorcih navadne bukve kot predstavniku difuzno poroznih listavcev in hrasta doba kot predstavniku venčasto poroznih listavcev. Po pet vzorcev za vsako vrsto smo pripravili tako, da smo z dreves odrezali nepoškodovane vejice s premerom od 7 mm do 9 mm in dolžine okoli 5 cm. Med transportom so bili vzorci shranjeni v nepropustni PVC vrečki, s čimer smo preprečili začetno izsuševanje. Za meritve FID signala smo izdelali vzorce v obliki valja s premerom do 8 mm in dolžine do 15 mm (slika 1). Vejice smo najprej našagali na dolžino 25 mm, nato pa skozi center v aksialni smeri z vertikalnim vrtnim strojem izvrtali luknjo premera 4 mm. S tem smo izločili stržen, ki v veliki meri prispeva k višji vlažnosti vzorca, ter istočasno povečali površino vzorca in s tem zagotovili hitrejše uravnovešanje. Vzorce smo nato požagali na končno dolžino 15 mm. Sledilo je prvo tehtanje svežih vzorcev, tik pred tem pa smo odstranili skorjo s pripadajočo kambijevo cono in se tako čimbolj približali strukturi ter povprečni vlažnosti normalnega svežega lesa. Tehtanje smo izvedli na tehtnici Sartorius na 0,1 mg natančno. Takoj po tehtanju smo svežim vzorcem izmerili FID signal in jih nato vstavili v klimatizacijske komore (Katedra za tehnologijo lesa - Oddelek za lesarstvo) z različnimi nasičenimi vodnimi raztopinami soli, ki vzdržujejo



Slika 1: Uravnovešeni vzorci lesa bukve in hrasta doba za merjenje FID signala.

Preglednica 1: Nasičene solne raztopine, uporabljene pri uravnotežanju vzorcev ter ravnovesne vlažnosti (u_r), ki jih les doseže pri posamezni relativni zračni vlažnosti (φ) pri $T = 20^\circ\text{C}$.

	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	NaCl	NaNO ₂	MgCl ₂	CH ₃ COOK
φ	88 %	76 %	65 %	34 %	20 %
u_r	20 %	14,5 %	12 %	7 %	4,5 %

različne relativne zračne vlažnosti (pregl. 1).

Po doseženi želeni ravnovesni vlažnosti smo vzorce v posebnem prenosnem eksikatorju prenesli v MRI laboratorij, kjer smo NMR meritve ponavljali pri postopoma zmanjševanih vlažnostih lesa. Vzorce smo vsakič pred meritvijo stehali, po končanem eksperimentu pa smo jih v sušilniku posušili do absolutno suhega stanja ($T = 103 \pm 2^\circ\text{C}$; tehtanje do konstantne mase). Tako smo lahko izračunali dejansko vlažnost vzorcev ob vsakem merjenju NMR FID signala (enačba 2).

$$u = \frac{m_{vl} - m_a}{m_a} \cdot 100 = \frac{m_{voda}}{m_a} \cdot 100 \quad [\%] \quad (2)$$

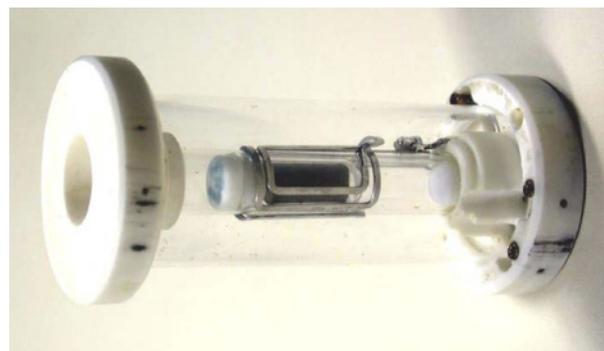
kjer je: m_{vl} - masa vlažnega vzorca, m_a - masa absolutno suhega vzorca in m_{voda} - masa vode v vzorcu.

IZVEDBA NMR EKSPERIMENTOV

NMR meritve so bile opravljene v MRI laboratoriju Odseka za fiziko trdne snovi (F5) na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani. Eksperimenti so potekali na magnetno-resonančnem tomografu sestavljenem iz: superprevodnega horizontalnega magneta (2.35 T) (Oxford Instruments), gradientnih ojačevalnikov in RF ter gradientnih tuljav z ločljivostjo od 0,5 mm do 0,05 mm (Bruker). Magnet je priključen na NMR/MRI spektrometer (Apollo, TecMag) in krmiljen s pomočjo programske opreme NTNMR (Vers.2.3.1 TecMag Inc.).

FID (Free Induction Decay) signal je signal proste precesije vodikovih jeder v vzorcu in je maksimalen signal, ki ga iz vzorca dobimo pri enkratni vzbuditvi jeder z 90° RF pulzom. Amplituda signala je bila merjena 30 μs po vzbuditvi z 90° RF pulzom, ko je prispevek signala vodikovih jeder iz trdnega dela lesa (celuloza, lignin ...) zanemarljivo majhen in k FID signalu prispevajo le protoni iz vode.

Pred NMR meritvami smo vsak vzorec vstavili v posebno stekleno epruvetko, prirejeno velikosti RF tuljave, ter jo zamašili s teflonskim zamaškom. S tem smo preprečili izsuševanje ali navlaževanje uravnoteženih vzorcev med samo meritvijo. Meritev tako pripravljenega vzorca je potekala v sedlasti RF tuljavi z notranjim premerom 10 mm (slika 2), ki je bila nameščena na gradientno tuljavo v centru odprtine horizontalnega magneta.



Slika 2: Vzorec v posebni stekleni epruvetki, zaprti s teflonskim zamaškom in vstavljen v sedlasto RF tuljavo z notranjim premerom 10 mm.

Na vseh vzorcih smo pri različnih vlažnostih (od svežega do absolutno suhega) na ta način izmerili FID signal. Podatki merjenj so bili obdelani in statistično analizirani s programsko opremo OriginLab 7.5. Iz podatkov tehtanj vzorcev smo po gravimetrični metodi izračunali dejansko vlažnost posameznega vzorca med merjenjem.

Za kontrolo metode določanja vlažnosti s FID signalom smo meritve ponovili na naključno izbranih vzorcih različnih drevesnih vrst (*Fraxinus excelsior*, *Tilia spp.*, *Picea abies*, *Fagus sylvatica*) različnih vlažnosti in velikosti. Tudi v tem primeru smo za kontrolno metodo uporabili gravimetrično določevanje vlažnosti (enačba 2).

REZULTATI

Meritve so potrdile, da je amplituda FID signala neposredno odvisna od mase vode (m_{voda}) v merjenem vzorcu. Podatkom, ki kažejo odvisnost FID signala od mase vode (80 merilnih točk), smo prilegali linearno (trendno) črto (slika 3) in z determinacijskim koeficientom ($R_2 = 0,9982$) izrazili odvisnost:

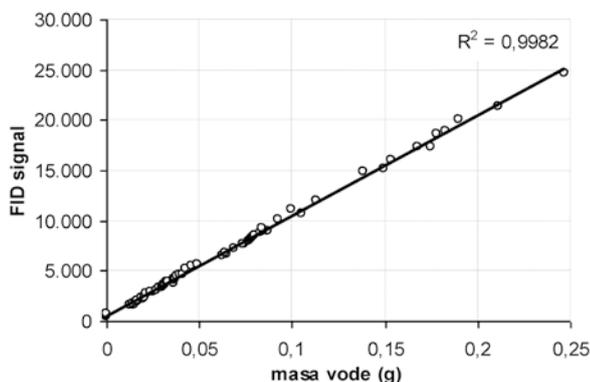
$$FID = K1 \cdot m_{voda} + K2 \quad (3)$$

Eksperimentalno pridobljeni konstanti v enačbi 3 ($K1$ in $K2$) veljata za kalibracijo metode na spektrometru, uporabljenem v našem primeru, in sta odvisni od vrste RF tuljave, stopnje ojačanja signala itd. V primeru našega spektrometra je vrednost konstant: $K1=100,137$ in $K2=452,84$.

V nadaljevanju smo iz prejšnje linearne zveze izrazili maso vode v vzorcu:

$$m_{voda} = \frac{FID - K2}{K1} \quad (4)$$

kjer je m_{voda} izračunana zgolj iz amplitude FID signala posameznega vzorca. Maso vode lahko izrazimo tudi kot razliko med maso vlažnega vzorca (m_{vl}) in maso absolutno suhega vzorca (m_a):



Slika 3: Grafični prikaz linearne odvisnosti FID signala od mase vode v vzorcu pri meritvah, opravljenih na vzorcih bukovine in hrastovine.

$$m_{\text{vode}} = m_{\text{vl.}} - m_o \quad (5)$$

Iz prejšnjih zvez lahko maso absolutno suhega lesa izrazimo kot:

$$m_o = m_{\text{vl.}} - \left(\frac{FID - K2}{KI} \right) \quad (6)$$

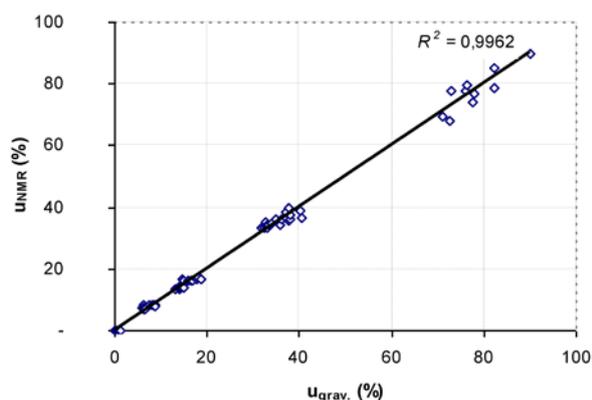
Tako izraženo m_o v zadnjem koraku vstavimo v enačbo za gravimetrično določevanje vlažnosti lesa (enačba 2) in dobimo končno enačbo za izračun vlažnosti z metodo NMR (u_{NMR}):

$$u_{NMR} = \frac{FID - K2}{KI \cdot \left[m_{\text{vl.}} - \left(\frac{FID - K1}{KI} \right) \right]} \cdot 100 [\%] \quad (7)$$

Enačba 7 prikazuje, da za določanje vlažnosti z NMR metodo (u_{NMR}) potrebujemo zgolj amplitudo FID signala (FID) ter maso vlažnega vzorca ($m_{\text{vl.}}$). Nadvse pomembno je dejstvo, da vlažnost lahko izračunamo brez mase absolutno suhega lesa (m_o), kar pomeni, da se izognemo destruktivnemu in dolgotrajnemu sušenju vzorcev do absolutno suhega stanja.

V nadaljevanju smo NMR metodo določevanja vlažnosti preskusili na različnih, naključno izbranih vzorcih lesa različnih vlažnosti. Vlažnosti, izmerjene z u_{NMR} metodo, smo primerjali z vlažnostmi, določenimi s kontrolno gravimetrično metodo (slika 4).

Visok determinacijski koeficient ($R^2 = 0,9962$) ujemanja rezultatov o vlažnosti z gravimetrično metodo ter u_{NMR} metodo potrjuje primernost in točnost slednje za določevanja vlažnosti lesa (slika 4). Izkazalo se je, da je metoda primerna za različne drevesne vrste, pri razponu vlažnosti od svežega stanja do absolutno suhega stanja.



Slika 4: Primerjava NMR določevanja vlažnosti (u_{NMR}) s kontrolno gravimetrično metodo ($u_{\text{grav.}}$). Visok determinacijski koeficient potrjuje natančnost NMR metode določevanja vlažnosti lesa.

SKLEPI

Razvita NMR metoda določevanja vlažnosti lesa temelji na linearni zvezi med amplitudo FID signala in maso vode v vzorcu lesa. Za natančno merjenje vlažnosti je potrebno NMR sistem pred meritvami kalibrirati z vzorci lesa znane vlažnosti. Metoda je zelo natančna, hitra in nedestruktivna. V naši eksperimentalni študiji smo uporabili manjšo (10 milimetrsko) tuljavo, v nadaljnjih študijah želimo preveriti uporabo večjih RF tuljav, ki bi omogočile merjenje vzorcev večjih dimenzij in s tem razširile območje uporabe te metode. Ob primernem razvoju je možna implementacija metode na posebej prirejenem NMR spektrometru za določanje vlažnosti, ki bi vključeval še tehtnico. Za posebne pogoje meritev (večji vzorci ali bolj natančne meritve) pa je izvedba metode še vedno vezana na raziskovalne NMR sisteme.

Nova NMR metoda za določevanje vlažnosti v lesu je že patentirana pod imenom Metoda in naprava za takojšnje določitev vlažnosti lesa (patentna prijava P-200900081) pri Uradu RS za intelektualno lastnino.

ZAHVALA

Raziskava je nastala v okviru nacionalnih raziskovalnih projektov "Raziskave lesa kot materiala in tkiva živih dreves z MRI" (J1-7042-0106) in "Les in lignocelulozni kompoziti" (No: P4-0015-0481), ki jih financira Javna agencija za raziskovalno dejavnost RS. Za vso pomoč v Laboratoriju za slikanje z MR se avtorji zahvaljujemo Ani Sepe z Oddelka za fiziko trdne snovi na Institutu Jožef Stefan.

LITERATURA

1. **Almeida G., Gagné S., Hernández R. (2007)** A NMR study of water distribution in hardwoods at several equilibrium moisture contents. *Wood science and technology*, 41, 4: 293-307
2. **Araujo C. D., Mackay A. L., Hailey J. R. T., Whittall K. P. (1992)** Proton magnetic techniques for characterization of water in wood: application to white spruce. *Wood science and technology*, 26, 101-113
3. **Barry K. M., R.B., P., Evans S. D., Hall L. D., Mohammed C. M. (2001)** Initial defence responses in sapwood of *Eucalyptus nitens* (Maiden) following wounding and fungal inoculation. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 58, 63-72
4. **Chang S. J., Olson J. R., Wang P. C. (1989)** NMR imaging of internal features in wood. *Forest Products Journal*, 39, 6: 43-49
5. **Coates E. R., Chang S. J., Liao T. W. (1998)** A quick defect detection algorithm for magnetic resonance images of hardwood logs. *Forest Products Journal*, 48, 10: 68-74
6. **Hall L. D., Rajanayagam V. (1986)** Evaluation of the distribution of water in wood by use of three dimensional NMR volume imaging. *Wood science and technology*, 20, 329-333
7. **Kollmann F. (1951)** *Technologie des Holzes und der Holzwerkstoffe*. Band 1, 2. Auflage. Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1183
8. **Kuroda K., Kanbara Y., Inoue T., Ogawa A. (2006)** Magnetic resonance micro-imaging of xylem sap distribution and necrotic lesions in tree stems. *IAWA Journal*, 27, 1: 3-17
9. **Labbe N., De Jéso B., Lartigue J.-C., Daudé G., Pétraud M., Rattier M. (2002)** Moisture Content and Extractive Materials in Maritime Pine Wood by Low Field 1H NMR. *Holzforschung*, 56, 1: 25-31
10. **Meder R., Cood S. L., Franich R. A., P.T., C., Pope J. M. (2003)** Observation of anisotropic water movement in *Pinus radiata* D. Don sapwood above fiber saturation using magnetic resonance micro-imaging. *Holz als Roh-und Werkstoff*, 61, 251-256
11. **Menon R. S., Mackay A. L., Hailey J. R. T., Bloom M., Burgess A. E., Swanson J. S. (1987)** An NMR Determination of the Physiological Water Distribution in Wood during Drying. *Journal of Applied Polymer Science*, 33, 4: 1141-1155
12. **Merela M., Sepe A., Oven P., Sersa I. (2005)** Three-dimensional in vivo magnetic resonance microscopy of beech (*Fagus sylvatica* L.) wood. *Magnetic Resonance Materials in Physics Biology and Medicine*, 18, 4: 171-174
13. **Morales S., Guesalaga A., Fernández M. P., Guarini M., Irarrazaval P. (2004)** Computer reconstruction of pine growth rings using MRI. *Magnetic Resonance Imaging*, 22, 403-412
14. **Müller U., Bammer R., Stollberger R., Wimmer R. (2001)** Detection of fungal wood decay using Magnetic Resonance Imaging. *Holz als Roh-und Werkstoff*, 59, 190-194
15. **Nanassy A. J. (1973)** Use of Wide Line NMR for Measurement Of Moisture Content in Wood. *Wood science and technology*, 5, 3: 187-193
16. **Oven P., Merela M., Mikac U., Serša I. (2008)** 3D magnetic resonance microscopy of a wounded beech branch. *Holzforschung*, 62, 3: 322
17. **Pearce R. B., S., S., Doran S. J., Carpenter T. A., Hall L. D. (1994)** Non - invasive imaging of fungal colonization and host response in the living sapwood of sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) using nuclear magnetic resonance. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 45, 359-384
18. **Sharp A. R., Riggan M. T., Kaiser R., Schneider M. H. (1978)** Determination of Moisture-Content of Wood by Pulsed Nuclear Magnetic-Resonance. *Wood and Fiber*, 10, 2: 74-81
19. **Skaar C. (1988)** *Wood - Water Relations*. Springer, Berlin Heidelberg New York, 283
20. **Van as H. (2007)** Intact plant MRI for the study of cell water relations, membrane permeability, cell-to-cell and long distance water transport. *Journal of Experimental Botany*, 58, 4: 743-756
21. **Van Houts J. H., Wang S., Shi H., Pan H., Kabalka G. W. (2004)** Moisture movement and thickness swelling in oriented strandboard, part1. Analysis using nuclear magnetic microimaging. *Wood science and technology*, 38, 8: 617-628
22. **Wang P. C., Chang S. J. (1986)** Nuclear magnetic resonance imaging of wood. *Wood and Fiber Science*, 18, 2: 308-314

VPLIV ŠIRINE BRANIK HRASTOVINE IN DELEŽA EKSTRAKTIVOV NA NARAVNO ODPORNOST PROTI GLIVAM RAZKROJEVALKAM LESA

Influence of xylem growth ring width and extractive content on durability of oak heartwood

Izvleček: Hrastovina (*Quercus spp.*) velja za eno najbolj odpornih evropskih vrst lesa. Najpomembnejši dejavnik naravne odpornosti hrastovine je velik delež ekstraktivnih snovi. V pričujoči raziskavi smo želeli ugotoviti, ali obstaja povezanost med širino branik (gostoto) in odpornostjo hrastovega lesa proti glivam razkrojevalkam. S tem namenom smo vzorce jedrovine hrasta, z različnimi širinami branik, izpostavili petim vrstam gliv razkrojevalk lesa: *Daedalea quercina*, *Antrodia vaillantii*, *Hypoxylon fragiforme*, *Stereum hirsutum* in *Trametes versicolor*, v skladu s standardom SIST EN 113. Na vzporednih vzorcih smo določili še deleža ekstraktivov in dušika. Iz izgube mase in mikroskopske analize razkrojenih vzorcev je razvidno, da so vzorci jedrovine hrasta z najožjimi branilkami (0,65 mm – 0,84 mm), torej z nižjo gostoto, bolj dovzetni za glivni razkroj kot gostejši vzorci s širšimi branilkami (3,1 mm – 4,2 mm). Odpornost jedrovine hrasta s širino branik 0,77 mm in gostoto okrog 500 kg/m³ proti glivam, uporabljenim v raziskavi, je primerljiva z neodporno bukovino.

Ključne besede: glive razkrojevalke, gostota lesa, izguba mase, FTIR, razkroj, *Quercus spp.*, širina branik

Abstract: Oak (*Quercus spp.*) is considered as one of the most durable European wood species. The most important factor influencing oak durability is its extractive content. In our work, we were interested in the affect of ring width and related density on oak-wood durability. Therefore, oak heartwood specimens were made of boards with different ring widths exposed to five different fungal species *Daedalea quercina*, *Antrodia vaillantii*, *Hypoxylon fragiforme*, *Stereum hirsutum* and *Trametes versicolor*, according to the SIST EN 113 procedure. On parallel samples, extractives and nitrogen content were determined as well. From gravimetrically determined mass losses and a microscopical analysis of decayed specimens we concluded that oak heartwood specimens with the narrowest growth rings and consequently lower density are more susceptible to fungal decay than denser specimens made of wider growth rings. Durability of oak heartwood with rings of 0.77 mm and density around 550 kg/m³ is comparable to durability of common beech.

Keywords: wood decay fungi, wood density, mass-loss, FTIR, decay, *Quercus spp.*, xylem growth ring width

UVOD

Pomen odpornih vrst lesa v Evropi v zadnjih desetletjih narašča predvsem zaradi vse večje okoljske ozaveščenosti. Evropski uporabniki se zaradi krčenja tropskih pragoz-

dov izogibajo tropskim lesovom, zaščiten les pa uporabljajo le, če ni na voljo odpornih drevesnih vrst. Evropski standard SIST EN 350-2 (1995) uvršča med odporne le tri evropske komercialne lesne vrste in sicer; les robinije (*Robinia pseudoaccacia* Linne), les pravega kostanja (*Castanea sativa* Miller) in hrastovino (*Quercus spp.*). Hrastovina se je že tradicionalno uporabljala za izdelke v stiku z zemljo, na

* Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Jamnikarjeva 101, SI – 1000, Ljubljana, Slovenija, e-pošta:bostjan.lesar@bf.uni-lj.si

primer za vinogradniške kole, ograje in drugo infrastrukturo, večinoma brez kakršnekoli kemične zaščite. Zaradi višje cene se hrastovina na prostem danes uporablja predvsem za izdelke z višjo dodano vrednostjo, na primer za vrtno pohištvo, opremo za otroška igrišča, zunanje talne obloge in drugo. Kot je značilno za vse naravne materiale tudi odpornost hrastovine zelo variira. Znano je, da je lahko življenjska doba izdelkov iz jedrovine hrasta, ki so v stiku z zemljo, nepredvidljiva. Znatno delež izdelkov dokaj hitro propade, medtem ko nekateri ostanejo nepoškodovani več desetletij (Aloui in sod., 2004; Rapp in sod., 2006). Razlog za to bi lahko bile razlike v odpornosti lesa različnih dreves hrasta (Guilley in sod., 2004), kar avtorji pojasnjujejo z razlikami v vsebnosti ekstraktivnih snovi (predvsem fenolov) (Aloui in sod., 2004). Čeprav je delež ekstraktivov relativno majhen, pomembno vplivajo na odpornost lesa proti lesnim škodljivcem. Hrastovina z manjšim deležem vodotopnih ekstraktivnih snovi je bila bolj dovzetna za glivni razkroj kot les hrasta z višjim deležem ekstraktivov. Kljub temu lahko samo določen del variabilnosti med drevesi pojasnimo z ekstraktivnimi snovmi (Guilley in sod., 2004), vpliv drugih lastnosti lesa k odpornosti hrastovine ostaja skromno raziskan. V tej raziskavi smo ugotavljali zvezo med širino branike in odpornostjo hrastovine, saj je v literaturi objavljenih le malo poročil o vplivu širine branik na naravno odpornost lesa, pa še te raziskave so bile večinoma posvečene lesu iglavcev (Viitanen in sod., 1997), medtem ko podatkov o vplivu širine branik (ali gostote kot parameter širine branik) na naravno odpornost lesa venčasto porozičnih listavcev nismo zasledili. Predpostavljamo, da bo jedrovina hrasta s širšimi branikami odpornejša od hrastovine z ožjimi branikami in da bo tu delež koloniziranih celic večji kot pri hrastovini s širšimi branikami.

MATERIALI IN METODE

V raziskavi smo uporabili štiri različne radialne deske hrastovine z različnimi povprečnimi širinami branik (preglednica 1). Vse deske so bile iz Vipavske doline in so bile tri leta zračno sušene. Deskam s pomočjo makroskopskih in mikroskopskih dihotomnih ključev nismo mogli določiti, kateri vrsti hrasta pripadajo. Možni vrsti sta dob (*Quercus robur* L.) in graden (*Quercus petraea* Liebel.), ki ju prištevamo v skupino tako imenovanih belih hrastov. Orientirane vzorce (11R mm × 15T mm × 40L mm, 40 za vsako desko) smo izdelali iz perifernega dela jedrovine. Tako smo v eksperimentu uporabili samo adultni les. Zaradi pomanjkanja primerljivega materiala za pripravo večjih vzorcev so bili le-ti manjši kot predpisuje standard SIST EN 113 (1996). Širino branik smo merili na uravnovešenih (20 °C, 65 % RH) vzorcih z opremo za dendrokronološke raziskave (LINTAB mizica z ročnim pomikom, stereo mikroskop OLYMPUS

S2-11, video kamera SONY CDD/RGB, računalnik). Širine branik smo izmerili s pomočjo programa za zajem podatkov TSAPWin za vsak vzorec posebej z natančnostjo 0,01 mm. Zatem smo vzorce posušili pri temperaturi 103±2 °C in določili maso ter dimenzije absolutno suhih vzorcev ter izračunali gostoto lesa v absolutno suhem stanju (ρ_0).

Hranilna gojišča za glive smo pripravili v steklenih kozarcih s pokrovčkom z volumnom 350 mL. V aluminijaste pokrovčke smo predhodno izvrtali luknje in jih zatesnili z vato. Kot hranilni medij smo uporabili krompirjev glukozni agar (PDA- Potato Dextrose Agar- DIFCO Laboratories), priprava je sledila navodilom proizvajalca. V vsak kozarec smo vlili po 50 mL hranilnega gojišča, jih zaprli in avtoklavirali (45 min; 120 °C; 1,5 bar). V avtoklav smo vstavili še mrežice iz umetne mase, ki so v nadaljevanju služile za oporo vzorcem na hranilnem gojišču in preprečevale navlaževanje lesa. Ko so se kozarci ohladili, smo na hranilno gojišče v brezprašni komori inokulirali hranilno gojišče z izbranimi vrstami gliv. Nato smo kozarce postavili v klimatizirano komoro s konstantno temperaturo 25 °C in vlažnostjo zraka 85 %.

Vzorce smo sterilizirali v avtoklavu (45 min; 120 °C; 1,5 bar). Nato smo jih v sterilnih pogojih vstavili v kozarce in jih nato za 16 tednov izpostavili petim različnim glivam razkrojevalkam lesa; dvema glivama rjave trohnobe (*Daedalea quercina* (L.) Pers. (Institut für Holzforschung, München Nemčija, *Antrodia vaillantii* (DC.: Fr.) Ryv. (ZIM L037) in trem glivam bele trohnobe (*Hypoxylon fragiforme* (Pers.) J. Kickx f. (Centraalbureau voor Schimmelcultures Baarn, Nizozemska), *Stereum hirsutum* (Willd.) Pers. (ZIM L047) in *Trametes versicolor* (L.:Fr.) Pilat. (ZIM L057), kot zahteva standard SIST EN 113 (1996). Uporabljene glive razkrojevke so bile izbrane, saj jih najdemo na lesu hrasta v naravi (Rayner in Boddy, 1995). Dva vzorca izdelana iz različnih desk hrastovine, sta bila naključno vstavljena v isti kozarec. Po izpostavitvi glivam smo vzorce očistili, posušili v sušilniku (103±2 °C) in jim izračunali spremembo mase. Za primerjavo smo uporabili vzorce bukovine (*Fagus sylvatica*), ki smo jih izpostavili istim sevom gliv. Poskus smo ponovili na osmih vzporednih vzorcih na glivo, oziroma na 40 vzorcih z enako povprečno širino branik za vse glive.

Na vzporednih vzorcih smo določili delež ekstraktivov (72 ur Soxhlet ekstrakcija, najprej z mešanico cikloheksana in etanola; nato samo z etanolom in nazadnje še z vodo (Tišler 1990)) in koncentracijo dušika. Za merjenje količine dušika smo odvzeli približno 1 g vzorcem, ki smo jih prehodno uporabili za pripravo anatomskih preparatov. Pred merjenjem količine dušika smo z električnim mlinčkom (IKA) vzorce lesa zmleli in homogenizirali na približno velikost delcev 0,2 mm. Približno 0,2 g absolutno suhega vzorca smo sežgali v kisikovi atmosferi pri 1350 °C v LECO

200-CNS analizatorju za določanje deleža ogljika in dušika, po protokolu Laboratorija za gozdno ekologijo Gozdarskega inštituta Slovenije.

Z mikroskopsko analizo vzorcev smo določili tip in delež koloniziranih celic. V ta namen smo izbrali hrastovino z najožjimi in najširšimi branikami. Prečne preparate (debeline 30 μm) smo najprej obarvali s histološkim barvilom safranin (rdeče) in nato še z astra modrim. Preparate smo dehidrirali, jih položili na objektno steklo ter jih vklopili v eparal. Tako pripravljene trajne preparate smo opazovali in merili z mikroskopom Nikon Eclipse E800.

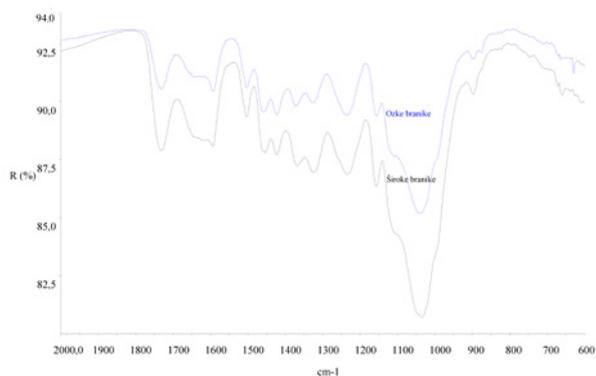
Z uporabo brusnih papirčkov Abrasive Pad 600 Grit-Coated, PK/100 (Perkin Elmer) smo posneli DRIFT (Diffuse Reflectance Infra-red Fourier Transform) spektre vzorcev lesa v območju med 4000 cm^{-1} in 450 cm^{-1} s spektrometrom Perkin Elmer FTIR (Fourier Transform Infra Red) Spectrum One. Dobljene spektralne vrhove smo primerjali s podatki za les (Michell, 1989).

Za statistično analizo rezultatov smo uporabili ANOVA (Newman-Keuls range test $p = 0,95$).

REZULTATI IN RAZPRAVA

Povprečna širina branik na preiskovanih deskah je znašala med 0,77 in 3,69 mm (preglednica 1). Glede na širino branik ja značilna ($p = 0,05$) tudi razlika v gostoti lesa; izmerjene vrednosti znašajo med 549 kg/m^3 in 748 kg/m^3 . Opazili smo tudi kvantitativne razlike v kemijski sestavi med različnimi tipi vzorcev jedrovine hrasta. Delež ekstraktivnih snovi je variiral med 2,3 % pri hrastovini z najožjimi branikami in 5,7 % pri hrastovih deskah s povprečno širino branik 1,72 mm (preglednica 1). Med širino branik in deležem ekstraktivnih snovi nismo ugotovili nobene povezave.

Razlike v kemijski sestavi potrjujejo FTIR spektri. Iz deleža ekstraktivnih snovi je razvidno, da ima jedrovina z višjim



Slika 1: FTIR spektri jedrovine hrasta s širokimi (hrast 3) in ozkimi branikami lesa (hrast 1).

Preglednica 1: Relevantne lastnosti vzorcev hrastovine (*Quercus* spp.), uporabljene v raziskavi. Statistično primerljive skupine po Newman-Keuls range testu ($p = 0,95$) so navedene v oklepajih.

	Širina branik (mm)	Gostota (kg/m^3)	Delež ekstraktivnih snovi (%)	Delež dušika (%)
Hrast 1	0,77 (a)	549 (a)	2,3 (a)	0,053 (a)
Hrast 2	1,72 (b)	593 (ab)	5,7 (c)	0,071 (b)
Hrast 3	1,79 (b)	653 (b)	2,5 (ab)	0,052 (a)
Hrast 4	3,69 (c)	748 (c)	3,8 (b)	0,053 (a)

deležem ekstraktivov več lignina in vrhov povezanih z benzenovimi obroči (1660 cm^{-1} , 1600 cm^{-1} , 1230 cm^{-1}) ter manj povezanih s celulozo (1450 cm^{-1} , 1425 cm^{-1}) (slika 1). Lignin in ekstraktivne snovi imajo podobno kemijsko zgradbo in tako tudi podoben odziv na IR svetlobo, zato jih v FTIR spektru ne moremo razlikovati.

Trije vzorci jedrovine hrasta (hrast 1, 3 in 4) vsebujejo okrog 0,05 % dušika, medtem ko je bil pri lesu z najvišjim deležem ekstraktivnih snovi (hrast 2) delež dušika večji (0,07 %). Delež dušika v lesu je pomemben, ker glive razkrojevalke potrebujejo zadostne količine dušika za rast (Zabel in Morell, 1992). Dostopen dušik v lesu pospešuje rast gliv (ibidem), vendar delež dušika v naših vzorcih ni vplival na odpornost lesa, saj je bilo dovolj dostopnega dušika v PDA (Potato Dextrose Agar) hranilnem gojišču.

Izgube mase med izpostavitvijo glivam podajamo v relativnih in absolutnih vrednostih (preglednica 2). Iz rezultatov sklepamo, da sta širina branik in naravna odpornost povezani. Med izpostavitvijo glivam so vzorci izgubili med 0,9 % in 41,9 % mase. Vzorci z najožjimi branikami so bili bolj razkrojeni kot vzorci s povprečnimi ali najširšimi branikami ($p = 0,05$). Najvišjo izgubo mase so imeli vzorci z najožjimi branikami, izpostavljeni glivi *H. fragiforme* (41,9 %), ki povzroča belo trohnobo, sledila je gliva *D. quercina* (30,6 %), ki povzroča rjavo trohnobo in gliva, ki povzroča belo trohnobo *S. hirsutum* (10,4 %). Preostali dve glivi *A. vaillantii* in *T. versicolor* sta povzročili statistično značilno manjše izgube mase, in sicer 3,2 % ter 3,5 % (preglednica 2). Za primerjavo smo glivam izpostavili tudi vzorce bukovine, ki velja za eno najslabše odpornih vrst lesa v Evropi (SIST EN 350-2). *D. quercina* povzroča višjo, *H. fragiforme* pa povzroča primerljivo izgubo mase vzorcev hrastovine z najožjimi branikami, kot smo jo določili pri bukovini. Ti podatki nakazujejo, da je v nekaterih primerih odpornost hrastovine primerljiva z odpornostjo bukovine, kljub dejstvu, da je les hrasta v standardu SIST EN 350-2 uvrščen med odporne

vrste lesa. Z dobljenimi rezultati lahko delno pojasnimo primere nepričakovano kratke življenjske dobe nekatere hrastovine v stiku z zemljo.

Večina vzorcev hrastovine kaže boljšo odpornost proti glivam razkrojevalkam, z izjemo jedrovine hrasta s srednje širokimi branikami (hrast 3). Ta vzorec jedrovine hrasta je imel primerljivo širino branik z vzorci hrasta 2, vendar je bil znatno odpornejši na glivi *D. quercina* in *H. fragiforme* kot vzorci hrasta 3. Na osnovi teh rezultatov sklepamo, da vseh razlik v odpornosti ne moremo pojasniti s širinami branik, temveč na odpornost lesa vplivajo še drugi faktorji. Nekateri avtorji poročajo, da je delež ekstraktivov najpomembnejši parameter lesa, povezan z njegovo odpornostjo proti glivam (Aloui in sod., 2004; Guilley in sod., 2004). Z analizo ekstraktivov na istih štirih vzorcih hrastovine smo potrdili predhodne ugotovitve. Hrast 2, ki je bil bolj odporen proti glivam razkrojevalkam, je vseboval višji delež ekstraktivov (5,7 %) kot hrast 3 (2,5 %) (preglednica 2). Poleg tega so se vzorci hrasta 2 izmed vseh vzorcev izkazali za najbolj odporne.

Velik vpliv na določanje naravne odpornosti hrastovine z različno širino branik pa ima tudi uporabljena testna gliva. Vzorci hrastovine z najširšimi branikami, izpostavljeni *D. quercina*, so v povprečju izgubili 9,5 % mase, medtem ko je bila izguba mase pri ostalih glivah zanemarljiva. Vzorci s srednjo širino branik (1,72 mm) in najvišjim deležem ekstraktivov, izdelani iz hrasta 2, so v povprečju izgubili manj kot 2 % svoje mase po 16 tednih izpostavitve glivam (preglednica 2). Ta rezultat potrjuje navedbe v literaturi (Aloui in sod., 2004; Guilley in sod., 2004), da je delež ekstraktivov ključen parameter, ki določa odpornost hrastovine. Vzorci hrastovine z najširšimi branikami imajo statistično značilno manjši delež ekstraktivov kot vzorci hrasta 2. Poleg tega pa statistično značilno večji delež kot vzorci hrasta 3 vzorci z najožjimi branikami (hrast 1).

Mikroskopska analiza micelija gliv v lesu je razkrila, da nobena od testnih gliv ni s hifami prodrla v trakovne parenhimske celice, saj le-te vsebujejo najvišji delež ekstraktivnih snovi. Najbolj so bile kolonizirane traheje, ki so najširše celice v hrastovini in predstavljajo nekakšno avtocesto za glive. *T. versicolor* je kolonizirala najmanjši delež celic lesa hrasta, medtem ko je vrsta *H. fragiforme* najbolj kolonizirala hrastovino in jo tudi razkrojila (Slika 2). Kot smo pričakovali, je bil les z najožjimi branikami bolj koloniziran kot les z najširšimi branikami. Še več, v večini primerov so bile vse uporabljene glive, z

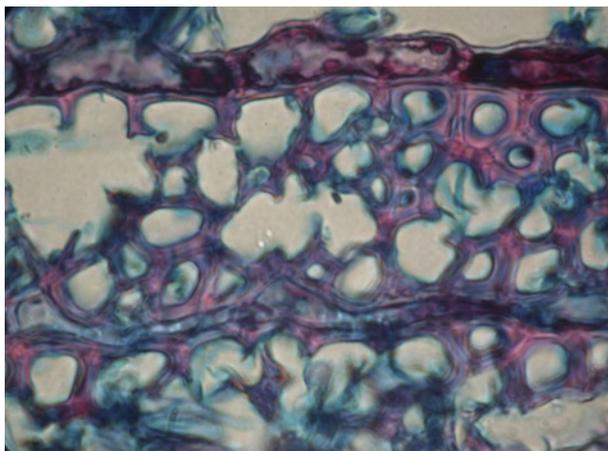
Preglednica 2: Širina branik ter absolutna in relativna izguba mase vzorcev hrastovine (*Quercus* sp.) in primerjalno bukve (*F. sylvatica*) po 16 tednih izpostavitve glivam razkrojevalkam. Statistično primerljive skupine so v navedene v oklepajih.

Gliva	Les	Širina branik (mm)	Absolutna izguba mase (g)	Relativna izguba mase (%)
<i>Daedalea quercina</i>	Hrast 1	0,7	1,23 (d)	30,6 (d)
	Hrast 2	1,6	0,12 (a)	2,7 (a)
	Hrast 3	1,8	0,63 (b)	13,1 (b)
	Hrast 4	3,5	0,51 (b)	9,5 (b)
	Bukev	/	0,93 (c)	22,1 (c)
<i>Antrodia vaillantii</i>	Hrast 1	0,9	0,13 (b)	3,2 (b)
	Hrast 2	1,9	0,05 (a)	0,9 (a)
	Hrast 3	1,8	0,02 (a)	0,4 (a)
	Hrast 4	4,2	0,04 (a)	0,8 (a)
	Bukev	/	0,72 (c)	17,6 (c)
<i>Hypoxyylon fragiforme</i>	Hrast 1	0,7	1,69 (c)	41,9 (c)
	Hrast 2	1,5	0,05 (a)	1,2 (a)
	Hrast 3	1,9	0,52 (b)	10,8 (b)
	Hrast 4	3,2	0,08 (a)	1,6 (a)
	Bukev	/	1,92 (c)	44,7 (c)
<i>Stereum hirsutum</i>	Hrast 1	0,7	0,41 (c)	10,4 (b)
	Hrast 2	1,7	0,05 (a)	1,3 (a)
	Hrast 3	1,6	0,10 (b)	2,1 (a)
	Hrast 4	3,4	0,09 (b)	1,7 (a)
	Bukev	/	1,44 (d)	34,3 (c)
<i>Trametes versicolor</i>	Hrast 1	0,9	0,13 (b)	3,5 (b)
	Hrast 2	1,9	0,05 (a)	1,2 (a)
	Hrast 3	1,8	0,07 (a)	1,5 (a)
	Hrast 4	4,2	0,09 (a)	1,6 (a)
	Bukev	/	1,80 (c)	42,2 (c)

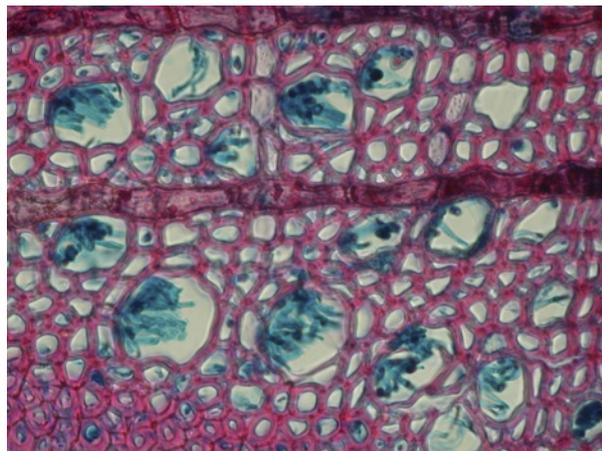
izjemo *T. versicolor*, sposobne kolonizirati les, vendar ga večina ni bila sposobna razgraditi kot naprimer *A. Vaillantii* (Preglednici 2 in 3) (Slika 3).

SKLEPI

Jedrovina hrasta z najožjimi branikami je bila bolj dovzetna za glivni razkroj kot vzorci izdelani iz gostejšega lesa in s povprečno širšimi branikami. Naravna odpornost jedrovine hrasta s povprečno širino branik 0,77 mm in gostoto 549 kg/m³ je primerljiva z



Slika 2: Kolonizirane pore in razkrojene celične stene traheid ter nerazkrojene parenhimske celice trakov po 16 tednih izpostavitve hrastovine z ozkimi branikami glivi *H. fragifome*. Hife so modro obarvane.



Slika 3: Kolonizirane pore, traheide in libriformska vlakna, vendar nerazkrojene celične stene po 16 tednih izpostavitve hrastovine z ozkimi branikami glivi *A. vaillantii*. Hife so modro obarvane.

Preglednica 3: Mikroskopska analiza kolonizacije jedrovine hrasta. Znak +++ pomeni, da smo hife opazili v vseh celicah; ++ najmanj polovica celic je bila koloniziranih; + nekaj celic je bilo koloniziranih, - celice niso bile kolonizirane.

Gliva	Širina branik/ vzorec	Pore	Traheide	Libriformska vlakna	Trakovne parenhimske celice
<i>Daedalea quercina</i>	ozke / Hrast 1	+++	+	+++	-
	široke / Hrast 4	++	+	-	-
<i>Antrodia vaillantii</i>	ozke / Hrast 1	+++	+++	++	-
	široke / Hrast 4	++	+	-	-
<i>Hypoxyylon fragiforme</i>	ozke / Hrast 1	+++	+++	+++	-
	široke / Hrast 4	+++	++	+	-
<i>Stereum hirsutum</i>	ozke / Hrast 1	+++	+++	++	-
	široke / Hrast 4	++	+	+	-
<i>Trametes versicolor</i>	ozke / Hrast 1	++	+	-	-
	široke / Hrast 4	+	-	-	-

odpornostjo bukovine. Poleg širine branik na odpornost hrastovine vplivajo še druge lastnosti, predvsem ekstraktivne snovi.

ZAHVALE

Avtorji se zahvaljujemo Javni agenciji za raziskovalno dejavnost republike Slovenije za finančno podporo programske skupine P4-0015-0481. Za tehnično podporo se zahvaljujemo diplomantu Blažu Fabčiču.

LITERATURA

1. **Aloui F., Ayadi N., Charrier F., Charrier B. (2004)** Durability of European oak (*Quercus petraea* and *Quercus robur*) against white rot fungi (*Coriolus versicolor*): relations with phenol extractives. Holz Als Roh-Und Werkstoff, 62, 4: 286-290
2. **European Committee for Standardization (1995)** Durability of wood and wood-based products - Natural durability of solid wood - Part 2: Guide to natural durability and treatability of selected wood species of importance in Europe, SIST EN 350-2, Brussels
3. **European Committee for Standardization (1996)** Wood preservatives; Determination of the toxic values against wood destroying basidiomycetes cultured an agar medium. SIST EN 113, Brussels
4. **Guilley E., Charpentier J. P., Ayadi N., Snackers G., Nepveu G., Charrier B. (2004)** Decay resistance against *Coriolus versicolor* in Sessile oak (*Quercus petraea* Liebl.): analysis of the between-tree variability and correlations with extractives, tree growth and other basic wood properties. Wood Science and Technology, 38, 7: 539-554
5. **Michell A. J. (1989)** Second derivate FTIR spectra of woods. V: Wood and Cellulosic Chemistry. Hon D.N.S. in Shiraishi N. (Ur.), Marcel Dekker, New York,
6. **Rapp A., Augusta U., Brandt K. (2006)** The natural durability of wood in different use classes: Part II. International Research Group on Wood Preservation, IRG/WP 10598
7. **Rayner A. D. M., Boddy L. (1995)** Fungal Decomposition of Wood. Its Biology And Ecology. John Wiley & Sons, New York,
8. **Tišler V. (1990)** Kemijska analiza lesa (Za interno uporabo). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta oddelek za lesarstvo, 47 str.
9. **Viitanen H., Paajanen L., Saranpaa P., Viitaniemi P. (1997)** Durability of larch (*Larix spp*) Wood against brown-rot fungi. International Research Group on Wood Preservation, IRG/WP 97-10228
10. **Zabel R. A., Morell J. J. (1992)** Wood Microbiology, Decay and its Prevention. Academic press, San Diego

OPTIMIZACIJA UTEKOČINJANJA BIOMASE Z GLICEROLOM IN KARAKTERIZACIJA NASTALIH HLAJNIH PRODUKTOV

Optimisation of biomass liquefaction with glycerol and characterisation of the formed volatile products

Izvleček: V članku je predstavljena optimizacija utekočinjanja smrekovine, celulignina, celuloze in slame v reakcijskem topilu glicerolu ob prisotnosti H_2SO_4 kot katalizatorja. Optimalni čas utekočinjanja smo določali v reaktorski posodi pri temperaturi 180 °C in pri atmosferskem tlaku. Utežno razmerje med biomaso in glicerolom je bilo 1:3. Sestavo destilatov, ki so nastali med reakcijo utekočinjanja biomase, smo spremljali s plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo (GC-MS). Ugotovili smo, da je z glicerolom možno utekočiniti vse našete tipe biomase. V destilatih smo identificirali furfural, ki lahko predstavlja temeljno substanco za sintezo najrazličnejših derivatov. S tem odpiramo novo pot učinkovitejši uporabi produktov utekočinjanja.

Ključne besede: biomasa, utekočinjen les, GC-MS, furfural, optimizacija procesa

Abstract: In this research we optimized liquefaction of spruce wood, cellulignin, cellulose and straw in the reaction solvent glycerol with a sulfuric acid as a catalyst. Optimal liquefaction times were determined at 180 °C under atmospheric pressure. The weight ratio between biomass and glycerol was 1:3. During biomass liquefaction reactions volatile products were formed and analyzed with a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer (GC-MS). It was found out that all types of biomass could be liquefied in glycerol. In the volatile products we identified furfural, which could be used as an industrial chemical intermediate. With this finding a new way is opened for more effective uses of liquefaction products.

Keywords: biomass, liquefied wood, GC-MS, furfural, process optimisation

UVOD

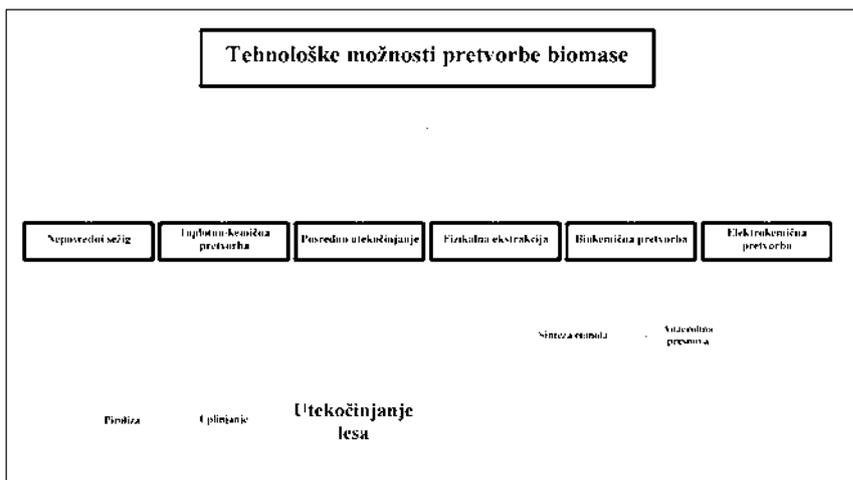
Lesno biomaso je možno z različnimi tehnološkimi procesi pretvoriti v različne oblike snovi, odvisno od karakteristik vhodnega materiala in oblike energije, ki jo želimo pridobiti (plini, tekoča ali trdna goriva). Trdno biomaso pa pretvarjamo v druge oblike tudi, kadar jo uporabimo kot trajnosten in obnovljiv vir surovin za izdelavo raznovrstnih materialov in izdelkov. Možnosti pretvorbe biomase so na splošno razdeljene v šest kategorij (slika 1). Najpomembnejša načina pretvorbe sta biokemični in toplotno-kemični (Kücü in Demirbas, 1997).

Utekočinjanje lesa je ireverzibilna reakcija biomase - lesa oz. lesnih polimerov z organskim ali anorganskim topilom ob prisotnosti katalizatorja pri zmerni temperaturi (od 120 °C do 250 °C), največkrat pri atmosferskem tlaku. Pri tem porušimo in spremenimo molekularno strukturo lesa. Kadar želimo spremeniti lesne polimere v uporabne tekoče produkte in jih uporabiti kot surovino za sintezo novih večkomponentnih biopolimernih materialov, uporabimo solvolitično utekočinjanje (Kurimoto in sod., 1999, 2001; Rezzoug in Capart, 2002; Lee in sod., 2005). Reakcijski mediji, ki se največkrat uporabljajo pri solvolitičnem utekočinjanju biomase, so:

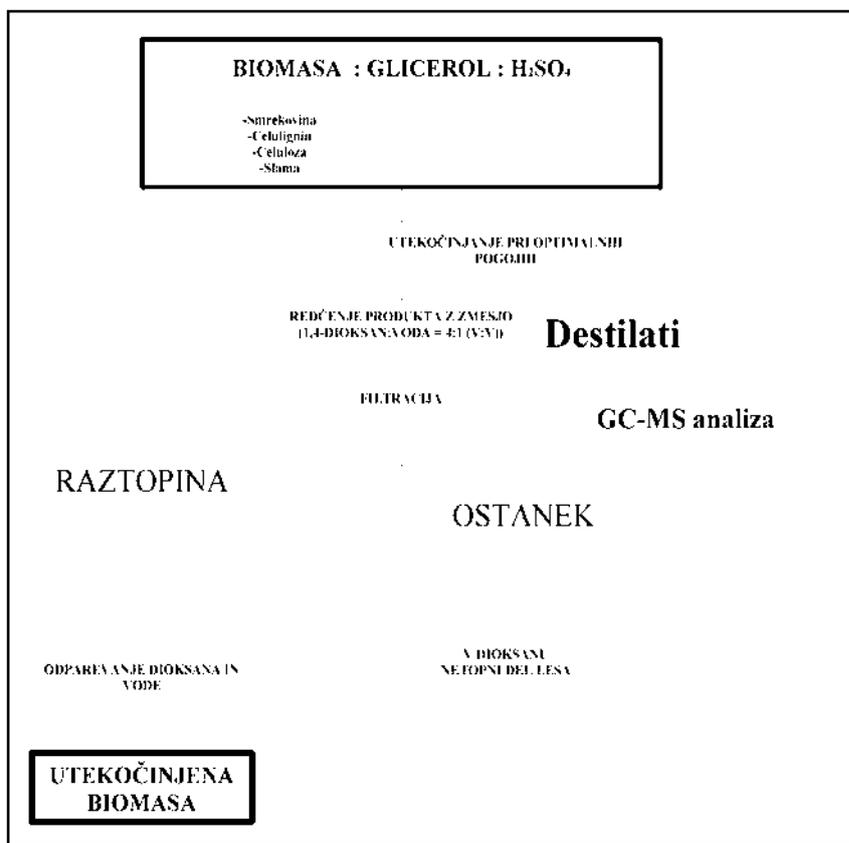
- ▶ fenoli (Acemioglu in Alma, 2002; Alma in Basturk, 2006, Maldas in Shiraishi, 1997; Mun in Jang, 2009),
- ▶ etilenkarbonat (Mun in sod., 2001; Yamada in Ono, 1999),
- ▶ ionske tekočine (Honglu in Tiejun, 2006),

* Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, e-pošta: franc.budija@bf.uni-lj.si

** Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Aškerčeva 5, 1000 Ljubljana



Slika 1: Tehnološke možnosti pretvorbe biomase



Slika 2: Shematični prikaz priprave utekočinjene biomase in analize hlapnih produktov utekočinjanja

- ▶ estri dikarboksilnih kislin (Wei in sod., 2004),
- ▶ polihidroksi alkoholi.

POLIHIDROKSI ALKOHOLI

Z alifatskimi alkoholi (C1-C7) ali polioli lahko utekočimo osnovne lesne polimere lignin, celulozo in hemizeculoze. Različni avtorji so za utekočinjanje mnogih vrst biomase uporabili različne polihidroksi alkohole in zmesi, npr.: zmes PEG 400 in glicerola (Kurimoto in sod., 1999; Lee in sod., 2002; Kobayashi in sod., 2004) ali dietilen glikol (Budija in sod., 2009). Utekočinjena biomasa, pripravljena na tak način, je zmes razgradnih produktov komponent biomase (lignina, celuloze, polioz, ekstraktivov), kakor tudi nerazgrajenih sestavin in uporabljenega alkohola. Sestava utekočinjene biomase je zato zelo kompleksna, posledično pa so težavne tudi sinteze novih snovi iz utekočinjenih produktov. Reakcije potekajo predvsem na reaktivnih hidroksilnih skupinah (–OH). Tako lahko npr. poliuretane pripravimo z reakcijo utekočinjenega lesa z različnimi di- ali poli- izocianati. V primeru izdelave poliesterov, utekočinjeno biomaso kombiniramo z dvobaznimi kislinami ali njihovimi anhidridi. Reakcija z različnimi bisfenoli vodi do nastanka poliepoksidnih smol. Polimere, ki smo jih sintetizirali iz utekočinjene biomase, lahko uporabimo za izdelavo lepil, površinskih premazov, izolacijskih pen in podobno. Vendar pri reakciji utekočinjanja nastajajo tudi stranski produkti (slika 2), o katerih sestavi in možni uporabi podatkov v literaturi nismo uspeli zaslediti. Zato je bil namen raziskave, ki je predstavljena v tem članku, razen optimizacije utekočinjanja različnih vrst biomase tudi identifikacija hlapnih produktov utekočinjanja in ocena možnosti njihove uporabe.

MATERIALI IN METODE

UTEKOČINJANJE BIOMASE

Topolovino, smrekovino, celulignin, celulozo (celulozna vata (25 cm × 20 cm) proizvajalca Tosama) in pšenično slamo, smo utekočinjali v 1000 mL reaktorski posodi (T= 180 °C), v katero smo natehtali ustrezne količine reaktantov, katerih razmerje smo optimirali v preliminarnih raziskavah. Uporabljen celulignin imenujemo drugače kostanj. Ker v industriji še niso našli pravih odgovorov, kako ga učinkoviteje uporabiti v druge namene kot za kurjenje, smo ga uporabili kot surovino za utekočinjanje. Predhodno smo biomaso zmelili z rezalnim mlinom za les SM 2000, proizvajalca Retsch. Po mletju smo biomaso sejali v vertikalnem laboratorijskem sejalniku. Odločili smo se, da bomo uporabili le frakcijo 0,237 mm, ker je ta predstavljala večinski delež biomase. Za utekočinjanje biomase smo uporabili 100 g biomase, 300 g glicerola ter 3 % katalizatorja – koncentrirane žveplove kisline, glede na maso glicerola. Reaktorsko posodo z reakcijsko zmesjo smo segrevali v oljni kopeli s silikonskim oljem. Reakcijsko zmes smo na začetku reakcije mešali ročno s stekleno palčko, nato pa smo mešanje izvajali z mešalom IKA RW20 Digital (310 vrtljajev/min). Kemikalije, ki smo jih uporabili, so bile čistoče p.a.

DOLOČEVANJE IZKORISTKA UTEKOČINJANJA

Optimalno temperaturo reakcije 180 °C in razmerje med glicelorum in biomaso smo določili v preliminarnih raziskavah. Zaradi časovne in materialne potratnosti filtracije za določanje izkoristka utekočinjanja smo optimalni čas reakcije ocenili s sprotnim jemanjem manjših količin produkta med potekom reakcije ter delež utekočinjenega odvzetega produkta (DUP) izračunali po enačbi 1. Pri ocenjenem optimalnem času reakcije je tudi dosežen maksimalni izkoristek reakcije.

$$DUP = \left(1 - \left(\frac{W_1 - W_2}{W_4} \right) \right) \times 100\% \quad 1$$

- W_1 Masa suhega ostanka s filtrirnim papirjem (g)
 W_2 Masa suhega filtrirnega papirja (g)
 W_4 Masa odvzetega produkta (g)
 DUP Delež utekočinjenega odvzetega produkta (%)

DOLOČITEV Hlapnih spojin v destilatih, ki smo jih dobili pri utekočinjanju, s plinsko kromatografijo z masno spektrometrijo (GC-MS)

Hlapne spojine smo določevali v destilatih, ki so nastajali med dveurno reakcijo utekočinjanja topolovine, smrekovine, celuloze in slame (preglednica 1). Destilate smo

Preglednica 1: Destilati, analizirani z GC-MS

Zmesi, katerih destilate smo dobili po utekočinjanju ter jih nato analizirali
Glicerol + H ₂ SO ₄
Topolovina + glicerol + H ₂ SO ₄
Smrekovina + glicerol + H ₂ SO ₄
Celuloza + glicerol + H ₂ SO ₄
Slama + glicerol + H ₂ SO ₄

med reakcijo utekočinjanja zbirali v stekleni čaši, ki smo jo postavili pod kondenzator (hladilnik), ki je bil neposredno povezan s pokrovom reaktorske posode. Po končani reakciji smo nastale destilate stehali. Določili smo povprečni delež nastalih destilatov glede na skupno maso reaktantov pred reakcijo.

Za določitev hlapnih spojin v destilatih smo uporabili plinski kromatograf Agilent Technologies 7890 (Agilent, ZDA), sklopljen s kvadrupolnim masnim spektrometrom Agilent Technologies 5975C (slika 3). Uporabili smo kolumno Agilent HP5-MS (dolžina 30 m, notranji premer 0,25 mm, debelina stacionarne faze 0,25 μm), in mobilno fazo helij (99,999 %) s pretokom 1,7 mL min⁻¹. Za ločitev spojin smo uporabili naslednji temperaturni program: 3 min pri 50 °C, segrevanje do 120 °C s hitrostjo 15 °C min⁻¹, segrevanje do 240 °C s hitrostjo 50 °C min⁻¹, nato konstantna temperatura 15 min. Temperatura injektorja je bila 250 °C, El ionizacija s 70 eV je potekala pri 230 °C. Temperatura vmesnika je bila 280 °C, temperatura kvadrupola pa 150 °C. Značilne vrhove na kromatogramih smo identificirali s primerjavo masnih spektrov destilatov z referenčnimi spektri v knjižnici spektrov Wiley.



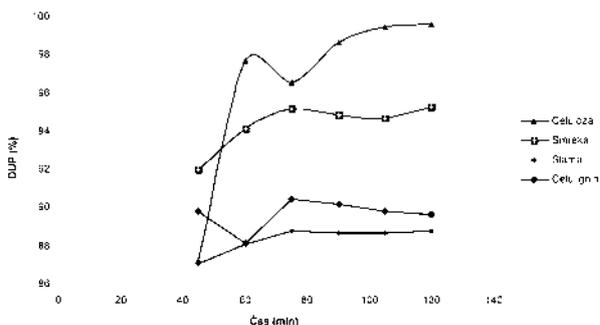
Slika 3: Plinski kromatograf Agilent Technologies 7890 (Agilent, ZDA), sklopljen s kvadrupolnim masnim spektrometrom Agilent Technologies 5975C (Agilent, ZDA)

REZULTATI IN RAZPRAVA

DOLOČEVANJE OPTIMALNEGA ČASA UTEKOČINJANJA SMREKOVINE, CELULIGNINA, CELULOZE IN SLAME Z GLICEROLOM V REAKTORSKI POSODI PRI KONSTANTNI TEMPERATURI REAKCIJSKE ZMEŠI 180 °C IN KONSTANTNEM UTEŽNEM RAZMERJU MED BIOMASO IN GLICEROLOM 1:3.

Smrekovino, celulignin, celulozo in slamo smo utekočinjali pri optimalni temperaturi, ki smo jo izbrali za utekočinjanje topolovine (180 °C). Dodatek H_2SO_4 je v vseh primerih znašal 3 utežne % glede na maso glicerola. Ugotovili smo, da je vse našete vrste biomase z glicerolom možno utekočiniti z dokaj visokim DUP (nad 86 %) v času 45 min. Najvišje vrednosti DUP smo dobili pri utekočinjanju celuloze v reakcijskem času med 105 min in 120 min in sicer 99 % (slika 4). Rezultati DUP pri slami in celuligninu se med seboj niso bistveno razlikovali (89 % in 90 % po 120 min). Vrednosti DUP pri smrekovini so približno za 5 % višje kot pri celuligninu in slami. Yamada in sodelavci (2001) so utekočinjali α -celulozo v glicerolu pri 150 °C ter ugotovili, da je potek utekočinjanja pri tej temperaturi počasen. Po 45 min je bil namreč izkoristek približno 50 %. Tudi avtorja Yamada in Ono, (2001) poročata o težavnosti/počasnosti utekočinjanja celuloze v etilen glikolu. V našem primeru nismo zasledili težav z utekočinjanjem celuloze. Najverjetneje je razlog za to višja temperatura reakcijske zmesi ter dejstvo, da smo namesto etilen glikola uporabili glicerol.

Meritve deleža utekočinjanja (DUL, kot je definiran v Budija in sod. (2009)) smrekovine, celulignina, celuloze in slame nismo izvajali zaradi izredno visoke časovne in materialne potratnosti, vendar, glede na podobne rezultate DUP, ki smo jih dosegli pri utekočinjanju topolovine z glicerolom pri enakih razmerah, sklepamo, da bi bil delež utekočinjanja pri tej preučevani biomasi najverjetneje enak ali celo višji od 89 % (Budija in sod., 2009).



Slika 4: Delež utekočinjenega produkta (DUP) smrekovine, celulignina, celuloze in slame

SESTAVA Hlapnih spojin v destilatih, DOLOČENA Z GC-MS

Iz preglednice 2 je razvidno, da je največ destilata nastalo pri reakciji topolovine, najmanj pa pri utekočinjanju celuloze. Opazimo tudi, da ima uporabljena kislina sposobnost razgraditi tudi glicerol, na podlagi dejstva, da je pri reakciji nastalo 13 % destilatov glede na skupno maso reaktantov. Sestavo destilatov (hlapnih spojin), ki so nastali med reakcijami, smo določevali z GC-MS. Vsak vrh na kromatogramu predstavlja posamezno spojino, ki se je ločila od zmesi hlapnih spojin (destilata). Na sliki 5 je prikazan kromatogram hlapnih produktov reakcije glicerola s H_2SO_4 . Izmed vseh opaženih vrhov smo identificirali samo vrh, značilen za glicerol, v območju 9–11 min ter vrh pri retencijskem času 9,1 min ki najverjetneje pripada spojini 4-hidroksi-3-metilacetofenonu. Izvora te spojine ne poznamo.

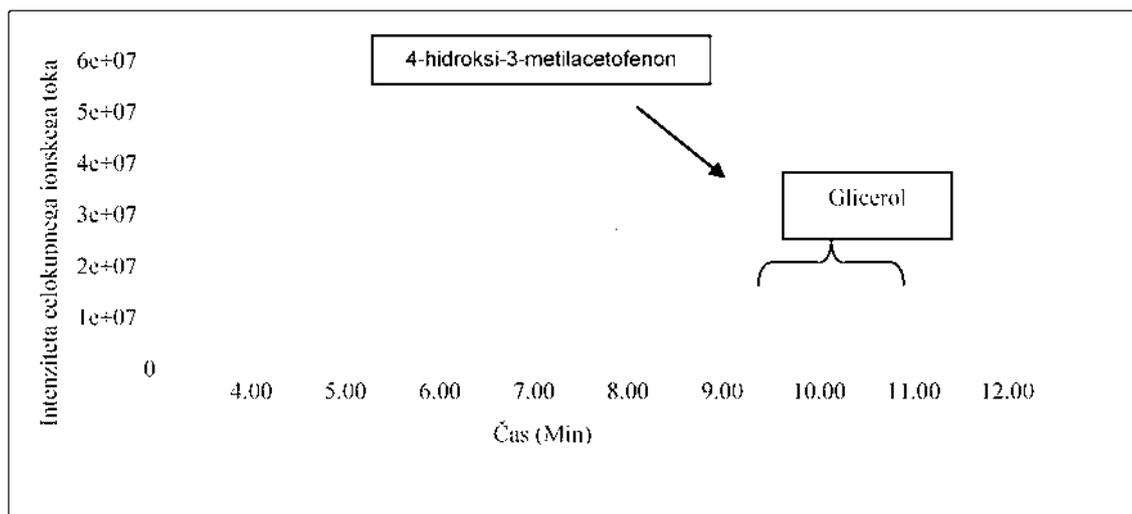
Ko smo v reakcijo vključili topolovino (slika 6), smrekovino (slika 7), celulozo (slika 8) ali slamo, smo identificirali nekatere identične hlapne spojine. Vrh pri retencijskem času 5 min predstavlja furfural (slika 9), vrhovi v območju od 9 do 11 min pa predstavljajo glicerol. Detektirali smo tudi nekaj novih neznanih vrhov, katerih položaji v kromatogramih se razlikujejo v odvisnosti od uporabljene biomase oz. snovi, ki smo jo utekočinjali (glicerol, topolovina, smrekovina, celuloza, slama). Tako smo npr. opazili intenziven vrh neznan pri času 6 min, ki je bil značilen samo za destilat zmesi glicerol - H_2SO_4 (slika 5) in ga v ostalih destilatih nismo zaznali.

Nastanek furfurala (2-furankarboksialdehid), (slika 9), ter vrh pri času 5 min na kromatogramih na slikah 6–8 je povezan s kemijsko reakcijo hidrolize pentozanov hemiceluloz (Khabarov in sod., 2006). Polisaharidi pri temperaturi utekočinjanja 180 °C in prisotnosti H_2SO_4 hidrolizirajo in nato z dehidracijo zreagirajo v furfural (enačba 2).

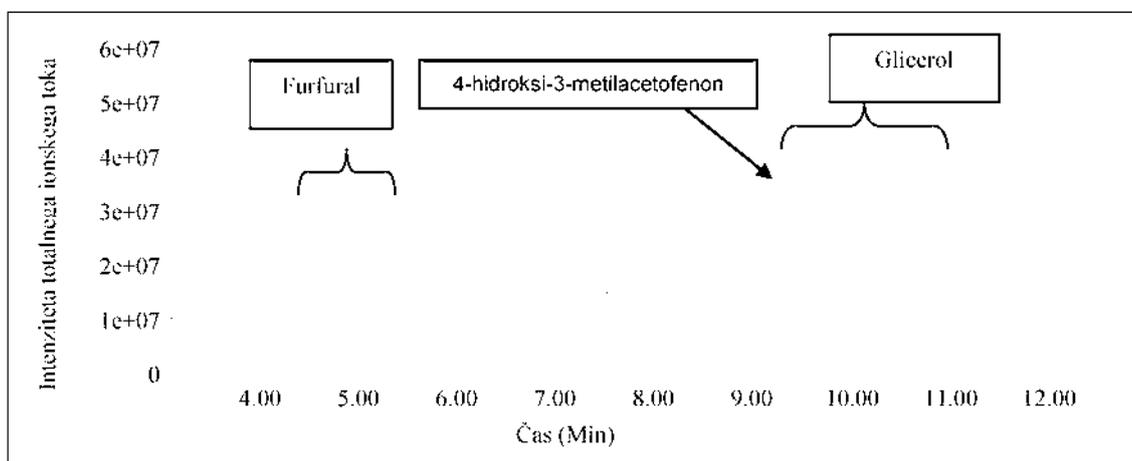


Preglednica 2: Povprečni delež nastalih destilatov glede na skupno maso

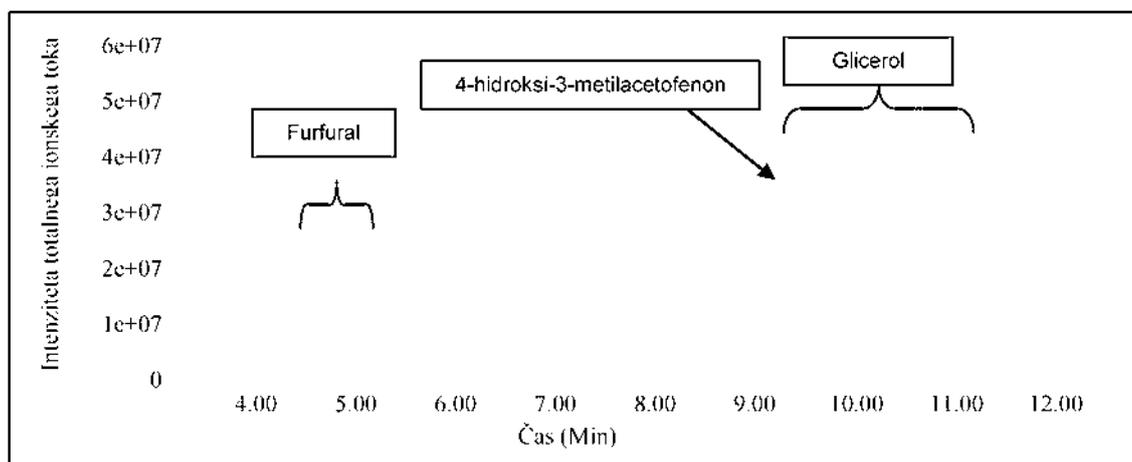
	Povprečni delež nastalih produktov glede na skupno maso
Glicerol+ H_2SO_4	13 %
Topolovina+ H_2SO_4	17 %
Smrekovina + H_2SO_4	16 %
Celuloza+ H_2SO_4	10 %
Slama+ H_2SO_4	13 %



Slika 5: Kromatogram destilata, ki nastaja med reakcijo glicerola in H_2SO_4



Slika 6: Kromatogram destilata, ki je nastal med utekočinjanjem zmesi glicerol + topolovina + H_2SO_4



Slika 7: Kromatogram destilata, ki je nastal pri utekočinjanju zmesi glicerola, smrekovine in H_2SO_4

180 °C možno že v 45 minutah z dokaj visokim izkoristkom (nad 85 %) utekočiniti vse našete biomase. Optimalni čas reakcije je znašal 105 min. V hlapnih produktih, ki so nastali med postopkom utekočinjanja biomase z glicerolom, smo identificirali spojino furfural kot hlapni razgradni produkt polisaharidov. Furfural lahko uporabimo za sintezo najrazličnejših spojin in tako predstavlja nadomestek spojinam, ki so derivat nafte.

ZAHVALA

Avtorji se zahvaljujejo Javni agenciji Republike Slovenije za raziskovalno dejavnost za finančno podporo v okviru projektov in programov L4-2144-0481, J4-2177-0481 in P4-0015-0481.

LITERATURA

1. **Acemioğlu B., Alma M.H. (2002)** Kinetics of wood phenolysis in the presence of HCl as catalyst. *Journal of Applied Polymer Science*, 85: 1098-1103
2. **Alma M.H., Basturk M.A. (2006)** Liquefaction of grapevine cane (*Vitis vinifera* L.) waste and its application to phenol-formaldehyde type adhesive. *Industrial Crops and Products*, 24: 171-176
3. **Budija F., Kričej B., Petrič M. (2009)** Liquefied wood for a wood coating. V: 2nd Nordic Wood Biorefinery Conference Helsinki, Finland 2-4 September (poster-neobjavljeno)
4. **Honglu X., Tiejun S. (2006)** Wood liquefaction by ionic liquids. *Holzforschung*, 60: 509-512
5. **Khabarov Y.G., Kamakina N.D., Gusakov L.V., Veshnyakov V.A. (2006)** A New Spectrophotometric Method for Determination of Furfural and Pentoses. *Russian Journal of Applied Chemistry*, 79: 103-106
6. **Kobayashi M., Asano T., Kajiyama M., Tomita B. (2004)** Analysis on residue formation during wood liquefaction with polyhydric alcohol. *Journal of Wood Science*, 50: 407-414
7. **Küçük M.M., Demirbas A. (1997)** Biomass conversion processes. *Energy Conversion and Management*, 38: 151-165
8. **Kurimoto Y., Doi S., Tamura Y. (1999)** Species effects on wood-liquefaction in polyhydric alcohols. *Holzforschung*, 53: 617-622
9. **Kurimoto Y., Koizumi A., Doi S., Tamura Y., Ono H. (2001)** Wood species effects on the characteristics of liquefied wood and the properties of polyurethane films prepared from the liquefied wood. *Biomass and Bioenergy*, 21: 381-390
10. **Lee S.H., Teramoto Y., Shiraishi N. (2002)** Biodegradable polyurethane foam from liquefied waste paper and its thermal stability, biodegradability, and genotoxicity. *Journal of Applied Polymer Science*, 83: 1482-1489
11. **Lee S.H., Ohkita T., Teramoto Y. (2005)** Polyol Recovery from Biomass-Based Polyurethane Foam by Glycolysis. *Journal of Applied Polymer Science*, 95: 975-980
12. **Maldas D., Shiraishi N. (1997)** Liquefaction of biomass in the presence of phenol and H₂O using alkalies and salts as the catalyst. *Biomass and Bioenergy*, 12: 273-279
13. **Mun S.P., Hassan E.B.M., Yoon T.H. (2001)** Evaluation of Organic Sulfonic Acids as Catalyst during Cellulose Liquefaction Using Ethylene Carbonate. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 7: 430-434
14. **Mun S.P., Jang J.P. (2009)** Liquefaction of cellulose in the presence of phenol using p-toluene sulfonic acid as a catalyst. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 15: 743-747
15. **Rezzoug S.A., Capart R. (2002)** Liquefaction of wood in two successive steps: solvolysis in ethylene-glycol and catalytic hydrotreatment. *Applied Energy*, 72: 631-644
16. **Yamada T., Ono H. (1999)** Rapid liquefaction of lignocellulosic waste by using ethylene carbonate. *Bioresource Technology*, 70: 61-67
17. **Yamada T., Ono H. (2001)** Characterization of the products resulting from ethylene glycol liquefaction of cellulose. *Journal of Wood Science*, 47: 458-464
18. **Yamada T., Hu Y., Ono H. (2001)** Condensation reaction of degraded lignocellulose during wood liquefaction in the presence of polyhydric alcohols. *Nippon Setchaku Gakkaishi*, 37: 471-478
19. **Wei F., Cheng, H. L., Yu J. (2004)** Synthesis and properties of polyurethane resins based on liquefied wood. *Journal of Applied Polymer Science*, 92: 351-356

MIKOREMEDIACIJA LINDANA V TEKOČIH KULTURAH GLIV *PLEUROTUS OSTREATUS* IN *HYPOXYLON FRAGIFORME*

Mycoremediation of lindane in liquid cultures
of *Pleurotus ostreatus* and *Hypoxylon fragiforme*

Izvleček: Mehanizem, s katerim glive bele trohnobe razgrajujejo lignin, omogoča tudi razgradnjo izjemno širokega spektra okoljskih onesnaževal. V raziskavi smo proučevali razgradnjo kloriranega organskega insekticida lindana z dvema vrstama gliv bele trohnobe, bukovim ostrigarjem (*Pleurotus ostreatus*) in ogljeno kroglico (*Hypoxylon fragiforme*). Kulture gliv so različno dolgo rasle v tekočem gojišču z dodanim lindanom. Lindan smo iz tekočih kultur gliv ekstrahirali z dvema različnima metodama ter ga določali s plinsko kromatografijo. Koncentracija lindana je s časom izpostavitve kulturam gliv padala. Največjo razgradnjo lindana (več kot 90 %) smo pri obeh vrstah ugotovili po 21 dneh izpostavitve lindana kulturi gliv. Odstranitev lindana iz tekočih kultur gliv se je najverjetneje zgodila zaradi razgradnje lindana z glivnimi encimi, do adsorpcije lindana na biomaso pa pri teh vrstah gliv verjetno ni prišlo.

Ključne besede: mikoremediacija, lindan, lesne glive, glive bele trohnobe, *P. ostreatus*, *H. fragiforme*, adsorpcija, plinska kromatografija

Abstract: White rot fungi have the ability to completely degrade lignin. The same mechanism enables them to biodegrade a wide variety of environmental pollutants. The ability of two white-rot fungi (*Pleurotus ostreatus* and *Hypoxylon fragiforme*) to degrade an organochlorine insecticide, lindane, in liquid cultures was studied. Lindane was exposed to fungal liquid cultures for various time intervals and its extraction was done by using two different methods. The residual content determination of lindane was done by gas chromatography. The rate of degradation increased with the incubation period of lindane in fungal liquid cultures. The highest rate of degradation with both fungi was measured after 21 days of incubation. Lindane removal from the culture media presumably occurred due to degradation and not via adsorption onto the fungal mycelium.

Keywords: mycoremediation, lindane, white rot fungi, *P. ostreatus*, *H. fragiforme*, adsorption, gas chromatography

UVOD

Zaradi človekove dejavnosti ter pretirane in nepravilne uporabe je v okolju prisotnih več deset tisoč različnih sintetičnih kemikalij. Snovi, ki so v okolju prisotne v mnogo

višjih koncentracijah od običajnih ali pa so tuje celotnemu biološkemu sistemu in v naravi niso obstajale, preden jih je sintetiziral človek, imenujemo ksenobiotiki. Od teh so mnogi toksični, nekateri pa lahko takšni postanejo kot posledica biotransformacije. Za mnoge ksenobiotike učinki na zdravje ljudi še niso raziskani.

V okolju so organske kemikalije izpostavljene encimatskim in neencimatskim reakcijam. Abiotski dejavniki zelo redko povzročijo spremembe v kemijski strukturi onesnaževala. Nasprotno pa se lahko mnogi ksenobiotiki v naravi razgra-

* Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, e-pošta: ajda.ulcnik@bf.uni-lj.si

** Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Aškerčeva cesta 5, 1000 Ljubljana

*** Inštitut za lesarstvo in trajnostni razvoj, raziskovanje, razvoj, svetovanje in izobraževanje d.o.o., Celovška cesta 268, 1000 Ljubljana

dijo s pomočjo mikroorganizmov in gliv. Uporabo bioloških sistemov ali organizmov za razgradnjo ali odstranitev onesnaževal iz okolja imenujemo bioremediacija. Pri tem biotehnološkem procesu organizem (mikroorganizem, gliva, rastlina ali njihovi encimi) onesnaževalo porablja kot vir hrane, ga kometabolizira ali pa kopiči (Alexander, 1981).

Z bioremediacijo količino onesnaževal znižamo na nezaznavno, netoksično ali sprejemljivo vrednost. Namen bioremediacije je popolna razgradnja (mineralizacija) organskih onesnaževal do CO_2 , ter v primeru kovin transformacija v manj toksične oblike ali njihova odstranitev s sorpcijo (Pointing, 2001). Pri razgradnji onesnaževal navadno pride do razstrupljanja, lahko pa nastanejo tudi strupeni razgradni produkti.

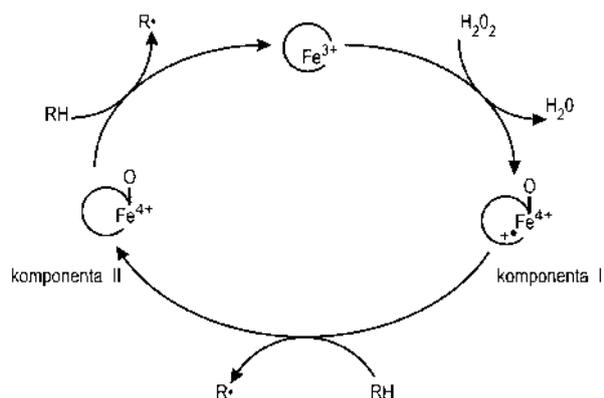
Bioremediacijo lahko izvajamo z različnimi organizmi (Hamby, 1996; Pointing, 2001). Poleg bakterij in rastlin (fitoremediacija) lahko pri čiščenju okolja zelo uspešno uporabljamo tudi glive (mikoremediacija). Lesne glive imajo namreč veliko sposobnost razgradnje izjemno širokega nabora ksenobiotikov.

Glede na poškodbe lesa delimo lesne glive na glive bele in rjave trohnobe. Glive rjave trohnobe so sposobne razgrajevati le polisaharide v olesneli celični steni, pri čemer se lignin le delno modificira. Glive bele trohnobe pa lahko razgradijo vse glavne komponente lesa – celulozo, hemicelulozo ter tudi lignin, ki je sicer izjemno odporen na biološko in kemično razgradnjo. Glive bele trohnobe razgrajujejo lignin selektivno ali pa simultano. Selektivne delignifikatorke naprej razgrajujejo lignin in hemicelulozo ter šele nato tudi celulozo, simultane delignifikatorke pa hkrati razgrajujejo vse tri glavne komponente rastlinske celične stene (Zabel in Morell, 1992; Martínez in sod., 2005). Poleg razgradnje lignina so glive bele trohnobe sposobne razgradnje organskih ksenobiotikov, ki so strukturno podobni ligninu (Bumpus in sod., 1985; Hammel, 1995; Reddy, 1995).

RAZGRADNJA LIGNINA

Lignin je kompleksen heteropolimer, sestavljen iz treh osnovnih fenilpropanskih podenot, kumaril, koniferil in sinapil alkohola. Raznolikost ligninskih podenot in vezi med njimi zahteva dokaj nespecifičen sistem razgradnje, ki ga povzročajo glive bele trohnobe. Razgradnja lignina z glivami bele trohnobe je oksidativen aeroben proces. Ker je polimer lignina prevelik za endocitozo, je njegova razgradnja zunajcelična (Aust, 1995; Hammel, 1995).

Glive bele trohnobe razgrajujejo lignin z zunajceličnimi encimi, od katerih so najpomembnejši lignin peroksidaze (LiP), od mangana odvisne peroksidaze (MnP) in lakaze (Lac). Razgradnja lignina poteka z oksidacijo, ki jo katalizirajo omenjeni encimi, pri čemer nastajajo kationski prosti ra-



Slika 1. Katalični cikel LiP (Aust, 1995).

diki ligninskih podenot (Kirk in Farrel, 1987; Hammel, 1995; Reddy, 1995). Ti so nestabilni in reaktivni ter povzročijo številne spontane cepitve ligninske makromolekule v manjše enote. Mehanizem oksidacije z lignin peroksidazami je prikazan na sliki 1. Podoben mehanizem, ki vključuje dve enoelektronski oksidaciji substrata, ustreza tudi delovanju MnP, lakaze pa katalizirajo enoelektronsko oksidacijo substrata.

Ligninolitični encimi gliv bele trohnobe nastajajo v sekundarnem metabolizmu ob pomanjkanju hranil, predvsem dušika in ogljika (Bumpus in sod., 1985). Novejše raziskave kažejo, da lahko pride do izražanja ligninolitičnih encimov tudi v začetni fazi glivne okužbe lesa, ko ima gliva na voljo še dovolj hranil (Janse in sod., 1998; Messner in sod., 1998; Pointing, 2001).

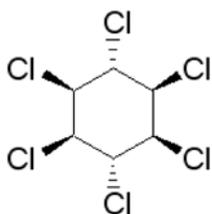
Oksidaze, ki katalizirajo razgradnjo lignina, so prevelike za prehajanje v olesnelo celično steno, zaradi česar delujejo predvsem na njeni površini. Ker pa naj bi razgradnja lignina v notranjosti celične stene potekala tudi v primerih, ko celična stena še ni razgrajena do te mere, da bi vanjo lahko vstopali encimi, je Hammel (1997) predlagal posredno delovanje peroksidaz preko oksidacij substratov z majhno relativno molekulsko maso. Ti substrati naj bi delovali kot mediatorji med encimi in njihovimi substrati (Candeias in Harvey, 1995). Eden izmed možnih kandidatov za takšne substrate je veratril alkohol (3,4-dimetoksibenzil alkohol), ki je sekundarni metabolit glive in ga glive proizvajajo ob pomanjkanju hranil.

Z glivami bele trohnobe so v številnih raziskavah uspešno razgradili različna sintetična barvila, klorirane fenole, klorirane pesticide, policiklične aromatske ogljikovodike, poliklorirane bifenile ter druge kemijsko podobne snovi (Reddy, 1995; Gadd, 2001; Singh, 2006; Quintero in sod., 2008).

LINDAN

Lindan (1 α ,2 α ,3 β ,4 α ,5 α ,6 β -heksaklorocikloheksan, γ -HCH) (slika 2) je kloriran organski insekticid, ki se je v preteklosti

uporabljal za zatiranje škodljivcev v kmetijstvu ter konzervatorstvu, kot zaščitno sredstvo za les ter za odpravljanje parazitov pri ljudeh in živalih. Uvrščamo ga med obstojna organska onesnaževala, za katera so značilni zelo dolgo zadrževanje v okolju, prenašanje na velike razdalje, bioakumulacija v živih organizmih ter škodljivi učinki za ljudi in živali (UNEP, 2010). Lindan se v organizmih zaradi nepolarosti akumulira predvsem v maščobnem tkivu (UNEP, 2007; Zucchini in sod., 2009), deluje pa kot živčni strup. Pri ljudeh povzroča nevrološke bolezni, pri laboratorijskih živalih pa povzroča napake v razvoju ter raka na jetrih (Siddique in sod., 2002). Uporaba lindana je danes v mnogih državah prepovedana, maja 2009 pa je bil lindan dodan na seznam prepovedanih kemikalij, ki so zajete v Stockholmski konvenciji o obstojnih organskih onesnaževalih. Stockholmsko konvencijo, katere cilj je prepovedati ali omejiti proizvodnjo ali uporabo obstojnih organskih onesnaževal, je leta 2004 podpisala tudi Republika Slovenija (Urad RS za kemikalije, 2010).



Slika 2. Lindan (γ -heksaklorocikloheksan, γ -HCH).

Glive bele trohnobe so v mnogih raziskavah uspešno razgradile različna obstojna organska onesnaževala, vključno z lindanom. Razgradnja ksenobiotikov z glivami bele trohnobe je bila najbolj preučevana z glivo *Phanerochaete chrysosporium*, za katero so Bumpus in sodelavci (1985) poročali o več kot 90 % razgradnji lindana v tekočih kulturah. Pri mikoremediaciji organskih pesticidov se sicer pojavlja vprašanje, ali med postopkom resnično pride do razgradnje pesticida ali je njegova zmanjšana koncentracija v mediju le posledica adsorpcije na različne površine, predvsem na micelij oziroma biomaso.

V pričujoči raziskavi smo proučevali sposobnost dveh vrst gliv bele trohnobe za mikoremediacijo lindana v odvisnosti od časa izpostavitve lindana tekočim kulturam gliv. Na podlagi primerjav izmerjenih deležev razgrajenega lindana, pridobljenih z dvema metodama ekstrakcije lindana iz tekočih glivnih kultur, smo ugotavljali, ali je odstranitev lindana posledica adsorpcije ali razgradnje z ligninolitičnimi encimi.

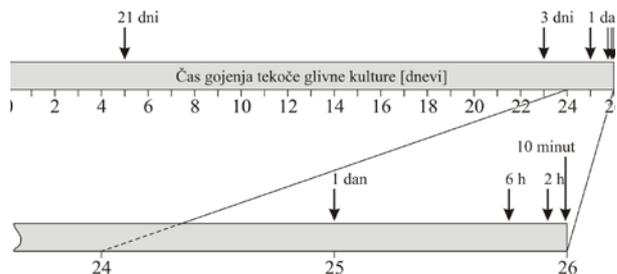
MATERIALI IN METODE

Lindan smo za različno dolga časovna obdobja izpostavili bukoveму ostrigarju (*Pleurotus ostreatus*, Plo5, sev

izoliran iz hloda smreke 1998, Ljubljana) in ogljeni kroglici (*Hypoxylon fragiforme*, ZIM L108). Glivo bele trohnobe *H. fragiforme* uvrščamo v skupino zaprtotrošnic (*Ascomycotina*), gliva *P. ostreatus* pa spada v skupino prostotrošnic (*Basidiomycotina*). Kulture micelija smo vzeli iz Zbirke industrijskih organizmov (ZIM), ki jo hranimo na Oddelku za lesarstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani v Delovni skupini za patologijo in zaščito lesa (Raspor in sod., 1995). Kulture gliv smo gojili v tristomililitrskih erlenmajericah, napolnjenih s 50 ml tekočega gojišča po Hadarju (Hadar in Cohen-Arazi, 1986), ki smo mu dodali $MnSO_4 \cdot H_2O$ (2 mM), pH gojišča pa smo umerili na 4,5 (Vidic in sod., 2008). Štiri dni pred dodatkom lindana smo v gojišče dodali veratril alkohol (koncentracija v gojišču 2 mM), s čimer smo vzpodbudili izražanje ligninolitičnih encimov (Faison in Kirk, 1985; Faison in sod., 1986; Jaouani in sod., 2006).

Inokulat za tekoča gojišča smo vzgojili na krompirjevem dekstroznem agarju (PDA) (DIFCO Laboratories, ZDA), iz katerega smo s plutovrtom (premer 9 mm) izrezali vcepke iz sedem dni starega micelija. Tekoča gojišča smo inokulirali s po tremi vcepki micelija iz gojišča PDA. Tekoče kulture gliv smo gojili 26 dni v temi na horizontalnem stresalniku (100 min^{-1} , $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 60 % RH).

Raztopino lindana (97 % γ -HCH, Merck) smo pripravili v acetonu. Tekočim kulturam gliv smo 100 μl raztopine lindana dodali za 21 dni, tri dni, en dan, šest ur, dve uri ali deset minut (lindan smo tekočim kulturam gliv dodali pet dni, 23 dni, 25 dni ali 26 dni po inokulaciji). Časovni potek poskusa je prikazan na sliki 3. Po dodatku raztopine lindana tekočim kulturam gliv je bila koncentracija lindana v gojišču 30 μM . Pri negativnih kontrolah smo namesto lindana tekočim kulturam gliv dodali 100 μl acetona. Za pozitivne kontrole smo uporabili tekoče gojišče, ki ga nismo inokulirali z micelijem in v katerega smo za deset minut oziroma 21 dni dodali 100 μl raztopine lindana. Tekočim kulturam gliv, ki jim je bil lindan izpostavljen 21 dni, ter vsem kontrolam, smo veratril alkohol dodali ob inokulaciji



Slika 3. Dodajanje lindana tekočim glivnim kulturam. Puščice označujejo dodatek lindana, čas izpostavitve lindana tekočim glivnim kulturam je zapisan nad puščicami.

oziroma ob dodatku lindana ali acetona. Vse poskuse smo izvajali v šestih ponovitvah.

Iz tekočih glivnih kultur in kontrol smo lindan ekstrahirali s heksanom na dva načina. Iz polovice paralelnih ponovitev, kjer je bil lindan kulturi glive izpostavljen za enako obdobje, smo lindan ekstrahirali iz filtratov, iz druge polovice pa iz homogenatov tekočih glivnih kultur.

EKSTRAKCIJA LINDANA IZ FILTRATOV TEKOČIH KULTUR GLIV

Po koncu izpostavitve lindana kulturam gliv smo v erlenmajerice z gojiščem in glivno biomaso dodali 50 ml heksana ter vsebino dobro premešali. Biomaso gliv smo od mešanice heksana in gojišča ločili s filtracijo skozi grobi filtrirni papir (Sartorius Stedim Biotech, 84 g m⁻², grade 388) z uporabo vodne črpalke. Po filtraciji smo zgornjo nepolarno fazo filtrata previdno odpipetirali v stekleno epruveto. Za popolno odstranitev vode smo ekstraktom dodali Na₂SO₄ ter jih shranili v zamrzovalni skrinji (-20 °C).

EKSTRAKCIJA LINDANA IZ HOMOGENATOV TEKOČIH KULTUR GLIV

Vsebinsko erlenmajeric smo po koncu izpostavitve lindana tekočim kulturam gliv prelili v centrifugirke. Prazne erlenmajerice smo dobro sprali s 50 ml heksana, ki smo ga nato dodali v centrifugirke. Vsebinsko centrifugirke smo homogenizirali z napravo Ika T25 Digital Ultra-Turrax (11000 obratov min⁻¹, 30 s). Po homogenizaciji smo nepolarno fazo z ekstrahiranim lindanom ločili od polarne faze s centrifugiranjem (centrifuga Tehnica LC 321, Tehnica Železniki, Slovenija) (4000 obratov min⁻¹, 5 min). Zgornjo nepolarno fazo smo ločili od spodnje polarne faze in ekstraktom pred shranjevanjem v zamrzovalni skrinji dodali Na₂SO₄.

Lindan smo v ekstraktih določali z uporabo plinske kromatografije (GC; angl. gas chromatography). Pri tej analizi lindan vnesemo v sistem v organskem topilu (heksan). Uporabili smo plinski kromatograf (Hewlett Packard 6890 Series, ZDA) z detektorjem za zajetje elektronov (ECD) in kolono RTX-5MS (dolžina 60 m, premer 250 μm, debelina stacionarne faze 0,50 μm). Analizni pogoji: temperatura injektorja 250 °C, temperatura detektorja 320 °C, nosilni plin dušik (pretok 2 ml min⁻¹), temperaturni program: 70 °C do 300 °C, 30 °C min⁻¹, zadrževalni čas 1 minuta pri 70 °C in 5 minut pri 300 °C. Na kolono smo nanašali desetkratne razredčine ekstraktov (redčenje s heksanom). Volumen vbrizganega vzorca je bil 1 μl.

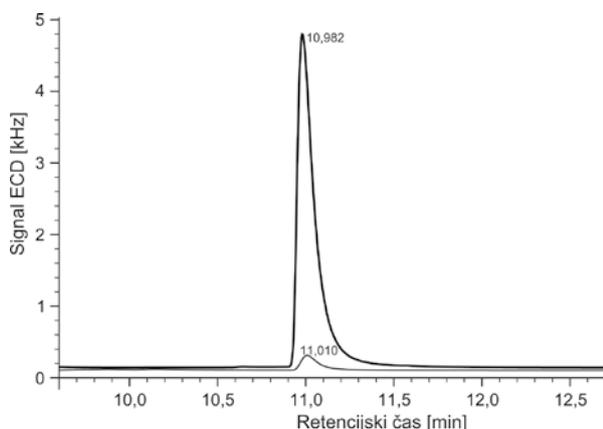
REZULTATI IN RAZPRAVA

Razgradnja lindana s testiranimi vrstama gliv je bila določena s plinsko kromatografijo in izračunana s pri-

merjanjem ploščin kromatografskih vrhov lindana v eksperimentalnih vzorcih in pozitivni kontroli, ki ni bila inkulirana z micelijem. Rezultati so povprečje meritev treh paralelnih vzorcev z navedenimi pripadajočimi standardnimi odkloni. Na sliki 4 je prikazana primerjava kromatografskih vrhov ekstrakta iz kulture glive *P. ostreatus*, v katerem je bil lindan prisoten 21 dni, in kontrole, v kateri je bil lindan v tekočem gojišču prisoten 21 dni. Velika razlika ploščin obeh kromatografskih vrhov nakazuje visoko stopnjo razgradnje lindana.

Stopnja razgradnje lindana z obema glivama bele trohno-be je s časom naraščala (slika 5). Količine lindana, ki smo jih določili po desetih minutah in dveh urah delovanja kultur glive na lindan, imajo prevelike pripadajoče standardne odklone, da bi lahko sklepali na znatno razgradnjo lindana. Pri glivi *P. ostreatus* smo v teh vzorcih določili celo nekoliko večjo količino lindana kot v pozitivnih kontrolah, kar pripisujemo merskim napakam.

V tekočih kulturah glive *P. ostreatus* smo po 21 dneh izpostavitve lindana v vseh vzorcih, ne glede na vrsto uporabljene ekstrakcije, določili več kot 90 % razgradnjo. Zaradi velikih standardnih odklonov pri vzorcih z manj kot enodnevno izpostavitvijo lindana kulturi glive ne moremo govoriti o razgradnji. Intenzivno razgradnjo lindana smo nedvoumno določili po enem dnevu izpostavitve lindana kulturam glive. Po 21 dneh prisotnosti lindana v tekočih kulturah je gliva *P. ostreatus* razgradila skoraj vso količino dodanega lindana. Razen pri vzorcih, kjer smo razgradnjo lindana določali po 21 dneh izpostavitve lindana kulturam glive, so vidne razlike med načinoma ekstrakcije lindana iz tekočih kultur. Večjo razgradnjo smo določili z ekstrakcijo



Slika 4. Določitev lindana z GC: primerjava kromatografskih vrhov lindana, prisotnega 21 dni v tekočem gojišču (debela črta) in v tekoči kulturi glive *P. ostreatus* (tanka črta). Oba vzorca sta bila pripravljena z ekstrakcijo iz homogenata tekoče kulture.

lindana iz filtratov tekočih kultur glive, vendar pa so bile razlike zaradi velikih standardnih odklonov neznačilne.

Pri vzorcih, kjer smo razgradnjo lindana določevali po krajšem času inkubacije lindana v tekočih kulturah glive *H. fragiforme*, je izmerjeni delež razgradnje glede na kontrolo v vseh primerih večji pri ekstrakciji lindana iz filtratov tekočih glivnih kultur. Precej veliko razgradnjo smo s tem načinom ekstrakcije določili po desetih minutah izpostavitve onesnaževala kulturam glive, pa tudi po dveh urah in enem dnevu delovanja kulture *H. fragiforme* na lindan. Ti rezultati nakazujejo, da je izračunana razgradnja lindana odvisna od načina ekstrakcije lindana iz tekočih kultur, vendar pa rezultati ostalih vzorcev, predvsem po 3 dneh in 21 dneh izpostavitve lindana glivam, tega ne podpirajo. Razgradnja lindana je s časom inkubacije naraščala, glede na rezultate pa sklepamo, da se je intenzivna razgradnja lindana z glivo *H. fragiforme* v tekoči kulturi pričela med šestimi urami in enim dnevom izpostavitve lindana tekoči kulturi glive.

Ker se lindan lahko adsorbira na površino glivnega micelija in tudi na steklo (Young in Banks, 1998; Ghosh in sod., 2009), je lahko zaradi tega količina preostalega (ekstrahiranega) lindana v glivnih kulturah manjša, rezultat pa napačno interpretiramo ter sklepamo na razgradnjo lindana. Zaradi tega smo pri poskusu uporabili dva različna načina ekstrakcije lindana iz tekočih glivnih kultur. Iz vzorcev, ki smo jih pripravili s homogenizacijo tekočih kultur gliv, naj bi ekstrahirali tudi lindan, ki bi se lahko adsorbiral na površino micelija ali steno erlenmajerice. Pri vzorcih, pripravljenih z ekstrakcijo lindana iz filtratov tekočih glivnih

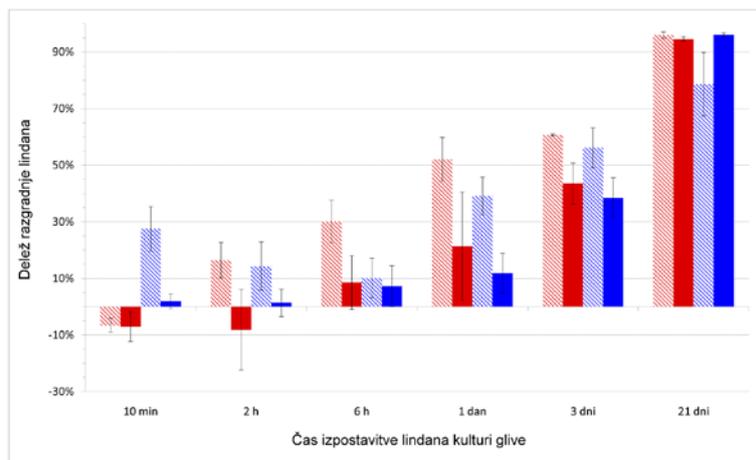
kultur, pa naj bi določili le preostanek lindana v tekočih kulturah, ki se ni vezal na prej omenjene površine. Izrazitih razlik v količini razgrajenega lindana glede na uporabljeno ekstrakcijo nismo opazili pri nobeni vrsti gliv. Sklepamo, da sta obe metodi, ki smo ju uporabili za ekstrakcijo lindana iz tekočih kultur teh dveh gliv, primerni za določanje količine lindana in da sta ga glivi s svojimi encimi najverjetneje razgradili, saj adsorpcije z uporabljenimi metodami nismo dokazali. Čeprav eno od gliv uvrščamo med zaprtotrošnice, drugo pa med prostotrošnice, je bila razgradnja lindana z obema glivama podobna, saj bistvenih razlik v količini razgrajenega lindana ni bilo.

SKLEP

Razgradnja lindana v tekočih glivnih kulturah je odvisna od časa izpostavitve lindana tekočim kulturam gliv ter vrste glive. V tekočih kulturah gliv obeh vrst smo z obema načinoma ekstrakcije lindana določili primerljive razgradnje lindana. Po 21 dneh smo z glivama *P. ostreatus* in *H. fragiforme* razgradili več kot 90 % lindana. Domnevamo, da se je odstranitev lindana iz tekočih glivnih kultur zgodila zaradi razgradnje z glivnimi encimi in ni bila posledica adsorpcije lindana na hife micelija.

ZAHVALA

Zahvaljujemo se Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije za finančno podporo v okviru programa P4-0015-0481 ter dr. Ireni Kralj Cigić za pomoč pri delu s plinskim kromatografom.



Slika 5. Povprečni deleži razgrajenega lindana s pripadajočimi standardnimi odkloni v odvisnosti od časa izpostavitve lindana kulturam gliv *P. ostreatus* (rdeča barva) in *H. fragiforme* (modra barva). Delež razgradnje lindana smo določali v ekstraktih, pripravljenih iz filtratov (šrafirani stolpci) in homogenatov (polni stolpci) tekočih glivnih kultur.

LITERATURA

1. **Alexander M. (1981)** Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science*, 211, 4478: 132-138
2. **Aust S.D. (1995)** Mechanisms of degradation by white rot fungi. *Environmental Health Perspectives*, 103 (Suppl 5): 59-61
3. **Bumpus J.A., Tien M., Wright D., Aust S.D. (1985)** Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science*, 228: 1434-1436
4. **Candeias L.P., Harvey P.J. (1995)** Lifetime and reactivity of the veratryl alcohol radical cation. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 16745-16748
5. **Faison B.D., Kirk T.K. (1985)** Factors involved in the regulation of a ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 49, 2: 299-304
6. **Faison B.D., Kirk K., Farrel R.A. (1986)** Role of veratryl alcohol in regulating ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 52, 2: 251-254
7. **Gadd G.M. (2001)** Fungi in bioremediation. Cambridge University Press, Cambridge, 481
8. **Ghosh S., Das S. K., Guha A.K., Sanyal A.K. (2009)** Adsorption behavior of lindane on *Rhizopus oryzae* biomass: physico-chemical studies. *Journal of Hazardous Materials* 172, 485-490
9. **Hadar Y., Cohen-Arazi E. (1986)** Chemical composition of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* produced by fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 51, 6: 1352-1354
10. **Hamby D.M. (1996)** Site remediation techniques supporting environmental restoration activities- a review. *The Science of the Total Environment*, 191, 201-224
11. **Hammel K.E. (1995)** Organopollutant degradation by ligninolytic fungi. V: *Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals*. Young LY (Ur.), Cerniglia CE (Ur.), Wiley-Liss, New York, 331-346
12. **Hammel K.E. (1997)** Fungal degradation of lignin. V: *Driven by Nature: Plant Litter Quality and Decomposition*. Cadisch G (Ur.), Giller KE (Ur.), CAB International, Madison (MI), 33-45
13. **Janse B.J.H., Gaskell J., Akhtar M., Cullen D. (1998)** Expression of *Phanerochaete chrysosporium* genes encoding lignin peroxidases, manganese peroxidases and glyoxal oxidase in wood. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3536-3538
14. **Jaouani A., Tabka M.G., Penninckx M.J. (2006)** Lignin modifying enzymes of *Coriopsis polyzona* and their role in olive oil mill wastewaters decolourisation. *Chemosphere*, 62: 1421-1430
15. **Kirk K.T, Farrell R.L. (1987)** Enzymatic »combustion«: the microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology*, 41: 465-505
16. **Martínez A. T., Speranza M., Ruiz-Dueñas F.J., Ferreira P., Camarero S., Guillén F., Martínez M.J., Gutiérrez A., del Río J.C. (2005)** Biodegradation of lignocelluloses: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*, 8: 195-204
17. **Messner K., Koller K., Wall M.B., Akhtar M., Scott G.M. (1998)** Fungal treatment of wood chips for chemical pulping. V: *Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry*. Young RA (Ur.), Akhtar MJ (Ur.), Wiley & Sons Inc, New York, 385-419
18. **Pointing S.B. (2001)** Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, 1-2: 20-33
19. **Raspor P., Smole-Možina S., Podjavoršek J., Pohleven F., Gogala N., Nekrep F.V., Rogelj I., Hacin J. (1995)** ZIM: zbirka industrijskih mikroorganizmov. Katalog biokultur. Biotehniška fakulteta, Katedra za biotehnologijo, Ljubljana, 98
20. **Quintero J.C., Moreira M.T., Feijoo G., Lema J.M. (2008)** Screening of white rot fungal species for their capacity to degrade lindane and other isomers of hexachlorocyclohexane (HCH). *Ciencia e Investigación Agraria*, 35, 2: 123-132
21. **Reddy A.C. (1995)** The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. *Current Opinion in Biotechnology*, 6: 320-328
22. **Siddique T., Okeke B.C., Arshad M., Frankenberger W.T. (2002)** Temperature and pH effects on biodegradation of hexachlorocyclohexane isomers in water and a soil slurry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 5070-5076
23. **Singh H. (2006)** Mycoremediation: fungal bioremediation. John Wiley and Sons, New Jersey, 592
24. **UNEP (2007)** Lindane: Risk Management Evaluation. Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, Persistent Organic Pollutants Review Committee, Third meeting. Geneva, 18
25. **UNEP (2010)** Stockholm Convention On Persistent Organic Pollutants (POPs). <http://chm.pops.int/Convention/ThePOPs/tabid/673/language/en-US/Default.aspx> (marec 2010)
26. **Urad Republike Slovenije za kemikalije. (2010)** Stockholmska konvencija o obstojnih organskih onesnaževalih. http://www.uk.gov.si/si/delovna_podrocja/obstojna_organska_onesnazevala/stockholmska_konvencija_o_obstoynih_organskih_onesnazevalih/ (marec, 2010)
27. **Vidic I., Zupančič-Kralj L., Sepčič K., Pohleven F. (2008)** Degradation of polychlorinated organic biocides by the wood decaying fungi. V: *International Research Group on Wood Preservation. IRG Documents IRG 39, Istanbul, maj 25-29: str. 1-13*
28. **Young E., Banks C.J. (1998)** The removal of lindane from aqueous solution using a fungal biosorbent: the influence of pH, temperature, biomass concentration and culture age. *Environmental Technology* 19, 619-625
29. **Zabel R.A., Morrell J.J. (1992)** *Wood Microbiology: Decay and Its Prevention*. Academic Press, New York, 476
30. **Zucchini-Pascal N., de Sousa G., Rahmani R. (2009)** Lindane and cell death: At the crossroads between apoptosis, necrosis and autophagy. *Toxicology*, 256, 1-2: 32-41

BISTVENE LASTNOSTI VISKOELASTIČNO TOPLOTNO ZGOŠČENEGA (VTC) LESA ZA NJEVOVO UPORABO V LESNIH KOMPOZITIH

Relevant properties of viscoelastic thermal compressed (VTC) wood for its utilization in wood-based composites

Izvleček: Les nizkogostotnega hibridnega topola (*Populus deltoides* × *Populus trichocarpa*) iz plantažnega nasada na severozahodu Oregona smo zgostili s postopkom viskoelastične toplotne zgostitve (VTC). Zgoščenim preizkušancem smo ugotovili upogibno trdnost in modul elastičnosti s tričkočvnim upogibnim testom. Ker so za potencialno uporabo zgoščenega lesa bistvene tudi njegove lepilne lastnosti in dimenzijska obstojnost, smo določili povratek tlačne deformacije po 24-urnem namakanju v vodi in ugotavljali strižno trdnost lepilnega spoja s klasičnim natezno strižnim testom. Ugotovili smo, da so se upogibne lastnosti VTC lesa bistveno izboljšale zaradi povečane gostote. Kljub majhni penetraciji lepila in hidrofobnemu značaju površine VTC lesa so rezultati mehanskih testov pokazali, da je lepljenje VTC lesa popolnoma primerljivo lepljenju nezgoščenega lesa in v nekaterih primerih celo boljše. Edina ugotovljena pomanjkljivost VTC lesa je bil 45 % povratek tlačne deformacije po namakanju v vodi. Zato smo modificirali VTC postopek in izvedli zgoščevanje v prisotnosti visokega tlaka vodne pare. Rezultati so pokazali, da je VTC les proizveden z novim modificiranim VTC postopkom dimenzijsko bistveno bolj stabilen, saj smo ugotovili zgolj 3 % povratek tlačne deformacije po 24-urnem namakanju v vodi. Ta ugotovitev predstavlja velik potencial za širšo uporabo VTC lesa v industriji lesnih kompozitov, vendar bo prej potrebno proučiti še kakovost lepljenja tega visoko stabilnega VTC lesa.

Ključne besede: lepljenje, les, mehanske lastnosti, dimenzijska obstojnost, VTC, VTC lesni kompoziti, zgoščevanje

Abstract: Low density hybrid poplar (*Populus deltoides* × *Populus trichocarpa*) from a plantation located in northeastern Oregon was densified using the viscoelastic thermal compression (VTC) process. The modulus of rupture and modulus of elasticity of VTC wood specimens were determined with three point bending tests. Since for effective utilization of densified wood adhesive bonding properties and dimensional stability of densified wood are of basic importance, set recovery after 24 hours water soaking and bond strength in longitudinal tensile shear with classical lap-shear tests were examined. It was found that the bending properties of the VTC wood were significantly improved due to the increased density of the VTC specimens. The hydrophobic behaviour of the VTC wood surface and the decreased effective penetration of the adhesive into the VTC wood did not affect the ability of the surface of the VTC wood to properly bond with the adhesive. The adhesive bond strength of the densified VTC specimens was similar or better than that of the control (undensified) specimens. The only defectiveness of the VTC wood was 45 % of the compressive deformation set recovery after water soaking. Therefore the VTC process was modified. The densification was performed in the presents of pressurized saturated steam. The results show that the VTC wood produced with the modified VTC process has significantly improved stability. After 24 hours of water soaking only 3 % of the compressive deformation set recovery was determined. These findings provide a variety of potential uses for VTC wood as raw material in the production of wood-based composites. However, bonding properties of this highly stabile VTC wood has to be studied first.

Key words: adhesive bonding, densification, dimensional stability, mechanical properties, VTC, VTC wood composites, wood

* ILTRA d.o.o., Celovška cesta 268, 1000 Ljubljana; Univerza na Primorskem, Primorski inštitut za naravoslovne in tehnične vede, Muzejski trg 2, 6000 Koper; andreja.kutnar@upr.si

** Oregon State University, Department of Wood Science and Engineering, 119 Richardson Hall, Corvallis, Oregon, USA; fred.kamke@oregonstate.edu

*** Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Rožna dolina c. VIII/34, 1001 Ljubljana, milan.serneke@bf.uni-lj.si

1. UVOD

Zgodovina zgoščevanja lesa sega v začetek 20. stoletja, ko so bili razviti prvi takšni postopki. Prvi postopek zgoščevanja s stiskanjem lesa v prečni smeri je bil »Staypak«. V Evropi je bil takšen postopek prvič izveden leta 1930 pod imenom »Lignostone«. Sledili so mu »Lignofol«, »Jicwood« in »Jablo« (Kollmann in sod., 1975). Našteti postopki izboljšajo določene mehanske lastnosti lesa, vendar dosežena deformacija s postopkom zgoščevanja ni stabilna. Ker ti postopki zgoščevanja niso primerno upoštevali plastičnosti lesa in stabilizacije končnega produkta, v praksi niso bili nikoli uporabljeni (Kollmann in sod., 1975). Produkti sodobnih razvitih postopkov zgoščevanja imajo sicer dobro dimenzijsko obstojnost, vendar se pri izpostavitvi klimi z visoko vlažnostjo pojavi ireverzibilen povratek tlačne deformacije, ki je posledica sprostitve med postopkom stiskanja nastalih notranjih napetosti. Ireverzibilen povratek tlačne deformacije je potrebno razlikovati od nabrekavanja, ki je posledica higroskopske narave lesa. Ireverzibilen povratek tlačne deformacije je odvisen od celične strukture in lastnosti polimerov celičnih sten (Inoue in sod., 1993; Dwianto in sod., 1999; Navi in Girardet, 2000; Blomberg in Persson, 2004; Kamke in Sizemore, 2008).

V raziskavi, ki je predstavljena v tem članku, smo uporabili nedavno razvit postopek viskoelastične toplotne zgostitve (VTC), katerega produkt je VTC les visoke gostote, trdnosti in dimenzijske obstojnosti (Kamke in Sizemore, 2008). Z VTC postopkom se poveča gostota lesa s stiskanjem v prečni smeri, ko je les v zmehčanem stanju, nad točko steklastega prehoda. S kombinacijo pare in toplote ter mehanskim stiskanjem se poveča gostota lesa za 100 % do 300 %. Visoka temperatura in visok tlak vodne pare med postopkom stiskanja plastificirata les in preprečita lom lesnih celic pod ekstremnimi napetostmi. VTC les ima

spremenjene anatomske, fizikalne in mehanske lastnosti. Spremenjena anatomska zgradba se izraža v stisnjenih luminih in deformiranih celičnih stenah, brez lomov (Kutnar in sod., 2009).

Za učinkovito izrabo zgoščenega lesa v lesnih kompozitih so bistvene njegove mehanske in lepilne lastnosti. Zato je bil namen raziskave ugotoviti upogibno trdnost, modul elastičnosti in lepilne lastnosti VTC lesa. Poglavitna je tudi obstojnost tlačne deformacije po izpostavitvi visokim vlažnostim. Raziskovalci so dokazali, da lahko ireverzibilno nabrekavanje eliminiramo s parjenjem in segrevanjem ter tako dosežemo trajno fiksacijo tlačne deformacije (Dwianto in sod., 1999; Inoue in sod., 1993; Inoue in sod., 2008). Zato smo modificirali VTC postopek in določili povratek tlačne deformacije modificiranega VTC lesa po namakanju v vodi.

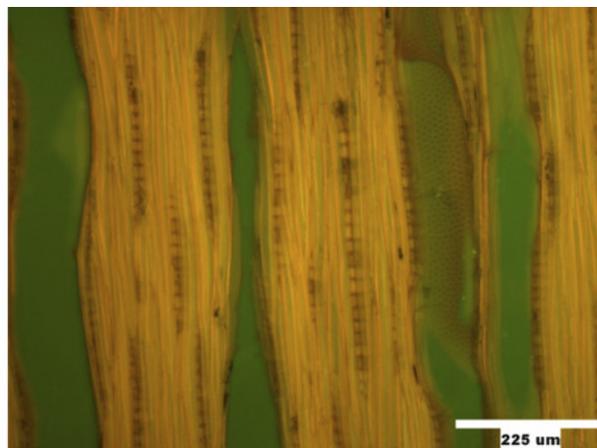
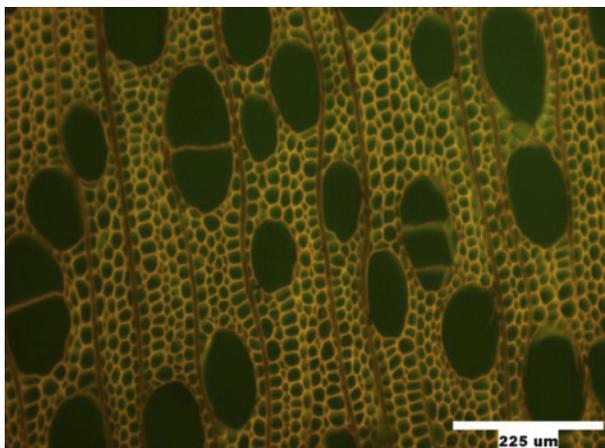
2. MATERIALI IN METODE

V raziskavah smo uporabili les nizkogostotnega hibridnega topola (*Populus deltoides* × *Populus trichocarpa*) iz plantažnega nasada na severozahodu Oregona, ki smo ga zgostili z VTC postopkom (slika 1). Dolžina, širina in debelina vzorcev je bila 56 mm, 170 mm in 6 mm. Vzorci so bili brez vidnih anomalij. Debelina in širina vzorcev sta bili radialno-tangencialne usmerjenosti. Pred VTC postopkom in po njem so bili vzorci uravnovešeni v klimi s temperaturo 20 °C in 65 % relativno zračno vlažnostjo.

2.1. VTC POSTOPEK

VTC postopek se izvaja v napravi, ki je prikazana na sliki 2. Naprava omogoča vzpostavitev vzorcev visokim temperaturam in visokemu tlaku vodne pare. Natančen opis naprave je predstavljen v literaturi (Kamke, 2006).

VTC postopek je sestavljen iz treh faz, v katerih s kombina-



Slika 1: Svetlobna mikroskopija: hibridni topol (*Populus deltoides* × *Populus trichocarpa*); (levo – prečni pre-rez, desno – tangencialni pre-rez).

cijo pare in toplote ter mehanskim stiskanjem povečamo gostoto lesa. Celoten postopek zgostitve traja 15 min. Postopek se prične s parjenjem vzorca lesa pri tlaku vodne pare 860 kN m^{-2} . Vzorec je izpostavljen tlaku vodne pare brez mehanskega tlaka 3 min in nato še dodatni 2 min z mehansko tlačno silo 1380 kN m^{-2} . Sledi sprostitve tlaka vodne pare in uravnovešanje brez mehanskega tlaka 100 s. Med fazo uravnovešanja se vzorcu zniža vlažnost. Pojavi se padec temperature. Naslednja faza se prične z vzpostavitev mehanske tlačne sile 4480 kN m^{-2} , ki traja 5 min. Hkrati se dvigne temperatura iz začetnih 175 °C na 200 °C . V zadnjem koraku se vzorce ohladi pod mehansko tlačno obremenitvijo (4480 kN m^{-2}) na 100 °C .

Z opisanim VTC postopkom smo zgostili deset vzorcev lesa z začetno debelino 6 mm na končno debelino 2,5 mm in dosegli 132 % stopnjo zgostitve.

2.1.1. Modificiran VTC postopek

Z namenom eliminacije ireverzibilnega nabrekanja smo modificirali v prejšnjem poglavju opisan VTC postopek. Vzorci so bili najprej 3 minute izpostavljeni tlaku nasičene vodne pare pri 170 °C brez mehanskega tlaka in nato še 3 minute z mehansko tlačno silo 5516 kN m^{-2} . Sledila je sprostitve tlaka vodne pare in ohlajanje pod mehansko



Slika 2: VTC naprava.

tlačno obremenitvijo na 100 °C . Karakteristike modificiranega VTC postopka so natančno opisane v Kutnar in Kamke (2010).

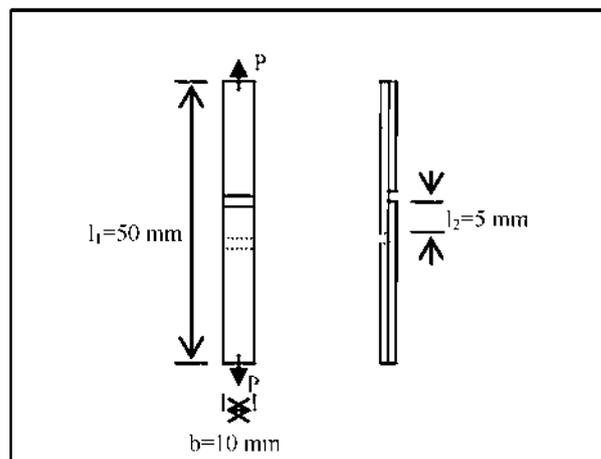
Z modificiranim VTC postopkom smo zgostili deset vzorcev lesa z začetno debelino 6 mm s tlačno silo 5516 kN m^{-2} . Za razliko od vzorcev, zgoščenih s klasičnim VTC postopkom pri modificiranem VTC postopku, nismo uporabili mehanskih okvirjev za nadziranje končne debeline VTC lesa.

2.2 DOLOČITEV MEHANSKIH LEPILNIH LASTNOSTI VTC LESA

Kontrolnim in VTC vzorcem smo ugotovili upogibno trdnost in modul elastičnosti s tritočkovnim upogibnim testom (Kutnar in sod., 2008b). Poleg raziskovanja upogibnih lastnosti VTC lesa smo se v raziskavi osredotočili tudi na njegove lepilne lastnosti oziroma adhezijo pri lepljenju (Kutnar in sod., 2008a; Kutnar in sod., 2008b). Uporabili smo fenol-formaldehidno (FF) lepilo (Georgia – Pacific Resins, Inc) z viskoznostjo 330 mPa s . Kontrolne in VTC vzorce smo zlepili v vroči stiskalnici pri 150 °C . Sledilo je testiranje kvalitete zlepljenosti kontrolnega in VTC lesa. Ugotovili smo strižno trdnost lepilnega spoja s klasičnim natezno strižnim testom (SIST EN 302-1, 2004) (slika 3) (Kutnar in sod., 2008a).

2.2. POVRATEK TLAČNE DEFORMACIJE

Za določitev povratka tlačne deformacije VTC lesa smo pripravili vzorce dimenzij $50 \text{ mm} \times 15 \text{ mm}$. VTC in VTC lesa, proizvedenega z modificiranim VTC postopkom, smo najprej uravnovesili v klimi s temperaturo 20 °C in 65 % relativno zračno vlažnostjo in zatem posušili do absolutno suhega stanja v sušilniku pri 103 °C , da smo določili začetno debelino vzorcev v absolutno suhem stanju in ravnovesno vlažnost lesa. Vzorce smo nato za 24 ur potopili v vodo in jih ponovno posušili do absolutno suhega



Slika 3: Geometrija vzorcev za klasični strižni test.

stanja. Povratek tlačne deformacije smo določili z enačbo 1 (Inoue in sod., 2008; Kutnar in Kamke, 2010).

$$\text{Povratek} = [(t_s - t_c) / (t_i - t_c)] \times 100 [\%], \quad (1)$$

kjer je t_s debelina VTC vzorca v absolutno suhem stanju po namakanju, t_c začetna debelina VTC vzorca v absolutno suhem stanju, in t_i debelina vzorca pred VTC postopkom.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

3.1 FIZIKALNE IN MEHANSKE LASTNOSTI VTC LESA

Z VTC postopkom smo povečali gostoto lesa iz $0,331 \text{ g cm}^{-3}$ na $0,792 \text{ g cm}^{-3}$, z modificiranim VTC postopkom pa na $1,19 \text{ g cm}^{-3}$ (preglednica 1). Po uravnovešanju vzorcev v klimi s temperaturo 20 °C in 65% relativno zračno vlažnostjo smo ugotovili, da je ravnovesna vlažnost VTC in VTC lesa, proizvedenega z modificiranim VTC postopkom, znižana na 7% . S tri-točkovnimi upogibnimi testi VTC in kontrolnih vzorcev smo ugotovili, da je povečanje modula elastičnosti sorazmerno povečanju gostote, medtem ko je povečanje upogibne trdnosti nekoliko nižje kot bi pričakovali glede na povečanje gostote (preglednica 1). Povečanje mehanskih lastnosti VTC lesa je doseženo, ker viskoelastična toplotna zgostitev lesa uporablja ustrezno kombinacijo temperature in vodne pare, ki med postopkom stiskanja plastificirata les in preprečita lom lesnih celic pod ekstremnimi napetostmi (Kutnar in sod., 2009). Morfologija zgoščenega lesa je bistveno spremenjena, in sicer sorazmerno s stopnjo zgostitve. Višja je stopnja zgostitve, večje je zmanjšanje volumna praznih prostorov – lumnov trahej in vlaken.

3.2 LEPILNE LASTNOSTI VTC LESA

Rezultati mehanskih testov so pokazali, da je lepljenje VTC lesa popolnoma primerljivo lepljenju nezgoščenega lesa (preglednica 2). Določena strižna trdnost lepilnega spoja VTC lesa je bila višja od strižne trdnosti lepilnega spoja kontrolnega lesa. Kljub temu, da VTC postopek značilno spremeni njegove lastnosti, smo ugotovili, da niti nizka

površinska energija VTC lesa (Kutnar in sod., 2008c), niti majhna učinkovita penetracija lepila v VTC lesu (Kutnar in sod. 2008b) ne povzročita slabe kvalitete lepljenja VTC lesa. Raziskave so pokazale, da je učinkovita penetracija lepila odvisna od stopnje zgostitve (Kutnar in sod., 2008b), in sicer lepilo slabše penetrira v VTC les z večjo stopnjo zgostitve. Od stopnje zgostitve pa je bila odvisna tudi lokacija lepila v lesu. Medtem ko se je lepilo v nezgoščenem lesu nahajalo v lumnih trahej, se v VTC lesu pojavljalo tudi v lumnih vlaken in v celicah trakov.

Ugotovljeno je bilo tudi, da lepljenje VTC lesa z nezgoščenim lesom ni problematično, kljub temu, da se penetracija lepila izrazito razlikuje med kontrolnim in VTC lesom (slika 4) (Kutnar in sod., 2008b). Aplikacija VTC lesa za lesne kompozite je bila nazorno demonstrirana z izdelavo trislojnih VTC kompozitov (Kutnar in sod., 2008a). VTC les se je uporabil za zunanjo sloja kompozita, medtem ko je sredico sestavljal nezgoščen kontrolni les. Štiritočkovni upogibni testi VTC kompozitov so pokazali, da sta upogibna trdnost in modul elastičnosti kompozitov, izdelanih iz VTC lesa, višja od kompozitov, narejenih iz nezgoščenega lesa.

3.3 POVRATEK TLAČNE DEFORMACIJE

S testi povratka tlačne deformacije VTC lesa po 24-urnem namakanju v vodi je bilo ugotovljeno, da modificiran VTC postopek omogoča produkcijo VTC lesa z minimalnim povratkom tlačne deformacije po namakanju v vodi (preglednica 3). Zgoščevanje lesa ob prisotnosti tlaka vodne pare močno zmanjša ireverzibilno nabrekanje VTC lesa, kar nazorno prikazuje tudi slika 5. Prejšnje raziskave so pokazale, da povratek tlačne deformacije narašča s stopnjo zgostitve (Blomberg in sod., 2006; Kutnar in sod., 2009). V našem primeru pa je bil dosežen bistveno nižji povratek tlačne deformacije pri VTC lesu, proizvedenem z modificiranim VTC postopkom, ki je imel značilno višjo gostoto (preglednica 1). Kljub številnim raziskavam kemijskih sprememb med hidrotermično obdelavo lesa še vedno ni popolnoma jasno, kateri so glavni razlogi za te kompleksne spremembe. Hidrotermična obdelava lesa namreč pov-

zroči degradacijske reakcije lesnih komponent. Visoka temperatura in visok tlak vodne pare med VTC postopkom povzročita degradacijo hemiceluloz, oksidacijo in polimerizacijo lignina ter določenih ekstraktivov. Znano je, da nasičena vodna para vpliva na fizikalne in mehanske lastnosti lesa (Lenth in Kamke, 2001). Verjetno so

Preglednica 1: Gostota v absolutno suhem stanju, ravnovesna vlažnost in rezultati upogibnih testov kontrolnih in VTC vzorcev (n = 10).

	Gostota v absolutno suhem stanju [g cm^{-3}]	Ravnovesna vlažnost* [%]	Upogibna trdnost [MPa]	Modul elastičnosti [GPa]
Kontrolni les	0,331	12,0	76,1	8,70
VTC les	0,792	7,0	154	19,9
Modificiran VTC les	1,19	7,0	276	31,8

*Vzorci uravnovešeni v klimi s temperaturo 20 °C in 65% relativno zračno vlažnostjo.

Preglednica 2: Primerjava strižne trdnosti (n = 10) lepilnega spoja kontrolnega in VTC lesa (standardni odklon je prikazan v oklepajih)

Table 2: Comparison of the shear strength (n = 10) of the bonded control specimens and the VTC specimens (the standard deviation is shown in parentheses)

	Strižna trdnost [MPa]	Odstotek loma po lesu [%]
Kontrolni les	5,55 (0,28)	50
VTC les	6,30 (0,87)	80

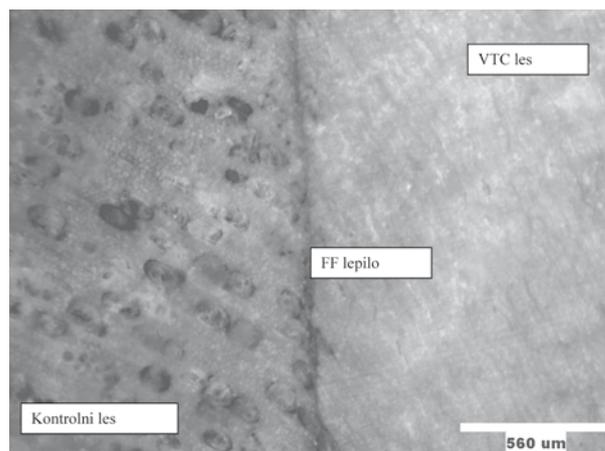
Preglednica 3: Povratek tlačne deformacije (n = 10) VTC lesa in VTC lesa, proizvedenega z modificiranim VTC postopkom (standardni odklon je prikazan v oklepajih)

	Povratek tlačne deformacije [%]
VTC	46,1 (23,1)
Modificiran VTC les	3,0 (1,68)

pogoji stiskanja vplivali na tvorjenje notranjih napetosti, ki povzročijo povratek tlačne deformacije (Kutnar in Kamke, 2010). Poleg tega se je zmanjšala higroskopsnost VTC lesa. Količina povratka tlačne deformacije bi bila lahko posledica pretrganja zamrežitvenih vezi, ki bi povzročile povratek deformacije, in mehčanja lignina ter najverjetneje tvorjenja kovalentnih vezi v deformiranem (stisnjenem) stanju (Inoue in sod., 2008).

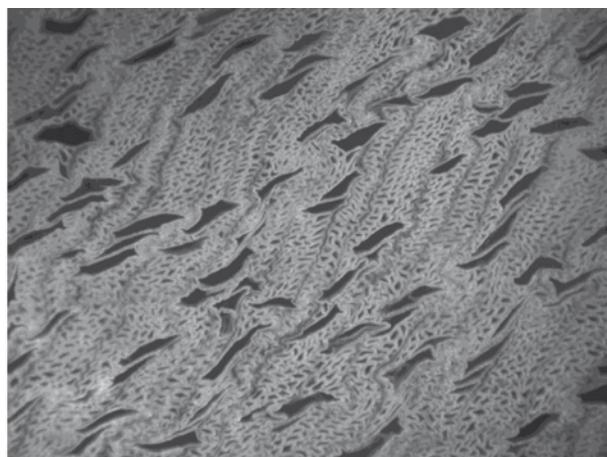
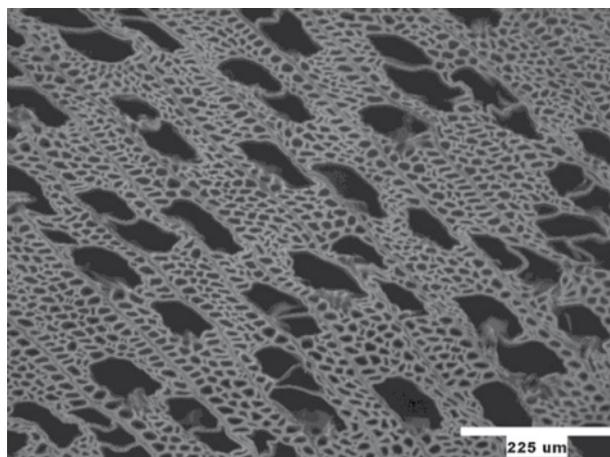
4. SKLEP

Zaradi visoke gostote, visokih mehanskih lastnosti in dobre dimenzijske obstojnosti ima VTC les velik pomen v



Slika 4: Prečni prerez lepilnega spoja med kontrolnim, netretiranim lesom in VTC lesom s 132 % stopnjo zgostitve. Temna področja prikazujejo prisotnost FF lepila. Površina je bila pripravljena z brušenjem v olje vklopljenih vzorcev (Kutnar in sod., 2008a).

prihodnjem razvoju lesne industrije. Dosedanje raziskave so pokazale, da ima VTC les višjo upogibno trdnost kot nezgoščen les. Higroskopsnost VTC lesa je zaradi uporabe visoke temperature in nasičene vodne pare v VTC postopku bistveno zmanjšana. Morfologija zgoščenega lesa se bistveno spremeni, in sicer sorazmerno s stopnjo zgostitve. Celice lesa so deformirane v smeri zgostitve, brez loma celičnih sten. Spremenjene so lastnosti površine VTC lesa. Kljub zaprti površini in hidrofobnem značaju površine je kvaliteta lepljenja VTC lesa primerljiva kvaliteti lepljenja nezgoščenega lesa. Glavna pomanjkljivost VTC lesa je povratek tlačne deformacije po izpostavitvi visoki vlažnosti, vendar so rezultati te raziskave pokazali, da se



Slika 5: Svetlobna mikroskopija, prečni prerez: levo – VTC les in desno – les, proizveden z modificiranim VTC postopkom; obe sliki prikazujeta stanje po namakanju v vodi.

lahko doseže visoka obstojnost tlačne deformacije VTC lesa, če je ta proizveden s spremenjenim VTC postopkom. V modificiranem VTC postopku, v katerem je vzorec zgoščen ob prisotnosti tlaka nasičene vodne pare, pride do kemijskih sprememb in pretrganja notranjih vezi. Zato se notranje napetosti, zaradi katerih bi prišlo do znatnega povratka tlačne deformacije v klimi z visoko vlažnostjo, ne tvorijo. Ugotovitev raziskave ima bistven vpliv na bodočo uporabo VTC lesa v industriji lesnih kompozitov. VTC postopek namreč omogoča uporabo nizkogostotnega in juvenilnega lesa s slabimi mehanskimi lastnostmi v novih visokokakovostnih lesnih kompozitih. Vsekakor pa je potrebno proučiti še površinske in lepilne lastnosti modificiranega VTC lesa, saj je dobra dimenzijska obstojnost zgoščenega lesa zgolj ena, seveda izredno pomembna, lastnost za uporabo VTC lesa.

5. LITERATURA

- Blomberg J., Persson B. (2004)** Plastic deformation in small clear pieces of Scots pine (*Pinus sylvestris*) during densification with the Calignum process. *Journal of Wood Science*, 50,4: 307–314
- Blomberg J., Persson B., Bexell U. (2006)** Effects of semi-isostatic densification on anatomy and cellshape recovery on soaking. *Holzforschung*, 60: 322–331
- Dwianto W., Morooka T., Norimoto M., Kitajima T. (1999)** Stress Relaxation of Sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don) Wood in Radial Compression under High Temperature Steam. *Holzforschung*, 53, 5: 541–546
- EN 302-1 (2004)** Adhesives for load bearing timber structures. Adhesives for load-bearing timber structures Test methods: Part 1: Determination of bond strength in longitudinal tensile shear strength.
- Inoue M., Norimoto M., Tanahashi M., Rowell M.R. (1993)** Steam or heat fixation of compressed wood. *Wood and Fiber Science*, 25, 3: 224–235
- Inoue M., Sekino N., Morooka T., Rowell R.M., Norimoto, M. (2008)** Fixation of compressive deformation in wood by pre-steaming. *Journal of Tropical Forest Science*, 20, 4: 273–281
- Kamke F.A. 2006.** Densified radiata pine for structural composites. *Maderas. Ciencia y tecnologia*, 8, 2: 83–92
- Kamke F.A., Sizemore H. (2008)** Viscoelastic thermal compression of wood. U.S. Patent Application No. US Patent No. 7.404.422
- Kollmann F.P., Kuenzi E.W., Stamm A.J (1975)** Principles of Wood Science and Technology. Vol. II: Wood Based Materials. Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin: 139–149
- Kutnar A., Kamke F.A., Sernek M. (2008a)** The mechanical properties of densified VTC wood relevant for structural composites. *Holz als Roh- und Werkstoff*, 66, 6: 439–446
- Kutnar A., Kamke F.A., Nairn J.A., Sernek M. (2008b)** Mode II fracture behavior of bonded viscoelastic thermal compressed wood. *Wood and Fibre Science*, 40,3: 362–37312.
- Kutnar A., Kamke F.A., Petrič M., Sernek M. (2008c)** The influence of viscoelastic thermal compression on the chemistry and surface energetics of wood. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, 329: 82–86
- Kutnar A., Kamke F.A., Sernek M. (2009)** Density profile and morphology of viscoelastic thermal compressed wood. *Wood Science and Technology*, 43, 1: 57–68
- Kutnar A., Kamke F.A. (2010)** Influence of temperature and steam environment on set recovery of compressive deformation of wood. *Holzforschung* (poslano 10.2.2010)
- Lenth C.A., Kamke F.A. (2001)** Moisture dependent softening behavior of wood. *Wood and Fiber Science*, 33, 3: 492–507
- Navi P., Girardet F. (2000)** Effects of thermo-hydro-mechanical treatment on the structure and properties of wood. *Holzforschung*, 54, 3: 287–293

DINAMIKA ZALOG OGLJIKA V LESNIH IZDELKIH V SLOVENIJI

Carbon stock dynamics in wood products in Slovenia

Povzetek: V raziskavi smo predstavili dinamiko zalog ogljika v izbranih lesnih proizvodih. Uporabili smo model s fiksno življenjsko dobo, prilagoditev po funkciji Weibull in metodo, ki upošteva razkroj prvega reda (First order decay – FOD). Modelni izračuni so bili narejeni za življenjski dobi 30 in 43 let za vse izbrane lesne proizvode. Vhodni podatki predstavljajo porabo izbranih lesnih proizvodov v Sloveniji v obdobju 1900-2008. Rezultati po vseh modelnih izračunih nakazujejo, da je v Sloveniji še vedno prisotno povečevanje zalog ogljika v lesnih proizvodih. Z uporabo pristopa sprememb zalog ogljika (Stock change approach – SCA) za najpomembnejše skupine lesnih proizvodov, se letna akumulacija ogljika, izraženega v CO₂ ekvivalentih, giblje med 1 % in 2 % letnih emisij Slovenije. Na primeru gibanja zalog ogljika v skupini vlaknenih in ivernih plošč izbrani model in življenjska doba izrazito vplivata na oceno povečevanja zalog.

Ključne besede: dinamika zalog ogljika, lesni izdelki, Slovenija

Abstract: Carbon stock's dynamics in selected wood products was researched. Model with fixed average life time, Weibull model and First order decay method were used respectively. 30 and 43 years average life times were tested, respectively. Data on selected wood products consumption for period 1900-2008 were used as input data for selected models. Growth of carbon stocks in selected wood products was indicated according to results of all models used. Annual accumulation of carbon in terms of CO₂ equivalents is of range 1-2 % of Slovenian yearly emissions of greenhouse gases according to results within Stock change approach (SCA). Selected models and assumptions related to average life times showed significant differences in case of fibreboards and particle boards.

Key words: carbon stock dynamics, wood products, Slovenia

UVOD

Za ovrednotenje realnega pomena rabe lesa so potrebni podatki o proizvodnji, uvozu in izvozu za vse proizvode v proizvodni verigi iz gozda do končnega izdelka, saj lahko le na tak način določimo obseg porabe lesa in lesnih izdelkov na nacionalni ravni. Zahtevnost in stroški inventur se večajo s stopnjo predelave lesa, ker po eni strani narašča raznovrstnost končnih proizvodov in se povečuje število vmesnih tokov med polizdelki in izdelki, po drugi strani pa narašča število uporabnikov. Podatki o proizvodnji so zaradi večanja števila poslovnih subjektov, ki uporabljajo les kot vhodno surovino, in fizičnih oseb, ki upora-

bljajo les za lastne potrebe, ter rabe različnih merskih enot čedalje bolj nepopolni. Večina evropskih držav intenzivno raziskuje stanje zalog lesnih izdelkov in ocenjuje letno akumulacijo lesa v rabi. S pretvorbenimi faktorji določajo količine akumuliranega ogljika in letno akumulacijo v lesnih izdelkih. Raziskave vrednotenja pomena skladiščenja ogljika v lesnih izdelkih in na deponijah vključujejo različne modele in sisteme preučevanja (Ford Robertson, 2003; Hashimoto in Moriguchi, 2004; Jaakko Pöyry Consulting, 2000; Pingoud in sod., 2003; Gjesdal, 1996). Glede na priporočen model (EXPHWP) v navodilih dobre prakse (IPCC, 2006) se ocenjuje, da je neposreden doprinos povečevanja zalog v lesnih izdelkih pomemben, povečevanje skladiščenja ogljika znaša v nacionalnih bilancah emisij in ponorov toplogrednih plinov okrog 1 % glede na letne emisije (Pingoud in sod., 2003; Kohlmaier in sod., 2007). Zanimivo je, da je stopnja akumulacije podobna letni rasti

* Gozdarski inštitut Slovenije, Večna pot 2, 1000 Ljubljana, e-pošta: mitja.piskur@gozdis.si

** Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, e-pošta: miha.humar@bf.uni-lj.si

porabe lesa na prebivalca, ki je v Evropi v obdobju 2000–2005 naraščala z 1,5 % letno rastjo (Anonymus, 2007). Preliminarni rezultati modela EXPHWP za Slovenijo nakazujejo podoben obseg skladiščenja ogljika v lesnih izdelkih (Piškur in Krajnc, 2007). Podrobne modelne izračune zaloga ogljika v lesnih izdelkih in na deponijah ter projekcije prihodnjih sprememb zaloga so raziskovali v ZDA (Skog in sod., 2004; Skog, 2008), na Finskem (Pingoud in sod., 2001; Laturi in sod., 2008), v Avstraliji (Jaakko Pöyry Consulting, 2000), Japonskem (Hashimoto in Moriguchi, 2004), Irskem (Green in sod., 2006), Švici (Taverna in sod., 2007) in Portugalskem (Dias in sod., 2007). Pomen rabe lesa je večji ob upoštevanju substitucijskih učinkov drugih materialov in fosilnih goriv (Taverna in sod., 2007). Za države, ki so nastale z razpadom ali razdružitvijo nekdanjih skupnih držav, se pojavljajo v mednarodnih statistikah nepopolni časovni nizi podatkov, ki pa so po drugi strani ključni v izračunih in prikazu pomena rabe lesa za posamezne države na ravni Evropske unije. Dodaten izziv predstavlja ovrednotenje rabe lesa domačega porekla. Prihodnje emisije in/ali odpadki izvirajo iz današnjih zaloga, zato je možno s poznavanjem strukture in količin zaloga napovedovati prihodnje emisije/odpadke. To velja tudi za prihodnje količine odsluženih lesnih izdelkov. Napovedi količin odsluženega lesa so lahko vezane na problem emisij CO₂, lahko pa tudi na količine, ki zaradi okoljske zakonodaje potrebujejo posebno vrsto predelave ali odstranjanja.

V Sloveniji so raziskave o pomenu skladiščenja ogljika v lesnih izdelkih pomanjkljive in fragmentarne. Relativna razmerja med posekom in količinami lesa, ki vstopa v predelavo, so bila narejena za leto 2004 (Piškur in Krajnc, 2007). Dosedanje preliminarna ocena pomena skladiščenja ogljika v lesnih izdelkih po metodi sprememb zaloga ogljika (SCA) so se gibale okrog 1 % letnih emisij za leto 2003 v Sloveniji (Krajnc in sod., 2006; Logar in sod., 2009). Za leto 2006 je bil pomen skladiščenja ogljika v lesnih izdelkih za Slovenijo višji, in sicer okrog 2 % po proizvodnem pristopu, ki je za Slovenijo kot neto izvoznico ugodnejši od preostalih pristopov, in z upoštevanjem lesnih izdelkov in papirja ter njenih življenjskih dob 30 let in 2 leti (Anonymus, 2009; Rüter, 2009). Golob (2007) navaja, da je zaloga ogljika v lesnih izdelkih (vključno z lesom za ogrevanje) in papirju 3,2 Mt C.

Glavni namen raziskave je oceniti zalogo in dinamiko spreminjanja zaloga ogljika v izbranih skupinah lesnih proizvodov v Sloveniji. V raziskavi niso zajeti papirni izdelki, ki bodo mogoče predmet raziskav v prihodnosti. V raziskavi smo želeli preveriti hipotezo, da zaloge ogljika v izbranih skupinah proizvodov niso (še) konstantne, temveč še vedno naraščajo.

METODE

Dinamični modeli snovnih tokov (SFA) vključujejo zaloge v družbi in združujejo fizične, socio-ekonomske in inženirske elemente (Elshkaki, 2007). SFA lahko zajema več ravni: raven proizvodov, raven materialov in raven snovi. Osnovna zamisel napovedovanja izhodov je vezana na značilnosti zaloga: "leaching" model, kjer je izhod odvisen le od količin zaloga, in "delay" model, kjer je izhod v povezavi z značilnostmi vhodov in življenjskimi dobami. Zaloge v družbi so lahko velike, kar pomeni, da bodo prej ali slej predstavljale vir emisij in/ali odpadkov. Na podlagi modela je možno ovrednotenje zaloga opredeljenih snovi in napovedovanje izhoda le-teh iz sistema v obliki emisij in odpadkov. Številni avtorji so z uporabo SFA preučevali akumulacijo svinca (Elshkaki in sod., 2004; Elshkaki in sod., 2005), PVC-ja (Kleijn in sod., 2004), kadmija (Guinee in sod., 1997; Van der Voet, 1996) ... V prispevku smo želeli preizkusiti različne metode za ponazoritev dinamike sprememb zaloga ogljika v lesnih proizvodih.

V naših izračunih smo uporabili tri metode, ki smo jih spreminjali tudi glede na življenjsko dobo. Uporabili smo naslednje metode:

- ▶ FOD ("first order decay" - razkroj prvega reda) v skladu z IPCC (2006).
- ▶ Določena življenjska doba proizvodov.
- ▶ Dvo-parametrična Weibull funkcija.

Izračuni so bili narejeni za 30- in 43-letno povprečno življenjsko dobo proizvodov (pri FOD le za 43-letno). Izbrani življenjski dobi sta bili uporabljeni zaradi privzetih vrednosti za lesne izdelke v izračunih po navodilih dobre prakse (IPCC, 2006), kjer je privzeta vrednost za razpolovno dobo lesnih izdelkov 30 let - povprečna življenjska doba v tem primeru znaša 43 let. Z uporabo modelov smo želeli ugotoviti vpliv izbora življenjskih dob na oceno povečevanja ali zmanjševanja zaloga ogljika v lesnih izdelkih.

V raziskavi smo na podlagi izbora metod in življenjskih dob uporabili naslednje modele (v oklepajih so navedene oznake, ki se pojavljajo v slikah 2 in 3):

- ▶ Razkroj prvega reda z življenjsko dobo 43 let (FOD 30/43),
- ▶ Določena življenjska doba proizvodov – 30 let (DELTA 30),
- ▶ Določena življenjska doba proizvodov – 43 let (DELTA 43),
- ▶ Dvo-parametrična Weibull funkcija z življenjsko dobo 30 let (Weibull 30),
- ▶ Dvo-parametrična Weibull funkcija z življenjsko dobo 43 let (Weibull 43).

Emisije, ki nastajajo z izhodom lesnih izdelkov iz rabe, so v raziskavah skladiščenja ogljika v lesnih izdelkih večinoma izračunane po metodi FOD (First Order Decay - razkroj prvega reda). Metoda omogoča izračun izhodov iz posameznih skladišč lesnih izdelkov glede na življenjsko dobo. Vhodi v posamezno skladišče so opredeljeni s zgodovinskimi podatki o rabi izbranih skupin lesnih izdelkov. Metoda FOD pomeni, da je hitrost razgradnje (k) izražena kot delež zaloge v izbranem skladišču ogljika. Slabost metode je v neupoštevanju starosti posameznih izdelkov, ker imajo vsi izdelki v rabi enako verjetnost, da izstopijo iz zaloge (gre za princip "leaching"). Z drugimi besedami: določena količina lesnih izdelkov bo iz rabe izstopala padajoče eksponentno. Prednost metode FOD je v njeni enostavnosti za opis dinamičnih procesov (Pingoud in Wagner, 2006). Avtorja med pogloblitimi slabostmi FOD metode poudarjata, da ni razlike med različnimi elementi v posameznem skladišču ogljika – razkroj oziroma izstopanje iz sistema je odvisno le od količine zaloge v danem trenutku. IPCC (2006) priporoča uporabo enotne razpolovne dobe ("half-life" – v nadaljevanju HL) za vse lesne proizvode, in sicer 30 let; povprečna življenjska doba znaša v tem primeru 43 let. Razpolovna doba predstavlja v našem primeru čas, ko bo od začetne količine ogljika v lesnih proizvodih ostalo v uporabi še polovica začetnih količin (ogljika).

Vsi izračuni metodološko sledijo pristopu sprememb zalog ogljika (SCA), ki upošteva, kdaj in kje nastajajo emisije in spremembe zalog ogljika v lesnih izdelkih. Mejo sistema preučevanja predstavlja ozemlje izbrane države.

V izračunih smo uporabili revidirano metodo FOD (Pingoud in Wagner, 2006), ki jo opredeljujejo in ponazarjajo enačbe 1, 2 in 3.

$$C(i + 1) = e^{-k} \cdot C(i) + \left[\frac{(1 - e^{-k})}{k} \right] \cdot I(i) \quad (1)$$

$$\Delta C(i) = C(i + 1) - C(i) \quad (2)$$

$$k = \frac{\ln 2}{HL} \quad (3)$$

i – leto (z začetkom 1900) / Year (starting with 1900)

$C(i)$ – zaloga ogljika v lesnih izdelkih na začetku leta i (Gg C) / Carbon stock in wood products at the beginning of year i (Gg C)

k – konstanta pri FOD / FOD constant

$I(i)$ – vhod v zaloge lesnih izdelkov v letu i (Gg C leto⁻¹) / Inflow to wood products pool in year i (Gg C year⁻¹)

HL – razpolovna doba v letih ("half-life") / Half-life in years

Uporabo dvo-parametrne funkcije Weibull opredeljujejo enačbe 4, 5 in 6 (Lee in Wang, 2003).

$$F(t) = 1 - \left[e^{-\left(\frac{t}{\alpha}\right)^\beta} \right] \quad (4)$$

$$S(t) = \left[e^{-\left(\frac{t}{\alpha}\right)^\beta} \right] \quad (5)$$

$$\mu = \left[\Gamma \left(1 + \frac{1}{\beta} \right) \right] \cdot \alpha \quad (6)$$

$S(t)$ – preživetvena funkcija / Survival function

$F(t)$ – porazdelitvena funkcija / Cumulative distribution function

μ – povprečna življenjska doba / Average lifetime

α, β – parametra funkcije Weibull / Weibull function parameters

Parametra funkcije smo določili modelno. Vrednost β smo povzeli iz študij, ki so obravnavale dinamiko zalog za lesene elektro drogove (Stillman, 1994; Datla in Pandey, 2006). V vseh Weibull funkcijah smo uporabili vrednost $\beta = 4$. Vrednost α smo določili glede na izbrani življenjski dobi 30 in 43 let.

V raziskavi smo se omejili na izbrane proizvode, ki so količinsko najbolj pomembni, v skladu z delitvijo FAO. Izbrani proizvodi in pretvorbeni faktorji so prikazani v preglednici 1. Vsi prikazi in izračuni so podani v tonah ogljika.

Faktor, ki predstavlja količino ogljika v m³ izbranih skupin lesnih proizvodov, je bil izračunan iz gostot: za iglavce

Preglednica 1. Izbrani pretvorbeni faktorji izbranih skupin lesnih proizvodov ter primerjava z IPCC faktorji

Lesni proizvodi	Gostota (t/m ³)	Količina ogljika v m ³ (t C/m ³)	Količina ogljika v m ³ (t C/m ³) po IPCC (2006)
Žagan les iglavcev	0,47	0,20	0,225
Žagan les listavcev	0,72	0,32	0,295
Iverne plošče	0,65	0,293	0,294
Vlaknene plošče	0,84–1,00	0,378–0,450	0,294

smo uporabili gostoto za smrekovino in jelovino, pri listavcih smo upoštevali kot referenčno vrednost gostoto za bukovino. Pri ivernih in vlaknenih ploščah smo upoštevali podatke proizvajalcev ter časovno spreminjanje vrste proizvodov. Uporabljeni pretvorbeni faktorji so primerljivi s predlaganimi faktorji po IPCC (2006). Višja vrednost količin ogljika v m³ pri vlaknenih ploščah je posledica proizvodnje vlaknenih plošč z visoko gostoto.

Osnovni vhodni podatki izvirajo iz baz in rezultatov raziskovanj Statističnega urada RS ter lastnih raziskav. S pomočjo zgodovinskih podatkov in metode linearne interpolacije smo pridobili popolne časovne serije o proizvodnji, uvozu in izvozu za obdobje od leta 1900 do leta 2008.

REZULTATI IN RAZPRAVA

Največja akumulacija ogljika v lesnih proizvodih sovпада z največjim obsegom proizvodnje lesnih proizvodov med leti 1975–1985, v obdobju, ko je bila tudi gradnja stanovanj največja. Na sliki 1 se opazi eksponentna rast proizvodnje ivernih in vlaknenih plošč po letu 1946.

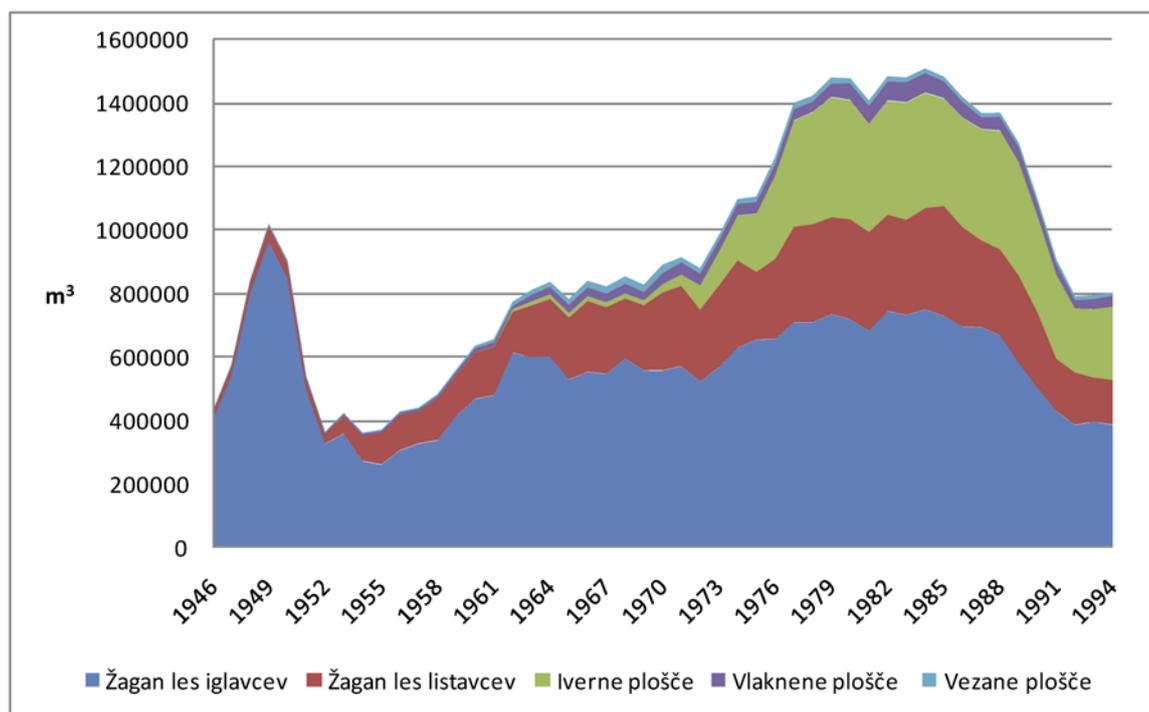
Za različne metode in različnimi upoštevanimi parametri je gibanje letne akumulacije ogljika v izbranih lesnih proizvodih prikazano na sliki 2. Razliko med vhodi in izhodi predstavlja letna akumulacija ogljika. Trend gibanja akumulacije ogljika je do začetka 90-ih let podoben, nato pa nastopijo med obravnavanimi metodami opazne raz-

like, ki so posledica predpostavk ter dejstva, da so izhodi lesnih proizvodov iz obdobja največje akumulacije obravnavani različno. Tako so opazne tri skupine krivulj. Prvo predstavljata modela Weibull in model s fiksno življenjsko dobo 30 let. Druga skupino predstavljata modela Weibull in model s fiksno življenjsko dobo 43 let, ki prikazuje večji obseg akumulacije ogljika. Tretjo skupino predstavlja model FOD, ki v zadnjih letih nakazuje srednjo vrednost akumulacije ogljika glede na prvi dve skupini (slika 2).

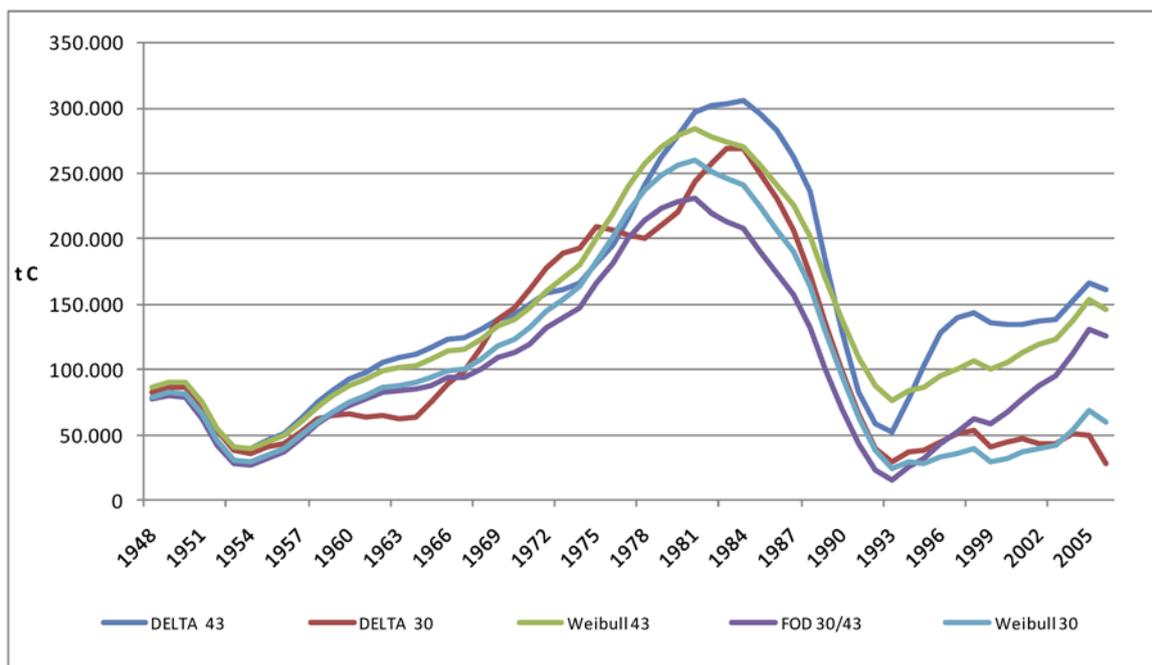
Z uporabo pristopa sprememb zalog ogljika (SCA) za najpomembnejše skupine lesnih proizvodov, v skladu s priporočili IPCC (2006), se letna akumulacija giblje med 1 % in 2 % letnih emisij toplogrednih plinov Slovenije. Rezultat je v okvirih rezultatov podobnih raziskav v Evropi, kjer se akumulacija ogljika v lesnih proizvodih (zajeti so tudi furnir in vezane plošče ter celuloza in papir) giblje med 1 % in 2 % (Kohlmeier in sod., 2007; Anonymus, 2009; Rüter, 2009).

Primerjavo ocen skladiščenja ogljika po dveh metodah (FOD in Weibull) in vpliv na rezultate prikazuje preglednica 2.

Kljub podobni računski zalogi ogljika v izbranih lesnih proizvodih je letna dinamika med obema metodama različna. Vzrokov za tako razhajanje je več, v prvi vrsti imata metodi izračuna različne predpostavke, ki lahko izrazito vplivajo na rezultat. Poleg tega je bila proizvodnja iz-



Slika 1. Proizvodnja izbranih lesnih proizvodov v obdobju 1946–1994; na podlagi arhivskih podatkov SURS obdelal M. Piškur



Slika 2. Spremembe zalog ogljika v izbranih lesnih proizvodih: žagan les, iverne in vlaknene plošče; petletne drseče sredine

branih lesnih proizvodov do 80-ih let prejšnjega stoletja naraščajoča, sledil je padec v 90-ih letih, nato pa zopet rast proizvodnje in rabe v Sloveniji. Razlike med izbranimi modeli so izrazite pri ivernih in vlaknenih ploščah (Slika 3). Vsi trije modeli, ki upoštevajo življenjsko dobo 30 let (v primeru FOD razpolovno dobo 30 let) kažejo na izrazit trend zmanjševanja akumulacije ogljika. Razlog je tudi v tem, da so bile največje stopnje akumulacije pred dobrimi 30-imi leti in naj bi po modelu sedaj izhajale iz sistema kot odslužen les.

Preglednica 2. Primerjava ocen skladiščenja ogljika po metodah FOD (HL = 30 let) in Weibull ($\mu = 30$ let) za leto 2008

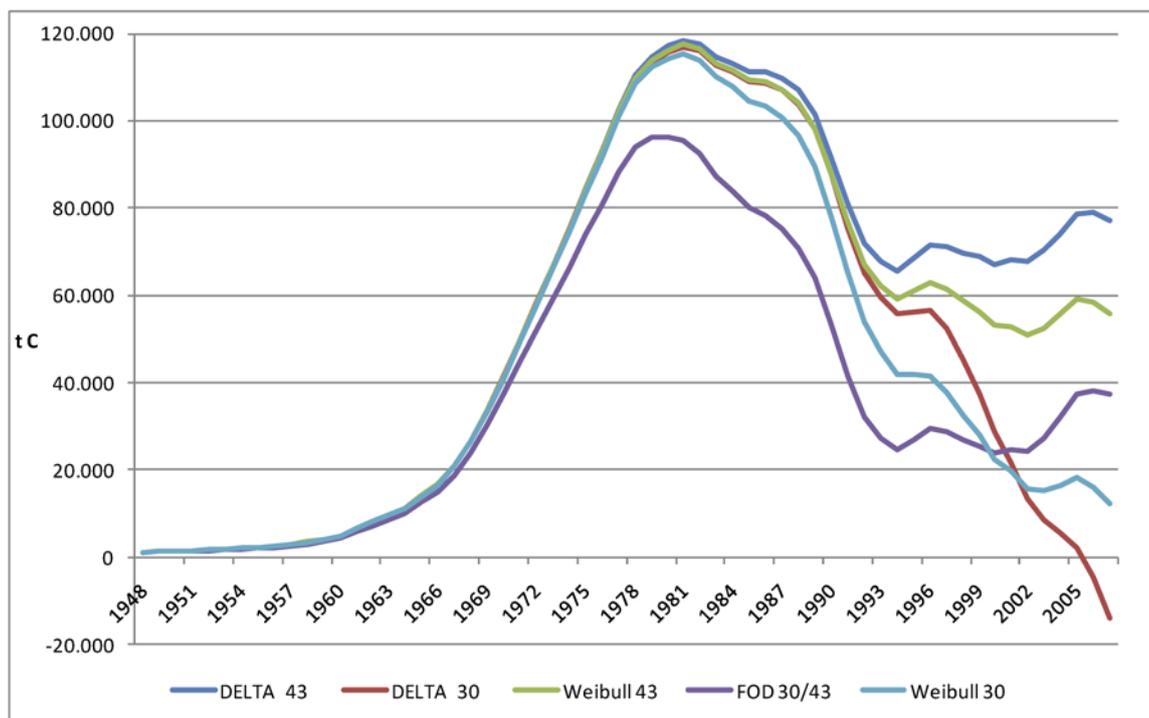
Lesni proizvod in metoda	Sprememba zalog (t C)	Zaloga C (v tonah)
Žagan les FOD	51.000	4.958.000
Iverne in vlaknene plošče FOD	43.000	2.243.000
Skupaj FOD (HL = 30 let)	94.000	7.201.000
Žagan les Weibull	7.000	4.780.000
Iverne in vlaknene plošče Weibull	16.000	2.647.000
Skupaj Weibull ($\mu = 30$ let)	23.000	7.427.000

Z raziskavo smo potrdili hipotezo, da imamo v Sloveniji še vedno akumulacijo ogljika v lesnih proizvodih, to potrjujejo rezultati po vseh uporabljenih modelih (Slika 2). Kažejo se slabosti metode FOD, na katero opozarjajo Marland in Marland (2003), Matthews in sod. (2007), Van der Voet in sod. (2002), med katerimi izstopata:

- ▶ vsi proizvodi imajo ne glede na starost proizvoda enako verjetnost za izhod iz sistema zalog,
- ▶ zaradi neupoštevanja pogojev za uporabo metode FOD, ki predvideva eksponentno rast rabe s časom in dovolj dolgo razpolovno dobo, lahko pride do nerealnih in celo povsem napačnih ocen izhodov.

Glede na ugotovitve Kleijna in sod. (2000) na primeru PVC na Švedskem, da so pomemben element pri napovedovanju količin odsluženega lesa podatki o gibanju rabe lesnih proizvodov v preteklosti ter življenjske dobe, menimo, da tudi naši rezultati potrjujejo te ugotovitve. Uporaba matematičnih funkcij v primerjavi s fiksnimi življenjskimi dobami zgladi ekstreme, trendi ostanejo podobni. Ocenjujemo, da je v našem primeru, zaradi predstavljenih velikih nihanj v rabi in/ali predelavi lesa, v prihodnih raziskavah bolj smiselna uporaba modela (funkcije) Weibull, ki prikazuje skladiščenje ogljika ločeno po letu proizvodnje posameznih lesnih izdelkov. Metoda FOD ima manjše ekstremne vrednosti, kar pa je lahko pri okoljskih raziskavah, na primer težkih kovin (Van der Voet, 2002), neustrezno.

V naši raziskavi vplivajo na rezultate tako izbor modela



Slika 3. Spremembe zalog ogljika v izbranih lesnih proizvodih: iverne in vlaknene plošče; petletne drseče sredine

kot tudi življenjske dobe lesnih proizvodov. Za izboljšanje ocen bi potrebovali vključitev še dodatnih skupin lesnih izdelkov (furnir in vezane plošče) ter dodatno preverjanje dejanske rabe in/ali predelave izbranih proizvodov, predvsem v obdobju po letu 1990. Da so podatki o proizvodnji in zunanji trgovini z izbranimi lesnimi proizvodi pomembni za izboljšanje ocen ugotavljajo tudi drugi avtorji (Skog in sod., 2004). Predstavljeni modeli nakazujejo splošne trende rabe, in v primeru Slovenije tudi v večji meri predelave, lesnih proizvodov. Kakšne so dejanske zaloge ogljika v lesnih izdelkih, rezultati modelov le nakazujejo, na Finskem so zaradi prevladujoče rabe lesnih proizvodov v gradbeništvu rezultati modelov bližje realnemu stanju, ki so ga na Finskem preverili tudi z direktno metodo izračuna zalog ogljika v različnih inventurnih letih – s tem so prilagodili vhodne parametre modela FOD (Pingoud in sod., 2001; Pingoud in sod., 2003). Menimo, da je direktna uporaba rezultatov za Slovenijo nekoliko bolj kompleksna zaradi predelave izbranih lesnih izdelkov v končne lesne izdelke (pohištvo), od katerih je bil velik delež izvožen, kar pa v izračunih ni upoštevano. Ocenjene zaloge tako predstavljajo kombinacijo zalog v Sloveniji in v primeru izvoženih končnih izdelkov tudi v tujini. Zaradi tega rezultati verjetno niso neposredno uporabni za napovedovanje količin odsluženega lesa – ocene so verjetno precenjene.

Na gibanje zalog ogljika v lesnih izdelkih ter predvsem na količine odsluženega lesa vplivajo v veliki meri tudi socialno ekonomski vplivi (BDP, tehnološki razvoj, rast prebivalstva ...). Tovrstne probleme preučujejo z dinamičnim modeliranjem zalog proizvodov, materialov in snovi, s katerimi na podlagi dinamične obravnave zalog v družbi (na primer svinca) raziskujejo prihodnje izhode (Elshkaki in sod., 2005).

SKLEPI

Pristopi, ki jih opredeljujejo navodila dobre prakse IPCC (2006) so pomembni z vidika primerljivosti med državami in prikazom relativnega pomena skladiščenja ogljika v lesnih izdelkih, na primer glede na letne emisije toplogrednih plinov. Pri interpretaciji je potrebna pazljivost in upoštevanje metodoloških posebnosti, v prvi vrsti ne-zajem zunanje trgovine končnih lesnih izdelkov (na primer pohištva).

Na podlagi rezultatov raziskave smo identificirali uporabnost posameznih metod za prikaz dinamike zalog ogljika v lesnih proizvodih. Zaradi velikih nihanj v proizvodnji v Sloveniji, nepopolnih podatkov o življenjskih dobah izdelkov, so tudi rezultati, še posebej v zadnjih letih, podvrženi veliki variabilnosti. Če želimo izboljšati tovrstne izračune, predvsem z vidika potencialnega upoštevanja akumulacije

ogljika v lesnih izdelkih v prihodnjih klimatskih sporazumih, potrebujemo dodatne raziskave predvsem na področjih:

- ▶ življenjskih dob izbranih končnih izdelkov (ostrejša, pohištvo);
- ▶ izdelave časovnih nizov o proizvodnji, uvozu in izvozu za vezan les in furnir ter na področju celuloze in papirja;
- ▶ podrobnejših analizah proizvodnje, uvoza in izvoza končnih izdelkov (pohištvo).

Predlagamo, da so rezultati o gibanju zalog ogljika v lesnih izdelkih pomemben indikator stanja rabe in predelave lesa v Sloveniji. Ker je bila, in je še, slovenska lesna industrija izrazit izvoznik končnih proizvodov, ocenjujemo, da so zato v raziskavi ocenjene zaloge precenjene.

Pregled nad tokovi lesa omogoča lesni industriji realno analizo stanja, ki lahko služi kot podpora pri izdelavi strategij in smernic prihodnjega razvoja panog, povezanih s pridobivanjem, predelavo in rabo lesa, v povezavi z realno oceno potencialov iz slovenskih gozdov, pa optimalno rabo enega najpomembnejših naravnih obnovljivih virov v Sloveniji.

Ocenjujemo, da bi morali na nacionalni ravni podpirati neodvisne raziskave tokov in rabe lesa, ne samo z vidika skladiščenja ogljika, temveč predvsem za spremljanje trendov in dinamike predelave in rabe lesa, usmeritev za načrtovanje v gozdarstvu ter napovedovanja tokov tako lesnih ostankov pri predelavi lesa kot tudi vrste odsluženega lesa.

ZAHVALA

Raziskava je bila izvedena v okviru ciljnega raziskovalnega programa (CRP) »Konkurenčnost Slovenije 2006–2013«: Pomen gozdno-lesne proizvodne verige za blaženje podnebnih sprememb (V4-0491) in programa P4-0015: Les in lignocelulozni kompoziti.

LITERATURA

1. **Anonymus (2007)** State of Europe's Forests 2007. The MCPFE report on sustainable forest management in Europe. MCPFE, UNECE in FAO. Varšava, 247
2. **Anonymus (2009)**. Informal submission by Sweden on behalf of the European community and its member states on forest data. Swedish Presidency of the European Union, Bangkok. 38 http://unfccc.int/files/kyoto_protocol/application/pdf/eululucf300909.pdf
3. **Datla S.V., Pandey M.D. (2006)** Estimation of life expectancy of wood poles in electrical distribution networks. *Structural Safety*, 28, 3: 304-319
4. **Dias A. C., Louro M., Arroja L., Capela I. (2007)** Carbon estimation in harvested wood products using a country-specific method: Portugal as a case study. *Environmental Science & Policy*, 10, 3: 250-259
5. **Elshkaki A., Van der Voet E., Holderbeke M., Timmermans V. (2004)** The environmental and economic consequences of the developments of lead stocks in the Dutch economic system. *Resources, Conservation and Recycling*, 42: 133-154
6. **Elshkaki A., Van der Voet E., Holderbeke M., Timmermans V. (2005)** Dynamic Stock modelling: A method for the identification and estimation of future waste streams and emissions based on past production and product stock characteristics. *Energy*, 30, 8: 1353-1363
7. **Elshkaki A. (2007)** Systems Analysis of Stock Buffering: Development of a Dynamic Substance Flow/Stock Model for the Identification and Estimation of Future Resources, Waste Streams and Emissions. Leiden, CML, 187
8. **Ford Robertson J. (2003)** Implications of Harvested Wood Products Accounting: Analysis of Issues Raised by Parties to the UNFCCC and development of Simple Decay Approach. MAF, Wellington, 30
9. **Gjesdal S.F.T., Flugsrud K., Mykkelbost T.C., Rypdal K. (1996)** A balance of use of wood products in Norway. Norwegian Pollution Control Authority SFT, Report 96:04, 54
10. **Golob A. (2007)** Nekaj scenarijev vplivov gozdne politike na kroženje ogljika na primeru Slovenije. *Gozdarski vestnik*, 65, 5/6: 254-260, 277-282
11. **Green C., Avitabile V., Farrell E. P., Byre K. A. (2006)** Reporting harvested wood products in national greenhouse gas inventories: Implications for Ireland. *Biomass and Bioenergy*, 30:105-114
12. **Guinée J., Van Oers L., Van der Voet E. (1997)** Cadmium in the Netherlands - a special case? Centre of Environmental Science (CML) Leiden University Leiden, CML report 136
13. **Hashimoto S., Moriguchi Y. (2004)** Data Book: Material and carbon flow of harvested wood in Japan. CGER-D034-2004. National Institute for Environmental Studies, Japan, Tsukuba, 40
14. **IPCC (2006)** 2006 IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories, Prepared by the National Greenhouse Gas Inventories Programme. Eggleston H.S., Buendia L., Miwa K., Ngara T. and Tanabe K. (eds). Published: IGES, Japan.
15. **Jaakko Pöyry Consulting (2000)** Analysis of Wood Product Accounting Options for the National Carbon Accounting System. Australian Greenhouse Office, National Carbon Accounting System Technical Report No. 24, 26
16. **Kleijn R., Huele R., Van der Voet E. (2004)** Dynamic substance flow analysis: the delaying mechanism of stocks, with the case of PVC in Sweden. *Ecological Economics*, 32, 2: 241-254
17. **Kohlmaier G. H., Kohlmaier L., Fries E., Jaeschke W. (2007)** Application of the stock change and production approach to Harvested Wood Products in the EU-15 countries: a comparative analysis. *Eur J For Res*, 126:209-223
18. **Krajnc N., Piškur M., Simončič P. (2006)** Ocena ponora CO₂ za spremembo rabe tal gozdarstvo v Sloveniji. V: Hladnik, David (ur.).

Monitoring gospodarjenja z gozdom in gozdnato krajino, (Studia forestalia Slovenica, št. 127). Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire, 53-64

19. **Laturi J., Mikkola J., Uusivuori J. (2008)** Carbon Reservoirs in Wood Products-in-Use in Finland: Current Sinks and Scenarios until 2050. *Silva Fennica*, 42, 2: 307-324
20. **Lee E. T., Wang J. (2003)** Statistical Methods for Survival Data Analysis. Wiley Series in Probability and Statistics, 3. Edition, John Wiley & Sons, New Jersey, 534
21. **Logar M., Verbič J., Krajnc N., Piškur M., Simončič P., Kušar G., Kobler A., Kurbus T., Kovač N. (2009)** Slovenia's national inventory report 2009: submission under the United Nations framework convention on climate change and voluntary submission under the Kyoto Protocol. Ljubljana. http://unfccc.int/national_reports/annex_i_ghg_inventories/national_inventories_submissions/items/4771.php.
22. **Marland E., Marland G. (2003)** The treatment of long-lived, carbon-containing products in inventories of carbon dioxide emissions to the atmosphere. *Environmental Science and Policy*, 6 (2): 139-152
23. **Matthews R. W., Robertson K. Marland G., Marland E., (2007)** Carbon in wood products and product substitution. In: *Forestry and climate change*, edited by P.H. Freer-Smith, M.S.J. Broadmeadow, J.M. Lynch. CAB International; Organization for Economic Cooperation and Development (OECD); Forestry Commission, Forest Research. Wallingford, Oxon: CAB International: 91-104
24. **Pingoud K., Perälä A. L., Pussinen A. (2001)** Carbon Dynamics in Wood Products. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 6: 91-111
25. **Pingoud K., Perälä A. L., Soimakallio S., Pussinen A. (2003)** Greenhouse gas impacts of harvested wood products: Evaluation and developments of methods. Tampere, VVT, 120
26. **Pingoud K., Wagner F. (2006)** Methane emissions from landfills and carbon dynamics of harvested wood products: The first-order decay revisited. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change* 11: 961-978
27. **Piškur M., Krajnc N. (2007)** Pomen gozdov in rabe lesa za bilanco CO₂ v Sloveniji. V: *Podnebne spremembe: vpliv na gozd in gozdarstvo*. Jurc, M. (ur.). (Studia forestalia Slovenica, št. 130). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire: 237-250
28. **Rüter S. (2009)** Estimation of net-emissions of Harvested Wood Products (HWP) for Slovenia. Working paper. Hamburg. vTI, 13
29. **Skog E. K. (2008)** Sequestration of carbon in harvested wood products for the United States. *Forest Products Journal*, 58, 6: 56-72
30. **Skog E. K., Pingoud K., Smith J. E. (2004)** A Method Countries Can Use to Estimate Changes in Carbon Stored in Harvested Wood Products and the Uncertainty of Such Estimates. *Environmental Management*, 33, 1: 65-73
31. **Stillman R. H. (1994)** Probabilistic Derivation of Overstress for Overhead Distribution In-Line Structures. *IEEE Transactions on Reliability*, 43, 3: 366-374
32. **Taverna R., Hofer P., Werner F., Kaufmann E. (2007)** The CO₂-Effects of the Swiss Forestry and Timber Industry. Scenarios of future potential for climate-change mitigation. Bern, Federal Office for the Environment, Environmental studies no. 0739, 102
33. **Van der Voet E. (1996)** Substances from cradle to grave: development of a methodology for the analysis of substances flows through the economy and the environment of a region: with case studies on cadmium and nitrogen compounds. Doctoral thesis. Leiden, CML, 226
34. **Van der Voet E., Kleijn R., Huele R., Ishikawa M., Verkuijlen E. (2002)** Predicting future emissions based on characteristics of stocks. *Ecological Economics*, 41: 223-234

NAVODILA AVTORJEM ZA PRIPRAVO PRISPEVKOV

1. PRISPEVKI

Revija Les objavlja izvirne in pregledne znanstvene ter strokovne prispevke s področja lesarstva, pohištvene industrije in z lesarstvom povezanih področij (arhitekture, oblikovanja, okolja, gradbeništva, etnologije ...). Vsi objavljeni prispevki so recenzirani. Za vsebino prispevka so odgovorni avtorji. O obliki in datumu objave članka odloča uredništvo.

2. OBSEG PRISPEVKOV

Prispevki morajo biti pripravljene v skladu s temi navodili. Znanstveni članki naj ne presegajo 18.000 znakov s presledki, po dogovoru z urednikom lahko le pregledni znanstveni članki obsegajo 27.000 znakov s presledki. Priporočena dolžina strokovnih člankov je 9.000 znakov s presledki. Za angleške prevode povzetkov so odgovorni avtorji. Uredništvo revije Les zagotovi lektoriranje slovenskih tekstov. Tekstov prispevkov, zgoščenk in disket avtorjem ne vračamo. Na zahtevo avtorja vračamo slikovno gradivo.

3. JEZIK

V reviji Les objavljamo znanstvene prispevke v slovenskem ali angleškem jeziku, strokovne pa le v slovenskem jeziku.

4. POVZETEK

Za izvirne in pregledne znanstvene članke, morajo avtorji pripraviti povzetek v angleščini in slovenščini. Pri tujejezičnih avtorjih, bo za slovenski povzetek poskrbelo uredništvo. Povzetek mora podati jedrnat informacijo o vsebini prispevka. Okvirno naj zajema 1.000 znakov s presledki.

5. KLJUČNE BESEDE

Ključnih besed je lahko največ 8. Predstaviti morajo področje raziskave, podane v članku. Napisane morajo biti v slovenskem in angleškem jeziku. Razvrščene naj bodo v abecednem redu slovenskih besed.

6. NASLOV ČLANKA

Naslov članka naj bo kratek in razumljiv. Pri izvornih in preglednih znanstvenih člankih, naj bo zapisan v slovenskem in angleškem jeziku. Za naslovom sledijo ime/imena avtorja/avtorjev (ime in priimek).

7. NASLOV AVTORJA/AVTORJEV

Pod imeni avtorjev naj bodo zapisane oštevilčene institucije od koder prihajajo avtorji prispevkov. Za vodilnega avtorja navedimo še naslov, telefonsko, faks številko in elektronski naslov.

8. PREGLEDNICE, GRAFIKONI IN SLIKE

Preglednice in slike naj bodo jasne; njihovo mesto mora biti nedvoumno označeno, njihovo število naj racionalno ustreza vsebini. Slike in preglednice morajo podpirati tekst. Vsi naslovi slik oziroma preglednic morajo biti navedeni v slovenskem in angleškem jeziku. Za angleške naslove preglednic in slik so odgovorni avtorji. Naslove preglednic pišemo nad preglednico, naslove slik pa pod slike.

Preglednica 1. Vpliv širine branik na gostoto smrekovega lesa

Slika 1. Poškodba hišnega kozlička (foto: J. Puhar)

9. LITERATURA IN VIRI

Pri znanstvenih prispevkih uporabljamo literaturo citiramo med besedilom, pri strokovnih pa ne. Več avtorjev istega dela citiramo po naslednjih načelih: delo do dveh avtorjev (Priimek in Priimek, leto) » npr. (Cankar in Prešeren, 1984); delo več kot dveh avtorjev (Priimek prvega avtorja in sod., leto), na primer (Kovač in sod., 2002). V kolikor ime avtorja kake trditve navedemo v tekstu, je dovolj če poleg zapišemo le letnico objave. V primeru da eno trditev podkrepimo z dvema ali več viri, jih razvrstimo po letnici objave in ločimo s podpičji (Cankar, 1992; Žgajner in sod., 1998). Standarde navajamo le s kratko standarda in letnico izdaje, na primer (SIST EN 113, 1996). Zakonodaja

navajamo s kratico, ki nastopa v uradnem listu (BPD 98/8/EC, 1998) (ZKem, 2006).

Kot vire navajamo le javno dostopno literaturo. Citiranje internih poročil, ekspertiz, neobjavljenih podatkov ni zaželeno. Literaturo uredimo po abecednem redu. Imena avtorjev pišemo odebelfeno:

- Članek: **Kovačič J., Prešeren M.** (2000) Relevantne lastnosti hrastovine. Les, 52: 369-373

- Knjiga: **Richardson H.W.** (1997) Handbook of copper compounds and applications. M. Dekker, New York, 325

- Poglavlje v knjigi: **Kai Y.** (1991) Chemistry of Extractives. V: Wood and Cellulosic Chemistry. Hon DNS (Ur.), Shiraishi N (Ur.), Marcel Dekker, New York, 215-255

- Zakonodaja: Biocidal Products Directive 98/8/EC (1998) Official Journal of the European Communities L 123:1-63

- Standard: EN 113 (1996) Wood preservatives; Determination of the toxic values against wood destroying basidiomycetes cultured on agar medium.

- Internetni vir: Pri dokumentih dostopnih le prek interneta, so elementi navedbe: avtor (če je znan), naslov dokumenta, leto, organizacija (če je znana), datum zadnje spremembe (če je znan), URL naslov, datum (dan ko smo dokument prebrali). Predstavitev Društva inženirjev in tehnikov lesarstva Ljubljana. (2004) DIT Ljubljana. <http://www.ditles.si/index1.htm> (3.12.2007)

12. LATINSKA IMENA TAKSONOV

Latinska imena rodov, vrst in intraspecifičnih taksonov pišemo v kurzivi – italic (*Picea abies* (L.) Karst.)

13. FORMAT IN OBLIKA PRISPEVKA

Članek naj bo pisan v formatu WinWord (.DOC ali .RTF), na A4 formatu, font Arial, velikost 11. Naslovi poglavij naj bodo odebelfeni. Prosimo, da tekst pišete enostolpčno in ga ne delite na okvire.

Zaradi pozicioniranja naj bodo risbe in fotografije vključene v tekst ter še dodatno (!) priložene kot slikovne datoteke (glej točko 15).

Prispevke pošljite v elektronski obliki (disketa, CD, DVD) na naslov uredništva (Karlovška 3, 1000 Ljubljana) ali po e-pošti na naslov revije. les@siol.net.

14. OBLIKOVANJE GRAFIKONOV

Če se le da, ne uporabljajte MS Excela, ker ne moremo nadzorovati parametrov grafikona (debelina črt, šrafure, velikost grafa itd.); priporočamo profesionalne programe za risanje grafikonov: Origin, SIGMA plot ... Zaradi pravilnega položaja naj bodo vsi grafični elementi vstavljeni tudi v tekst. Ozadje grafikona mora biti belo!

V kolikor gre za stolpičen diagram s samo eno vrsto stolpcev, naj bodo le-ti beli s črno obrobo; šrafure v tem primeru niso potrebne!

3D grafikoni niso zaželeni; če je možno, uporabljajte 2D grafikone.

15. OBLIKOVANJE SLIKOVNEGA GRADIVA

- Slikovno gradivo lahko digitaliziramo v uredništvu, medtem ko morajo za digitalizacijo dia pozitivov poskrbeti avtorji sami. Slika, narejena z digitalnim fotoaparatom mora imeti ločljivost vsaj 2,1 milijona pikslov (širina naj bo vsaj 8,4 cm - 1 stolpec - pri 300 DPI).

- Slike naj bodo skenirane pri ločljivosti 300 dpi.

- Vse slike morajo biti priložene (!) v originalnem TIFF, JPEG ali ustreznem grafičnem zapisu. Zaradi pravilnega položaja naj bodo vstavljene tudi v tekst.

- Vse fotografije naj bodo podnaslovljene in datirane z letnico.

- Risbe naj bodo izdelane v enem izmed računalniških risarskih programov (Corel DRAW, FreeHand itd.). Upoštevati je potrebno minimalno debelino črte, ki znaša 0,25 točke oziroma 0,15 mm. Slabih fotokopij in risb, narejenih s svinčnikom, ne sprejemamo. Če je mogoče, se izogibajte risanju v Wordu (zlasti raznih FLOW diagramov s funkcijo Draw), ker se pri različnih fontih oblika sesuje in je ni mogoče restavrirati niti izpisati. Največkrat nastopijo tudi težave pri izvozu v PDF datoteko. Za morebitne nasvete se obrnite na uredništvo.



Standardi FSC

Sistem certificiranja sledenja lesa za podjetja, ki uporabljajo gozdne surovine.

Potrdite svojo vrednost in postanite član mednarodne družine, prepoznane po vsem svetu!

Bureau Veritas Certification
tel.: 01 47 57 600
www.bureauveritas.si



Odgovorno ravnanje z gozdovi
FSC-ACC-020
© 1996 Forest Stewardship Council



BUREAU
VERITAS

Move Forward with Confidence

Si pripravljen na nov IZZIV?

Edina visokošolska institucija, kjer lahko pridobiš NAZIV



**Oddelek za
lesarstvo**
Biotehniška fakulteta
Univerza v Ljubljani



Magister inženir lesarstva

<http://les.bf.uni-lj.si/>

**V PRETEKLOSTI DREVESA
JE TVOJA PRIHODNOST**



cankarjev dom 30 let - *za kulturo
in kongres!*



revija o lesu in pohištvu

les

kazalo

uvodnik

raziskave in razvoj

- 141** Gozd in les za zmeraj!
Miha Humar, Hojka Kraigher
- 142** Kakovostno seme – kakovostni proizvodi
Marjana Westergren, Monika Konnert, Robert Brus, Hojka Kraigher
- 149** Poledenodobne migracije mikoriznih rastlin in glivnih partnerjev v simbiozi: primer rodu *Tuber*
Tine Grebenc, Marko Bajc, Hojka Kraigher
- 155** Identification of ectomycorrhizal types in a white poplar (*Populus alba* L.) plantation near Novi Sad
Marina Katanić, Saša Orlović, Tine Grebenc, Barbara Štupar, Zoran Galić, Branislav Kovačević, Hojka Kraigher
- 160** Vpliv interpretacije statusa drobnih korenin na oceno dolgoživosti drobnih korenin bukve (*Fagus sylvatica* L.)
Peter Železnik
- 164** Nastajanje lesa pri bukvah z dveh rastišč na različnih nadmorskih višinah
Peter Prislán, Martin Zupančič, Luka Krže, Jožica Gričar, Katarina Čufar
- 171** Povezava med razmerjem stabilnih izotopov ogljika v braniki in okoljskimi dejavniki
Polona Hafner, Tom Levanič
- 179** Invazivni škodljivi organizmi spreminjajo gozd
Nikica Ogris
- 183** Dinamika ogljika v gozdnih ekosis temih : študija primera za bukov gozd v JV Sloveniji
Urša Vilhar, Tine Grebenc, Primož Simončič, Hojka Kraigher
- 189** Meritve neto izmenjave ogljika za zaraščajoče se travišče na Krasu v JZ Sloveniji
Mitja Ferlan, Klemen Eler, Dominik Vodnik, Primož Simončič, Franc Batič
- 192** Vsebnost skupnih fenolov v beljavi, rdečem srcu in poranitvenem lesu pri bukvi (*Fagus sylvatica*)
Viljem Vek, Primož Oven, Gregor Rep
- 198** Nova NMR metoda za natančno in hitro določevanje vlažnosti lesa
Maks Merela, Igor Serša, Urša Mikac, Primož Oven
- 203** Vpliv širine branik hrastovine in deleža ekstraktivov na naravno odpornost proti glivam razkrojevalkam lesa
Boštjan Lesar, Martin Zupančič, Franc Pohleven, Primož Oven, Miha Humar
- 209** Optimizacija utekočinjanja bio mase z glicerolom in karakterizacija nastalih hlapnih produktov
Franc Budija, Lucija Zupančič Kralj, Marko Petrič
- 216** Mikoremediacija lindana v tekočih kulturah gliv *Pleurotus ostreatus* in *Hypoxyton fragiforme*
Ajda Ulčnik, Lucija Zupančič Kralj, Črtomir Tavzes, Franc Pohleven
- 222** Bistvene lastnosti viskoelastično toplotnozgoščenega (VTC) lesa za njegovo uporabo v lesnih kompozitih
Andreja Kutnar, Frederick A. Kamke, Milan Šernek
- 228** Dinamika zalog ogljika v lesnih izdelkih v Sloveniji
Mitja Piškur, Miha Humar
- 236** Navodila avtorjem za pripravo prispevkov