

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

ZAKLJUČNA NALOGA
PREIZKUŠANJE RAZLIČNIH METOD ZA IZOLACIJO
EKSOGENE DNA IZ NEINVAZIVNO ODVZETIH
VZORCEV

LUKA DUNIŠ

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

Zaključna naloga

**Preizkušanje različnih metod za izolacijo eksogene DNA iz
neinvazivno odvzetih vzorcev**

(Testing of different methods for isolating exogenous
DNA from non-invasively collected samples)

Ime in priimek: Luka Duniš
Študijski program: Biodiverziteta
Mentor: prof. dr. Elena Bužan
Somentor: asist. Felicita Urzi

Koper, september 2019

Ključna dokumentacijska informacija

Ime in PRIIMEK: Luka DUNIŠ

Naslov zaključne naloge: Preizkušanje različnih metod za izolacijo eksogene DNA iz neinvazivno odvzetih vzorcev

Kraj: Koper

Leto: 2019

Število listov: 35 Število slik: 11 Število tabel: 4

Število referenc: 88

Mentor: prof. dr. Elena Bužan

Somentor: asist. Felicita Urzi

Ključne besede: arbuskularna mikoriza, AM, kopitarji, izolacija DNA, SSU, PCR

Izvleček:

Mikorizne glive so simbionti večine kopenskih rastlin. Simbiotsko razmerje med mikoriznimi glivami in koreninami rastlin omogoča izmenjavo mineralov in hranil. pomembni vektorji za prenos in distribucijo gliv v različna okolja z njihovimi iztrebki. V zaključni nalogi smo želeli raziskati, kateri izolacijski kit istega proizvajalca je bolj primeren za izolacijo glivne DNA iz iztrebkov srnjadi in jelenjadi. Primerjali smo kite po koncentraciji izolirane DNA in po uspešnosti pomnoževanja z NS31 in AM1 primerji. Optimizirali smo tudi temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov pri kvantitativnem PCR. Rezultati so pokazali, da je Qiagen DNeasy PowerSoil kit boljši od Qiagen QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit, glede boljšega pomnoževanja s PCR. Dokazali smo, da so lahko iztrebki prostoživečih kopitarjev dober vir glivne DNA za preučevanje združbe mikoriznih gliv.

Key words documentation

Name and SURNAME: Luka DUNIŠ

Title of the final project paper: Testing of different methods for isolating exogenous DNA from non-invasively collected samples

Place: Koper

Year: 2019

Number of pages: 35 Number of figures: 11 Number of tables: 4

Number of references: 88

Mentor: Prof. Elena Bužan, PhD

Co-Mentor: Assist. Felicita Urzi

Keywords: arbuscular mycorrhiza, AM, ungulates, DNA isolation, SSU, PCR

Abstract:

Mycorrhizal fungi are symbionts of most terrestrial plants. The symbiotic relationship between mycorrhizal fungi and plant roots allows the exchange of minerals and nutrients. Large mammals are important vectors for the transfer and distribution of fungi to different environments with their feces. In our paper, we wanted to compare which isolation kit from the same manufacturer is better suited for isolating fungal DNA from roe deer and red deer feces. We compared the kits by comparing the concentration of isolated DNA and the amplification success using the NS31 and AM1 primers. Further, we optimized the annealing temperatures of the PCR. The results showed that the Qiagen DNeasy PowerSoil kit is better than the Qiagen QIAamp Fast DNA Stool Mini kit, in terms of better PCR amplification. We have shown that feces of wild ungulates can be a good source of fungal DNA for the study of mycorrhizal fungi communities.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Eleni Bužan za mentorstvo in za vse predano znanje skozi vsa leta študija. Nato se iskreno zahvaljujem somentorici asist. Feliciti Urzi za pomoč pri laboratorijskem delu, obema pa tudi za pomoč pri sestavljanju zaključne naloge.

Zahvaljujem se vsem članom Laboratorija za molekularno ekologijo UP FAMNIT, ki so mi pomagali z nasveti, predvsem Sandri Potušek za pomoč pri laboratorijskem delu in študentki Etian Nedić za pomoč pri izolaciji vzorcev.

Zahvaljujem se vsem profesorjem in asistentom za vse predano znanje skozi vsa leta študija.

Zahvaljujem se družini in prijateljem za vso podporo med študijem.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD.....	1
1.1	Živali kot vektorji eksogene DNA.....	1
1.2	Živali kot vektorji mikoriznih gliv.....	1
1.2.1	Nevretenčarji	2
1.2.2	Vretenčarji	2
1.3	Izolacija molekul DNA iz okoljskih vzorcev.....	4
1.3.1	Iztrebki.....	5
1.4	Problematika izolacije molekul DNA.....	5
1.5	Trenutne metode za analizo glivnih združb z DNA barkodami	5
1.5.1	Glomeromycota	6
2	NAMEN, CILJI IN HIPOTEZE.....	8
3	MATERIALI IN METODE	9
3.1	Vzorci.....	9
3.2	Izolacija molekule DNA	9
3.2.1	Kit 1 – Stool kit	10
3.2.2	Kit 2 –Soil kit	11
3.3	Koncentracija DNA	12
3.4	Polimerazna verižna reakcija (PCR).....	12
3.4.1	Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR)	12
3.5	Analiza regije SSU.....	13
3.6	Statistična analiza	13
4	REZULTATI	13
4.1	Analiza koncentracije izolirane DNA.....	13
4.2	Analiza regij SSU	14
4.2.1	Optimizacija temperatur s qPCR.....	15
5	DISKUSIJA IN ZAKLJUČEK.....	18
6	LITERATURA IN VIRI.....	21

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Temperaturni protokol verižnih reakcij s polimerazo (PCR)	12
Preglednica 2: Koncentracije DNA	13
Preglednica 3: Rezultati statistične analize	14
Preglednica 4: Rezultati Mann-Whitney U testa	14

KAZALO SLIK IN GRAFIKONOV

Slika 1: Genske regije, uporabljene v študijah, osredotočene na različne taksone. rRNA označuje ribosomalno RNA, MT označuje mitohondrijske gene in CL označuje kloroplastne gene (Lear in sod., 2018)	6
Slika 2: Regija SSU (Jiang in sod., 2015)	7
Slika 3: Mesto odvzema vzorcev srnjadi (rdeče) in jelenjadi (modro) (Al Sayegh - Petkovšek in sod., 2019).....	9
Slika 5: Gel elektroforeza vzorcev, izoliranih s Soil kitom, dolžina lestvice je 1 kbp.....	15
Slika 6: Gel elektroforeza izbranih vzorcev, dolžina lestvice je 1 kbp.	15
Slika 7: Temperaturni profil za (kvantitativni) qPCR	16
Slika 8: Rezultati vseh 12 temperaturnih profilov	16
Slika 9: Rezultati najbolj učinkovitih temperatur prileganja, 56,7 do 58 °C.	16
Slika 10: Analiza z gelsko elektroforezo temperaturnih profilov od 56,7 do 58 °C, dolžina lestvice je 1 kbp	17
Slika 11: Primerjava uspešnosti pomnožitve DNA pri temperaturi prileganja od 55 do 58 °C.....	17

SEZNAM KRATIC

AM – arbuskolarne mikorizne glive

ECM – ektomikorizne glive

PCR – verižna reakcija s polimerazo

Soil kit – Qiagen DNeasy PowerSoil Kit

Stool kit – Qiagen QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit

DNA – deoksiribonukleinska kislina

RNA – ribonukleinska kislina

SSU – *Small subunit*, Mala podenota ribosoma

rRNA – ribosomalna RNA

qPCR – kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času

ITS – notranja prepisana regija, angl. *Internal Transcribed Spacer*

1 UVOD

Neinvazivno zbrani vzorci pogosto vsebujejo majhne količine DNA ciljne vrste, kakor tudi bakterijsko DNA, DNA organizmov, s katerimi se je žival hranila, in snovi, ki lahko zavirajo PCR (Eggert in sod., 2005). Zato takšni vzorci predstavljajo pomemben vir za analizo ne samo gostiteljske DNA temveč tudi drugih oblik DNA (po navadi mikrobne ali pa DNA plena), ki ne prihajata od organizma samega.

1.1 Živali kot vektorji eksogene DNA

Z izrazom eksogena DNA je mišljena vsa DNA, ki jo najdemo v nekem organizmu, ki ni od organizma samega. Eksogena DNA izvira predvsem iz bakterij in virusov, ki žival potrebujejo za lasten cikel razmnoževanja, vendar lahko izvira tudi iz rastlin ali gliv (Ghasemzadeh in Namazi, 2015; Harder in Wilson, 1998; Ingold, 1953; Schupp, 1993). Eksogena DNA je pri rastlinojedcih odvisna od njihovega načina prehranjevanja, najpogostejša je iz plodov. Žival semen ne prebavi, zato se nepoškodovana izločijo v blatu, daleč od starševske rastline. Disperzija semen je zelo pomembna za rastline, saj omogoča potomcem večje možnosti preživetja, ker ni kompeticije s starševsko rastlino in jim omogoča kolonizacijo novih območij (Harms in sod., 2000; Manzano in Malo, 2006). Godoy in Jordano (2001) sta z uporabo DNA, izolirane iz semen, najdenih v iztrebkih, uspela identificirati izvorno drevo, s katerega je seme prišlo. Takšna vrsta analize omogoča tudi preučevanje migracij živali, ki se prehranjujejo s plodovi. Glive predstavljajo še en vir eksogene DNA, saj spore preživijo pot skozi prebavni trakt in se izločijo v iztrebkih (S. J. Nuske in sod., 2017a).

1.2 Živali kot vektorji mikoriznih gliv

Mikorizne glive so simbionti večine kopenskih rastlin. Simbiotsko razmerje se tvori med mikoriznimi glivami in koreninami rastlin. Razmerje omogoča izmenjavo mineralov in hranil (Dighton in White, 2017).

Poznamo tri tipe mikoriznih združb, ki se bistveno razlikujejo v načinu življenja, reproduktivnem ciklu in razširjanju. Arbuskularne mikorizne (AM) glive se razmnožujejo z velikimi nespornimi sporami, ki se tvorijo v tleh (Oehl in sod., 2011). Ektomikorizne (ECM) glive se razmnožujejo z meiosporami, ki se nahajajo v sporokarpu (Horton, 2017). Tretji tip pa so še erikoidne mikorizne glive (Cairney in Meharg, 2003), o katerih še ni veliko raziskanega (Kjøller in sod., 2010). Fungivori so živali, ki se hranijo z glivami in so najpomembnejši razpršilci spor (Johnson, 1996). V nadaljevanju bodo predstavljene samo najbolj pomembne skupine.

1.2.1 Nevretenčarji

1.2.1.1 Mezofavna

Kot fungivore lahko upoštevamo talno mezofavno in makrofavno. Najbolj pogosti predstavniki mezofavne so skakači (Collembola) in roženaste pršice (Oribatida). Skakači se večinoma prehranjujejo z glivami, z AM in z ECM glivami (Rabatin in Stinner, 1988; Yamashita in Hijii, 2003). Roženaste pršice se večinoma prehranjujejo z micelijem (Schneider in sod., 2005). Pri obeh skupinah so opazili endozoohorijo in epizoohorijo, kjer je epizoohorija boljši način transporta spor, saj je preživetje spor večje (Anslan in sod., 2016).

1.2.1.2 Makrofavna

Makrofavna predstavlja večjo vlogo pri razširjanju mikoriznih gliv kot mezofavna. Deževniki so pomembni vektorji AM gliv. Številne študije so pokazale, da deževnikovi izločki vsebujejo večje število spor kot bližnja prst (Brown, 1995). Druga skupina, ki pripomore k razširjanju mikoriznih gliv, so enakonožci (Isopoda), bolj specifično podred Oniscidea (prašički) (Hassall in sod., 1987). Rabatin in Stinner (1985) so našli spore v velikem številu ujetih prašičkov, več kot 50 % spor je bilo še vedno viabilnih, saj prebavni trakt prašičkov ni dovolj učinkovit, da bi jih prebavil (Rabatin in Stinner, 1988).

1.2.1.3 Nevretenčarji s pretežno nadzemnim načinom življenja

Tretja skupina nevretenčarjev, ki jih lahko upoštevamo kot vektorje za razširjanje gliv, so nevretenčarji s pretežno nadzemnim načinom življenja. Sem štejemo polže (kopenske mehkužce – Mollusca), larve dvokrilcev (Diptera) in hrošče (Coleoptera) (Sevcik, 2003, 2010; Wolf in Wolf, 1939). Polži se prehranjujejo z ECM glivami, večje vrste s sporokarpi, manjše vrste pa s hifami (Welter-Schultes, 2012). Različne vrste dvokrilcev odlagajo jajca na sporokarpe, s katerimi se larve po izvalitvi hranijo. V večini primerov ličinke ali odrasli nenamerno prenesejo spore z enega sporokarpa na drugega ali s sporokarpa na tla (Sevcik, 2010). Houston in Bougher (2010) sta našla spore AM gliv in podzemnih gob v 10 vrst hroščev. Jacobsen, Kauserud, Sverdrup - Thygeson, Bjorbækmo, & Birkemoe, (2017) so dokazali, da hrošči, ki se prehranjujejo z detritom, lahko prenašajo spore gliv, takšen transport je lahko tudi pomemben za prenos ECM gliv s sporokarpov na druge hlode.

1.2.2 Vretenčarji

1.2.2.1 Ptice in plazilci

Več avtorjev (Cooper in Vernes, 2011; Correia in sod., 2019; McIlveen in Cole Jr., 1976) poroča o tem, da se ptice in plazilci hranijo s sporokarpi ECM gliv. McIlveen in Cole Jr. (1976) poročata o prisotnosti spor AM gliv v gnezdu lastovk in taščic. Correia in drugi (2019) so prikazali istočasno prenašanje semen robide (*Rubus sp.*) in AM gliv, ki jih

opravljajo taščice in penice. Nielsen in sod. (2016) so predlagali, da gosi pomagajo pri širjenju AM gliv med otoki.

1.2.2.2 Sesalci

Za veliko skupin sesalcev, kot so vrečarji (Marsupialia), glodavci (Rodentia), rovke (Soricidae), sodoprsti kopitarji (Artiodactyla), zveri (Carnivora), in primati (Primates), je znano, da uživajo sporokarpe ECM gliv (Claridge in Trappe, 2005; Luoma in sod., 2003; Urban, 2016; Zambonelli in sod., 2017). Vretenčarje lahko delimo na preferencialne, oportunistične ali naključne fungivore (Claridge in Trappe, 2005). Preferencialno uživanje gliv je bilo opaženo predvsem v Severni Ameriki pri družinah Sciuridae, Cricetidae in v Avstraliji pri vrečarjih družine Potoroidae (Claridge in Trappe, 2005; S. J. Nuske in sod., 2017b; Urban, 2016; Zambonelli in sod., 2017). V Avstraliji so odkrili, da več kot 50 vrst sesalcev v devetih družinah uživa glive, večina je oportunističnih fungivorov (S. J. Nuske in sod., 2017b). Veliko glodavcev severne in južne poloble, ki jih lahko dodelimo tej skupini, občasno uživa glive v znatnih količinah. Ta način uživanja gliv je značilen tudi za večje sesalce, kot so sodoprsti kopitarji, zveri in primati (Claridge in Trappe, 2005; Luoma in sod., 2003). Večina sesalcev uživa obsežno število vrst, ki so prisotne na območju nahajanja (Claridge in Trappe, 2005). Vendar so nekateri avtorji opazili preferenco do specifičnih glivnih vrst, npr. Schickmann in drugi (2012) so ugotovili preferenco do *Tuber cf. puberulum*, ki jo v prehrano preferenčno uvrščajo rovke.

Naključno disperzijo spor so opazili pri več skupinah sesalcev. Opazili so, da se veverice prehranjujejo samo s peridijem nekaterih vrst ECM gliv in zavržejo spore, ki se nato razširijo (Trappe in Maser, 1977). Drugi način naključne disperzije je kopičenje gliv, ki ga opravljajo mali sesalci, kar lahko razširi območje disperzije spor, še posebej če pride do kraje ali ponovnega kopičenja, ki ga opravljajo drugi sesalci ali ptiči (Maser in sod., 2008; Vernes in Poirier, 2007). Na splošno ima vsaka žival, ki se približa sporokarpu, možnost razpršiti spore, ne glede na to, ali ga zaužije ali lovi fungivore.

Sesalci razširjajo tudi AM glive. Viabilne spore so bile najdene v iztrebkih slonov (*Loxodonta africana*) (Paugy in sod., 2004). Glodavci in vrečarji so tudi vektorji spor AM gliv (Janos in sod., 1995; Vernes in sod., 2015).

1.2.2.3 Prehranjevalni spleti, ki vključujejo fungivore

Spore mikoriznih gliv se lahko razširjajo tudi prek prehranjevalnih spleto, ki vključujejo fungivore in njihove plenilce (Claridge in Trappe, 2005; Luoma in sod., 2003; Zambonelli in sod., 2017). Claridge in Trappe (2005) sta predpostavila, da se lahko spore gliv raznašajo na dolge razdalje s sovo *Strix occidentalis caurina*, ki lovi letečo veverico *Glaucomys sabrinus*, ki se pretežno prehranjuje z nadzemnimi glivami. Spore gliv so našli

tudi v iztrebkih kune *Martes pennanti* skupaj z ostanki fungivornih glodavcev (Zielinski in sod., 1999). V drugi raziskavi sta Lilleskov in Bruns (2005) našla spore v prehranjevalnem spletu s stonogami (Chilopoda), kalifornijskim pupkom (*Taricha sp.*, Salamandridae) in eno vrsto brezpljučarja (*Batrachoseps attenuatus*, Plethontidae).

1.2.2.4 Kopitarji

Bizon (*Bison bison*) je največja vrsta, ki je imela viabilne AM glive v svojih iztrebkih. Bizon se je izkazal kot pomemben vektor AM gliv v Nacionalnem parku Yellowstone (Lekberg in sod., 2011). Poleg bizona so pomemben vektor za AM glive tudi losi (*Cervus canadensis*), ki so pomagali pri ponovnem naseljevanju vulkanskega območja, ki je nastal po izbruhu gore St. Helens v Washingtonu (Allen, 1987). Ashkannejhad in Horton (2006) sta odkrila, da srne razširjajo spore ECM gliv, ki so pomembne za ustanavljanje gozda borovcev, kjer micelarne mreže niso prisotne. To kaže na to, da imajo ECM glive posebne ekološke prilagoditve in so pomembne za sukcesijo v ostrih ali zgodnjih habitatih. Interakcija z lokalnimi vrstami je za tuje vrste lahko pomembna, še posebej za vrste, ki potrebujejo obveznega mutualista, kot so borovke (Pinaceae) in ECM glive. Raziskovalci so preučevali vlogo tujih sesalcev; divjega prašiča (*Sus scrofa*), navadnega jelena (*Cervus elaphus*) in damjaka (*Dama dama*) pri razširjanju spor ECM gliv na otoku Isla Victoria v Argentini, kjer je bilo vnesenih veliko vrst borovk. Divji prašič je glavna žival, ki razpršuje glive in morda igra ključno vlogo pri ustanavljanju in širjenju borovk (Nuñez in sod., 2013). Divji prašiči so pomembni tudi za disperzijo *Tuber aestivum* (tartuf). Dokazano je bilo tudi, da prehod skozi prebavni trakt ne zmanjša viabilnosti spor, ampak jo poveča, saj avtorji domnevajo, da prehod delno razgradi sporo sten (Piattoni in sod., 2014). Še v dveh raziskavah so ugotovili interakcije med sesalci, ECM glivami in rastlinami. Ugotovitve kažejo, da introdukcija tujerodnih sesalcev olajša sočasno invazijo invazivnih dreves in ECM gliv, medtem ko ni dokazov, da bi ti sesalci koristili domačim drevesom ali glivam. Ta nov tridelni »vdorni zlom« (angl. »invasional meltdown«), ki ga sestavljajo taksoni iz treh kraljestev in treh celin, izpostavlja nepredvidene posledice globalne biotske homogenizacije (Livne - Luzon in sod., 2017; Wood in sod., 2015).

Gębczyńska (1980) in Claridge in Trappe (2005) so dokazali, da se jeleni (*Cervus elaphus*) in srne (*Capreolus capreolus*) prehranjujejo z mikoriznimi glivami. Vendar o disperziji mikoriznih gliv, ki naj bi jo opravljale srne, še ni bilo opravljenih raziskav.

1.3 Izolacija molekul DNA iz okoljskih vzorcev

Tradicionalna metoda gojenja mikrobnih združb iz okoljskih vzorcev ima omejitve, ker velikega odstotka mikrobov ni mogoče gojiti, medtem ko analiza DNA in amplificirana ribosomalna RNA, povezana z okoljski vzorci, nam poda bolj natančne genetske informacije, potrebne za opis mikrobne raznolikosti teh zapletenih združb (Torsvik in sod.,

1990). Neposredna ekstrakcija DNA iz okoljskih vzorcev omogoča vrednotenje različnih zunajceličnih in medceličnih nukleinskih kislin iz bakterij, rastlin in gliv (Picard in sod., 1992; Steffan in sod., 1988).

1.3.1 Iztrebki

Izolacija DNA iz neinvazivno odvzetih vzorcev je lahko zahtevna, metode izolacije pa so prilagoditve že obstoječih protokolov za izolacijo drugačnih vzorcev. Protokoli, namenjeni izolaciji DNA iz iztrebkov, so prilagojeni tako, da se da na začetku izolacije homogenizirane vzorce v lizni pufer, ki po inkubaciji na 70 °C (tudi do 95 °C) uniči bakterijske celice in druge patogene. V naslednjih korakih se izločijo še snovi, ki so škodljive za DNA (Eggert in sod., 2005).

1.4 Problematika izolacije molekul DNA

Učinkovitost izolacije DNA je odvisna od lastnosti vzorca, ki ga preučujemo. Glavni cilj izolacije DNA je pridobiti največjo stopnjo ohranjenosti DNA in s tem najbolj reprezentativno DNA za naš vzorec. Vendar pa imajo vse metode ekstrakcije pomanjkljivosti, kot so nepopolna liza celične DNA, ekstrakcija encimskih inhibitorjev iz tal in izgube, razgradnje ali poškodbe DNA. Poleg tega vsak korak čiščenja, kot so postopki za čiščenje DNA pred molekularnimi študijami, neizogibno povzroča izgubo DNA (Roose - Amsaleg in sod., 2001).

1.5 Trenutne metode za analizo glivnih združb z DNA barkodami

Notranja prepisana regija (ITS, angl. *Internal transcribed spacer*, ki vsebuje ITS1, 5.8S in ITS2) je bila na podlagi temeljite analize Schocha in sod. (2012) sprejeta kot najprimernejša regija za barkodiranje večine gliv. Uporabljajo se tudi druge regije, zlasti 18S (mala podenota ribosoma, SSU angl. *Small subunit*) rRNA, vendar ima ta regija manj hipervariabilnih regij, ki omejujejo sposobnost razlikovanja med sorodnimi taksoni (Chu in sod., 2016; Schoch in sod., 2012). Z uporabo začetnih oligonukleotidov ITS1F in ITS4 je mogoče pomnožiti celotno ITS1-5.8S-ITS2 regijo in s sekveniranjem enega ali drugega konca pridobiti fragmente od ITS1 ali ITS2 (Koele in sod., 2014; White in sod., 1990). Celotna ITS1-5.8S-ITS2 regija je predolga za tehnike metabarkodiranja s platformo Illumina, zaradi česar je treba še pomnožiti ITS1 ali ITS2 regijo. Obe regiji se uporabljata za metabarkodiranje, ampak se najdene združbe gliv razlikujejo (Nilsson in sod., 2009). V neposredni primerjavi ITS1 in ITS2 so Bazzicalupo in sod. (2013) ugotovili, da je imela ITS2 večje medvrstne variabilnosti od ITS1. ITS2 ima tudi več podatkov v GenBank podatkovni bazi zaporedij (Nilsson in sod., 2009). Končni del ITS2 (proti 28S regiji) je bolj variabilen od 18S in 5.8S regij (Nilsson in sod., 2009; Schoch in sod., 2012). Zato je lahko ITS2 regija z razširitvijo barkode v veliko podenoto rRNA (28S, LSU angl. *Large subunit*) boljše za razlikovanje vrst (Lear in sod., 2018).

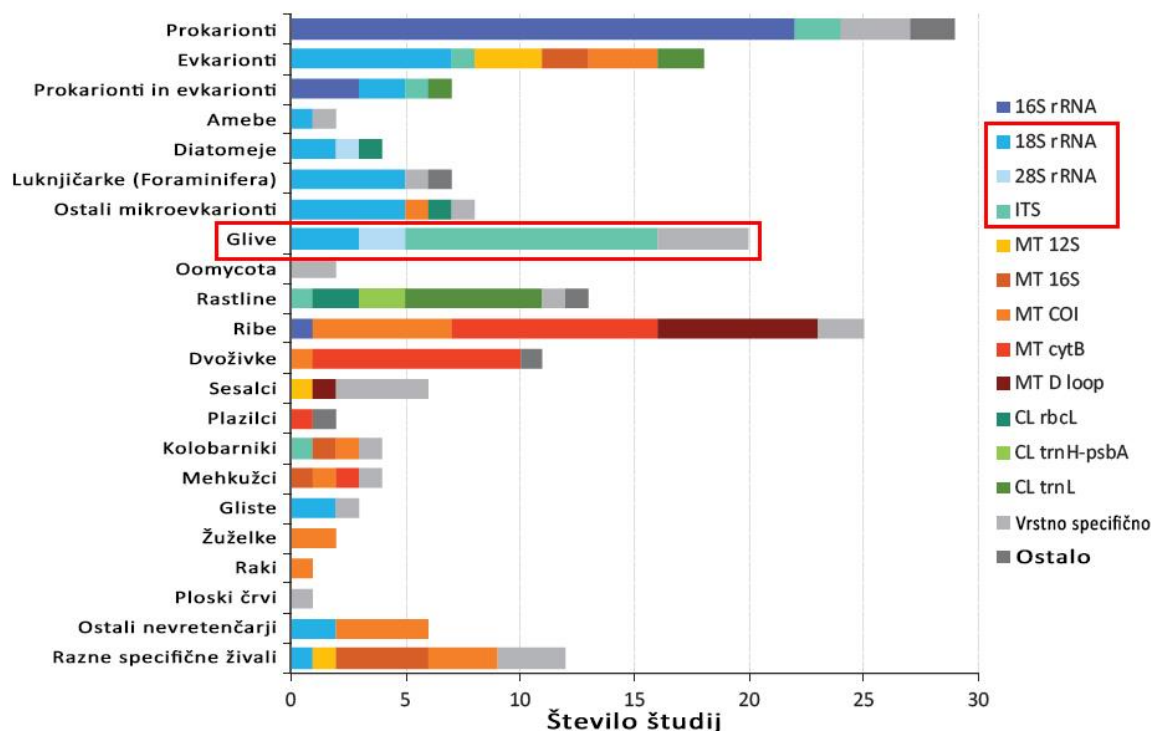
1.5.1 Glomeromycota

Glomeromycote so pri študijah metabarkodiranja malo zastopane, tudi ko se uporabljajo primerji, specifični za glive (Dickie in St John, 2016).

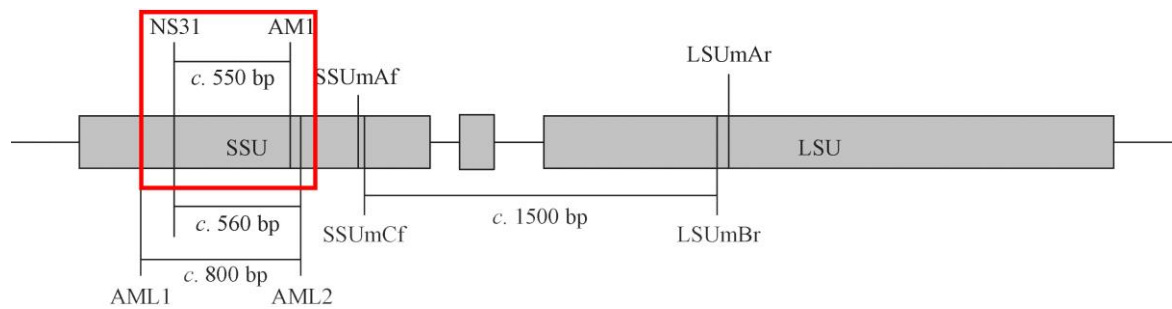
Glomeromycota tvori arbuskularno mikorizo z več kot 2/3 vrst kopenskih rastlin, vključno s številnimi kulturnimi in vrtnarskimi rastlinami. Zato je pomembno vključevanje teh gliv v študije metabarkodiranja, zlasti v kmetijskih krajinah, čeprav vsebujejo razmeroma malo rastlinskih vrst (Brundrett, 2009; Davison in sod., 2015). Problematika uporabe nekaterih ITS primerjev, priporočenih za glive, je, da je ujemanje v GenBanku samo 68 % s sekvencami gliv iz skupine Glomeromycota (Ihrmark in sod., 2012), zato Hart in sod. (2015) menijo, da ITS regija ni najbolj primerna za prepoznavanje gliv iz skupine Glomeromycota. Da ne spregledamo gliv iz skupine Glomeromycota, so potrebne posebne metode za vključevanje tega taksona (Lear in sod., 2018).

Hart in sod. (2015) so zaključili, da ni popolne genske regije za metabarkodiranje gliv iz skupine Glomeromycota, najbolj uporabljena je polimorfna regija V3-V4 18S rRNA, ki ima tudi najbolj obsežno podatkovno bazo sekvenc (Öpik in sod., 2010).

Problematika pomnoževanja SSU regije se lahko pojavi med izvedbo reakcije PCR, saj se lahko namesto regije SSU (18S rRNA) mikoriznih gliv pomnožijo regije 18S drugih evkariontov (Lear in sod., 2018). Slika 1 prikazuje genske regije, uporabljene za raziskave različnih taksonov. Slika 2: Regija prikazuje regijo SSU in primerje, ki smo jih uporabili.



Slika 1: Genske regije, uporabljene v študijah, osredotočene na različne takson. rRNA označuje ribosomalno RNA, MT označuje mitohondrijske gene in CL označuje kloroplastne gene (Lear in sod., 2018)



Slika 2: Regija SSU (Jiang in sod., 2015)

2 NAMEN, CILJI IN HIPOTEZE

Namen diplomskega dela je optimizacija izolacije DNA mikoriznih gliv iz iztrebkov kopitarjev.

Cilji naloge so:

- 1) Razviti metodo za izolacijo DNA gliv z uporabo komercialnih kitov.
- 2) Optimizirati uporabo začetnih oligonukleotidov za uspešno pomnoževanje DNA.

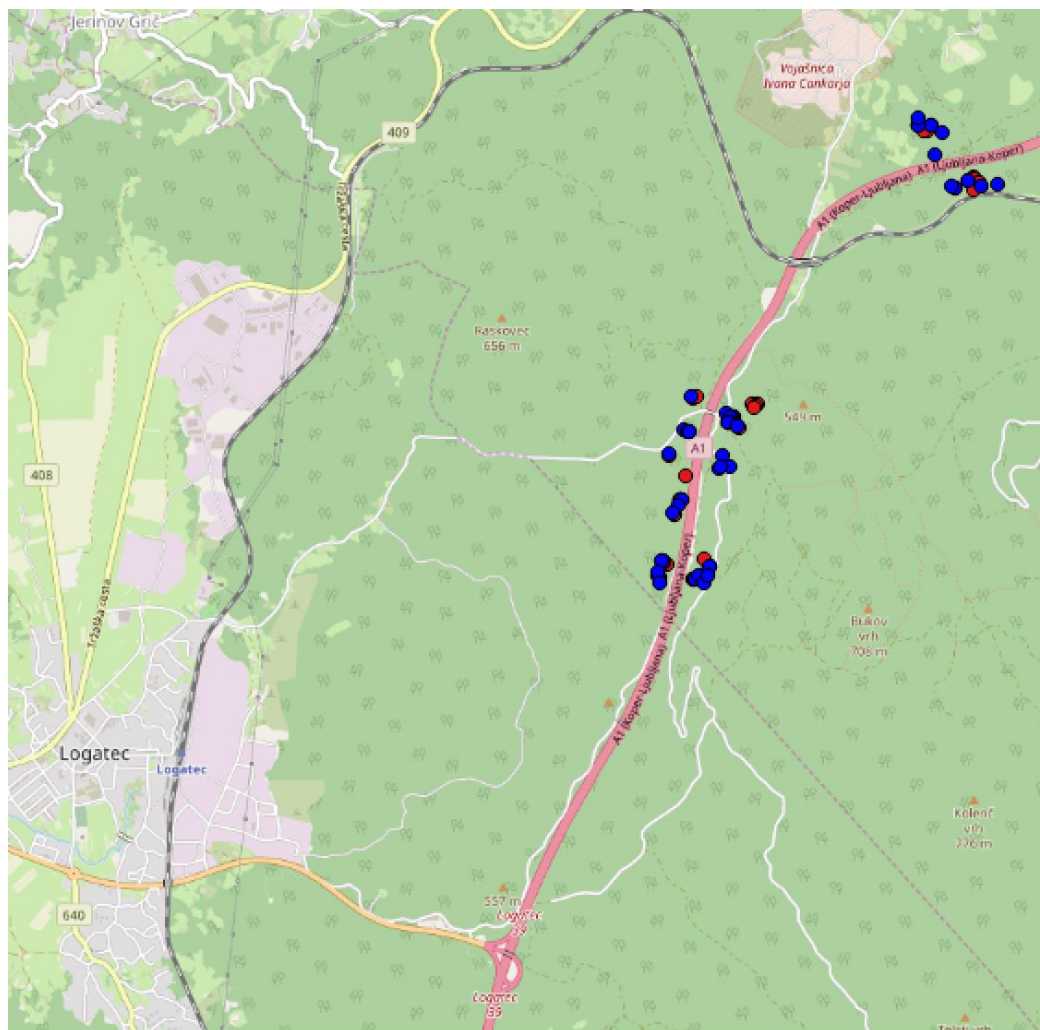
Hipoteze, na katerih temelji zaključna naloga, so:

- 1) Koncentracija izolirane DNA iz iztrebkov je odvisna od uporabljenega izolacijskega kita.
- 2) Na izolacijo eksogene DNA vpliva stopnja ohranjenosti in predpriprava vzorca.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Vzorci

Vzorci so bili odvzeti v sklopu raziskave genskega pretoka velikih zveri in prostoživečih parkljarjev na obeh straneh avtocestnega odseka Vrhnika–Logatec. Na Slika 3 so prikazane lokacije zbiranja vzorcev (Al Sayegh - Petkovšek in sod., 2019). Iztrebki srnjadi in jelenjadi so bili zbrani v obdobju od marca do aprila 2019. Do izvedbe analiz so bili vzorci hranjeni pri 4 °C.



Slika 3: Mesto odvzema vzorcev srnjadi (rdeče) in jelenjadi (modro) (Al Sayegh - Petkovšek in sod., 2019).

3.2 Izolacija molekule DNA

DNA smo izolirali z uporabo dveh različnih komercialnih kitov. Uporabili smo Qiagen QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (v nadaljevanju Stool kit) in Qiagen DNeasy PowerSoil Kit (v nadaljevanju Soil kit). Izolirali smo DNA iz 16 vzorcev srnjadi.

3.2.1 Kit 1 – Stool kit

Kit je namenjen čiščenju genomske DNA iz vzorcev blata. Omogoča čiščenje celotne DNA iz svežih ali zamrznjenih vzorcev. Očiščena DNA je visoke kakovosti in primerna za uporabo v PCR in drugih aplikacijah. DNA je eluirana v pufer z nizko vsebnostjo soli in brez beljakovin, nukleaz in drugih nečistoč ali inhibitorjev. Vzorca blata običajno vsebujejo veliko spojin, ki razgradijo DNA in zavirajo nadaljnje encimske reakcije. Da se zagotovi odstranitev teh snovi, kit vsebuje InhibitEX pufer, ki je posebej formuliran za ločevanje inhibitorjev DNA iz vzorca.

3.2.1.1 Princip in postopek

Kit je namenjen hitremu čiščenju celotne DNA iz vzorcev do 220 mg. Hiter in enostaven postopek obsega naslednje korake: liza celic in ločevanje nečistoč iz vzorcev blata v inhibitEX pufru ter čiščenje DNA na QIAamp Mini kolonah.

3.2.1.2 Protokol

Stool kit hranimo na sobni temperaturi (15–25 °C) do 12 mesecev. Kit vsebuje 6 raztopin, epice in kolone z membrano silicijevega oksida. Pred začetkom smo pripravili raztopine po navodilu proizvajalca.

1. V 2 ml epico smo zatehtali 180–220 mg iztrebkov.
2. Dodali smo 1,6 ml ASL puфра v vsak vzorec.
3. Vsakemu vzorcu smo dodali 1 ml InhibitEX puфра. Vorteksirali smo, dokler nismo dobili homogene raztopine. V tem koraku smo protokol optimizirali, tako da smo v vsako epico dodali 2 stekleni kroglici in uporabili Qiagen Tissuelyser II (Qiagen, Nemčija) s frekvenco 15/s za 10 min.
4. Vzorec smo centrifugirali 1 min na maksimalnih obratih, da se je blato sedimentiralo.
5. V 1,5 mL epico smo dodali 25 µl Proteinaze K.
6. Dodali smo 200 µl supernatanta iz koraka 4 v epico s Proteinazo K.
7. Dodali smo 600 µl AL puфра in vorteksirali 15 s. Proteinaze K ne smemo dodati v AL pufer neposredno. Bistveno je, da se vzorec in AL pufer dobro premešata in tvorita homogeno raztopino.
8. Inkubirali smo 10 min pri 70 °C.
9. Lizatu smo dodali 600 µl etanola (96–100 %) in premešali z vorteksiranjem.
10. Dodali 600 µl lizata iz koraka 9 na kolono z membrano. Centrifugirali smo 1 min. Kolono smo dali v novo 2 ml epico in odvrgli epico, ki vsebuje filtrat.
11. Ponovili smo korak 10, dokler nismo na kolono naložili vsega lizata.
12. Dodali smo 500 µl AW1 puфра. Centrifugirali smo 1 min. Kolono smo dali v čisto 2 ml epico in odvrgli epico, ki vsebuje filtrat.
13. Dodali smo 500 µl AW2 puфра. Centrifugirali smo 3 min. Kolono smo dali v čisto 2 ml epico in odvrgli epico, ki vsebuje filtrat.

14. Centrifugirali smo 3 min.
15. Kolono smo dali v čisto 1,5 ml epico. Nanesli smo 200 μ l ATE pufru na sredino membrane. Inkubirali smo 1 min na sobni temperaturi in nato centrifugirali 1 min, da se je DNA eluiral.

3.2.2 Kit 2 –Soil kit

Ta kit je sestavljen za izolacijo genomske DNA iz okoljskih vzorcev. Namenjen je predvsem za uporabo okoljskih vzorcev, ki vsebujejo velike količine huminske kisline, kot so kompost, sediment in gnoj. Izolirana DNA ima visoko stopnjo čistosti, kar v nadaljevanju omogoča uspešno amplifikacijo s PCR. Kit omogoča izolacijo DNA različnih organizmov, kot so bakterije, glive in alge.

3.2.2.1 Princip in postopek

Soil kit temelji na postopku odstranjevanja huminskih substanc. Ta postopek je učinkovit pri odstranjevanju inhibitorjev PCR tudi iz najbolj zahtevnih tipov prsti. Okoljske vzorce damo v epico s kroglicami za homogenizacijo. Liza celic poteka z mehanskimi in kemičnimi metodami. Celotna genomska DNA je zajeta v koloni na membrani silicijevega oksida. DNA je nato sprana in eluirana z membrane. Izolirana DNA je pripravljena za analizo PCR in druge aplikacije.

3.2.2.2 Protokol

Soil kit hranimo na sobni temperaturi (15–25 °C). Kit vsebuje 6 raztopin, kolone z membrano silicijevega oksida, epice s kroglicami in 2 ml epice.

Pred začetkom uporabe kita smo raztopino C1 segreli do 60 °C, kot svetuje proizvajalec, da se oborina raztopi. Centrifugiranje poteka pri sobni temperaturi, v našem primeru na 22 °C, in pri 10.000 x g, ki je v našem primeru enakovredno 11.000 vrt/min.

1. Dodali smo 0,25 g vzorca v epico s kroglicami in na kratko vorteksirali.
2. Dodali smo 60 μ l raztopine C1 in na kratko vorteksirali.
3. Vzorce smo homogenizirali z uporabo Qiagen Tissuelyser II (Qiagen, Nemčija) s frekvenco 15/s za 10 min.
4. Epice smo centrifugirali na 11.000 vrt/min za 30 s.
5. Supernatant smo prenesli v čisto 2 ml epico. Volumen supernatanta je bil 400–500 μ l.
6. Dodali smo 250 μ l raztopine C2 in vorteksirali 5 s. Nato smo inkubirali 5 min na 2–8 °C.
7. Centrifugirali smo epice 1 min na 11.000 vrt/min.
8. Pazljivo smo prenesli 600 μ l supernatanta v čisti epici.
9. Dodali smo 200 μ l raztopine C3 in na kratko vorteksirali. Inkubirali smo 5 min na 2–8 °C.

10. Centrifugirali smo epice 1 min na 11.000 vrt/min.
11. Pazljivo smo prenesli 750 µl supernatanta v čisti epici.
12. Premešali smo raztopino C4 in dodali 1.200 µl supernatantu. Vorteksirali smo 5 s.
13. Naneseli smo 675 µl na kolono in centrifugirali 1 min na 11.000 vrt/min. Pretok smo zlili.
14. Korak 13 smo ponovili dvakrat, dokler nismo obdelali celotnega vzorca.
15. Dodali smo 500 µl raztopine C5. Centrifugirali smo 1 min na 11.000 vrt/min.
16. Pretok smo zlili. Centrifugirali smo 1 min na 11.000 vrt/min.
17. Kolono smo dali v čisto 2 ml epico. Pazili smo, da raztopina C5 ne pride v stik s kolono.
18. Dodali smo 100 µl raztopine C6 na sredino bele filtrne membrane.
19. Centrifugirali smo 30 s pri 11.000 vrt/min. Kolono smo odvrgli.

DNA hranimo zamrznjeno (–20 do –80 °C), ker raztopina C6 ne vsebuje EDTA.

3.3 Koncentracija DNA

Koncentracijo izolirane DNA v končnem volumnu smo izmerili s Qubit® dsDNA BR reagentom za merjenje koncentracije (Invitrogen) na Qubit 3.0 flurimeteru (Thermo Fisher Scientific, ZDA). Za analizo smo uporabili 1 µl izolirane DNA. Koncentracija DNA je izražena kot ng na µl.

3.4 Polimerazna verižna reakcija (PCR)

Izolirano DNA smo pomnožili s PCR na Applied Biosystems' (ABI) GeneAmp™ PCR System 2700 (Thermo Fisher Scientific, ZDA). Uporabili smo začetna oligonukleotida AM1 in NS31, ker sta narejena za amplifikacijo glivne DNA in izključevanje rastlinske DNA (Helgason in sod., 1998).

Preglednica 1: Temperaturni protokol verižnih reakcij s polimerazo (PCR)

Osnovni koraki PCR	Št. ciklov	T(°C)	Čas
Začetna stopnja	1	95	3 min
Denaturacija	30	95	30 s
Stopnja prileganja	30	55	30 s
Podaljševalna stopnja	30	72	30 s
Zaključno podaljševanje	1	72	7 min

3.4.1 Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR)

Za optimizacijo temperatur ciklov pri PCR smo uporabili Roche LightCycler® 96 sistem (Roche Diagnostic GmbH, Nemčija). Uporabili smo barvilo SYBR Green I. Vzorec smo pomnožili na 12 različnih temperaturah z uporabo istih začetnih oligonukleotidov (NS31 in AM1), temperature so vidne v Slika 6.

3.5 Analiza regije SSU

Začetna oligonukleotida NS31-AM1 pomnožujeta regijo SSU. Dobljeni fragment je dolg približno 550 baznih parov (Jiang in sod., 2015). Uspešnost pomnoževanja DNA smo preverili z uporabo agarozne gelske elektroforeze na 1,5-% gelu. Gel je bil pripravljen z 1,9 g agaroze, 125 ml 0,5 x TBE (Tris/Borate/EDTA) pufra in 10 µl Midori Green Advance DNA barvila. Uporabili smo Invitrogen™ TrackIt™ 1 Kb DNA Ladder kot lestev. Na gel smo nanesti vzorce, barvane s Thermo Scientific™ DNA Gel Loading Dye (6X), razredčenim na 6 : 1.

3.6 Statistična analiza

Statistične analize smo izvedli s programsko opremo SPSS različice 25 (SPSS Inc., Chicago IL). Za analizo normalnosti porazdelitve smo uporabili Shapiro-Wilk test (Shapiro in Wilk, 1965). Za primerjalno analizo smo uporabili Mann-Whitney U test (Mann in Whitney, 1947).

4 REZULTATI

4.1 Analiza koncentracije izolirane DNA

Preglednica 2: Koncentracije DNA

Vzorec	Stool kit – Koncentracija (ng/µl)	Soil kit – Koncentracija (ng/µl)
2V1	5,44	0
2V2	8,72	13,7
2V3	4,00	9,54
2V11	15,1	8,58
2V12	7,88	3,20
2V14	15,6	20,2
2Z5	7,16	5,20
3Z8	7,72	16,8
3Z10	7,56	6,98
3Z19	15,1	12,2
3Z1	8,40	15,2
3V2	9,64	6,94
3V10	6,28	7,64
3V14	7,60	11,4
3V17	28,4	15,5
3V20	58,8	15,8

Obe metodi sta uspešno izolirali DNA (razen v enem primeru). Koncentracije DNA so med 0 ng/ μ L in 58,8 ng/ μ L, povprečno $11,95 \pm 10,07$ ng/ μ L. Koncentracije DNA, izolirane s Stool kitom, so med 4,0 ng/ μ L in 58,8 ng/ μ L, povprečno $13,34 \pm 13,06$ ng/ μ L. Koncentracije, izolirane s Soil kitom, so med 0 ng/ μ L in 20,2 ng/ μ L, povprečno $10,55 \pm 5,32$ ng/ μ L.

Podatki Stool kita niso normalno porazdeljeni, medtem ko tisti iz Soil kita so. To nam je onemogočilo izvajanje parametričnih testov.

Za določanje smo uporabili Mann-Whitney U Test (Mann in Whitney, 1947). Preglednica 4 prikazuje, da je mediana koncentracije izolirane DNA večja pri Soil kitu kot pri Stool kitu, $U = 123,0$, $p = 0.86502$.

Preglednica 3: Rezultati statistične analize

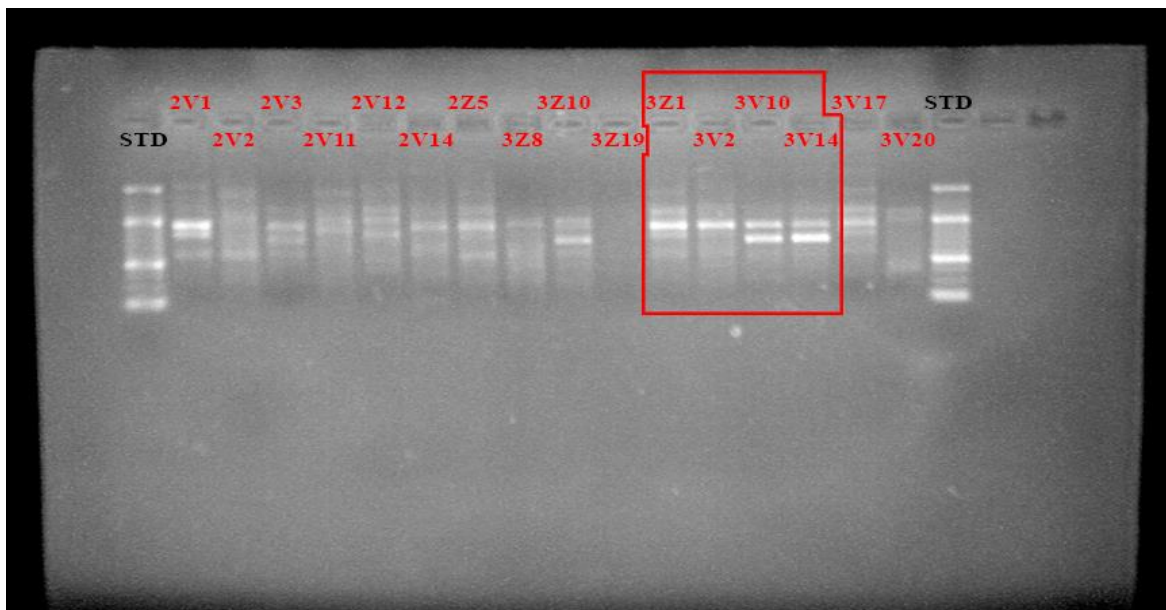
	Stool kit	Soil kit
Število vzorcev	16	16
Povprečje	13,34	10,56
Mediana	8,14	10,47
Std. deviacija	13,06	5,32
Minimum	4,0	0,00
Maksimum	58,8	20,20

Preglednica 4: Rezultati Mann-Whitney U testa

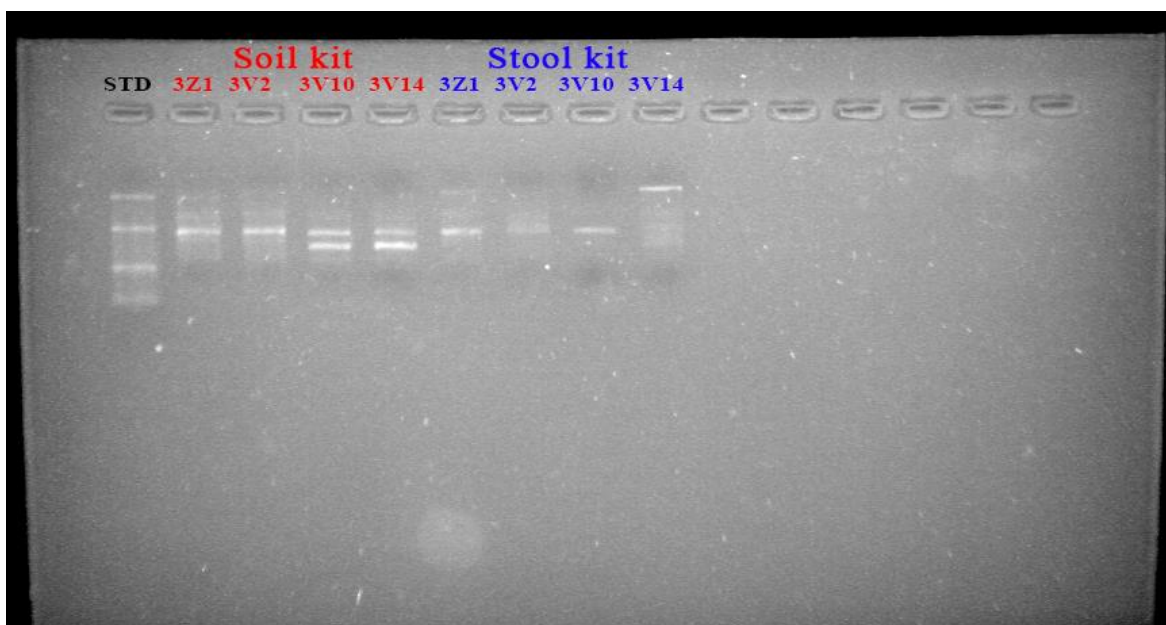
Mann-Whitney U Test	Vrednost
U -vrednost	123
Z -vrednost	-0,1696
p -vrednost	0,86502

4.2 Analiza regij SSU

Za analizo PCR produktov smo uporabili gelsko elektroforezo. Na Slika 4 so prikazani rezultati vzorcev, izoliranih s Soil kitom. Za primerjavo med kiti smo izbrali štiri vzorce (3Z1, 3V2, 3V10 in 3V14, obkroženi v Slika 4). Z uporabo gelske elektroforeze smo primerjali PCR produkte obeh kitov, kar prikazuje Slika 5.



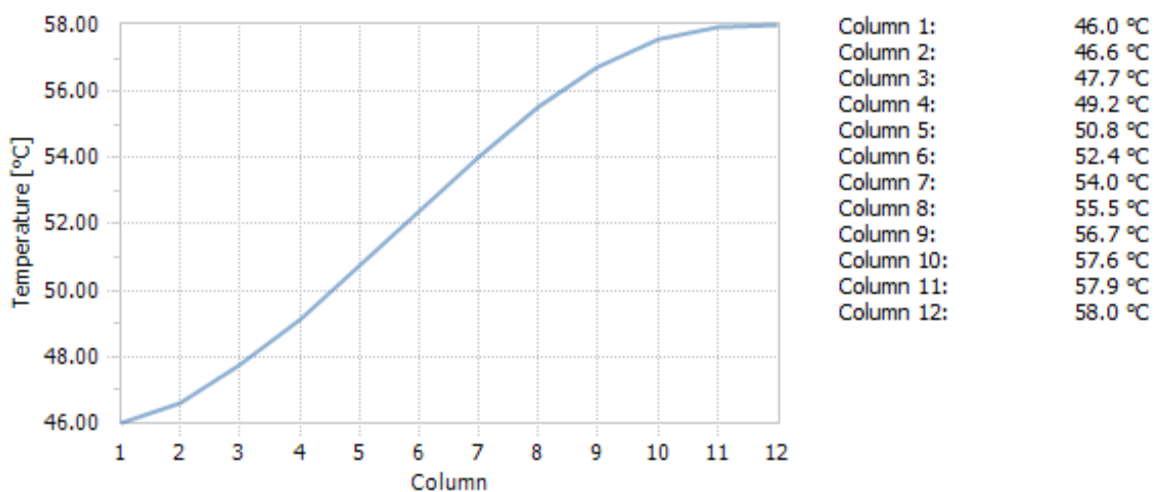
Slika 4: Gel elektroforeza vzorcev, izoliranih s Soil kitom, dolžina lestvice je 1 kbp



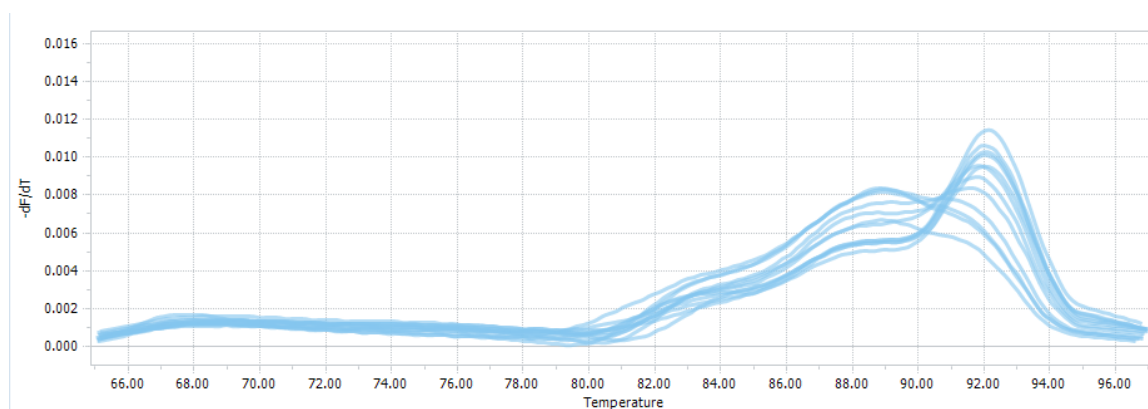
Slika 5: Gel elektroforeza izbranih vzorcev, dolžina lestvice je 1 kbp.

4.2.1 Optimizacija temperatur s qPCR

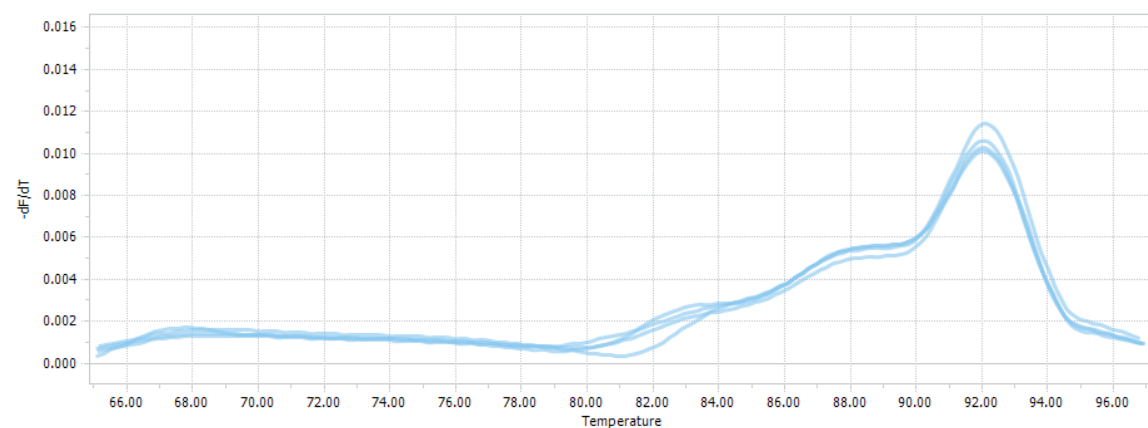
Z grafa na Slika 7 je razvidno, da je bilo pomnoževanje najbolj uspešno pri temperaturi prileganja pri 56,7 °C, 57,6 °C, 57,9 °C in 58 °C.



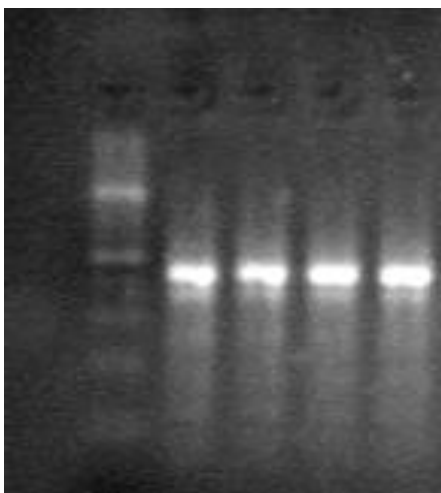
Slika 6: Temperturni profil za (kvantitativni) qPCR



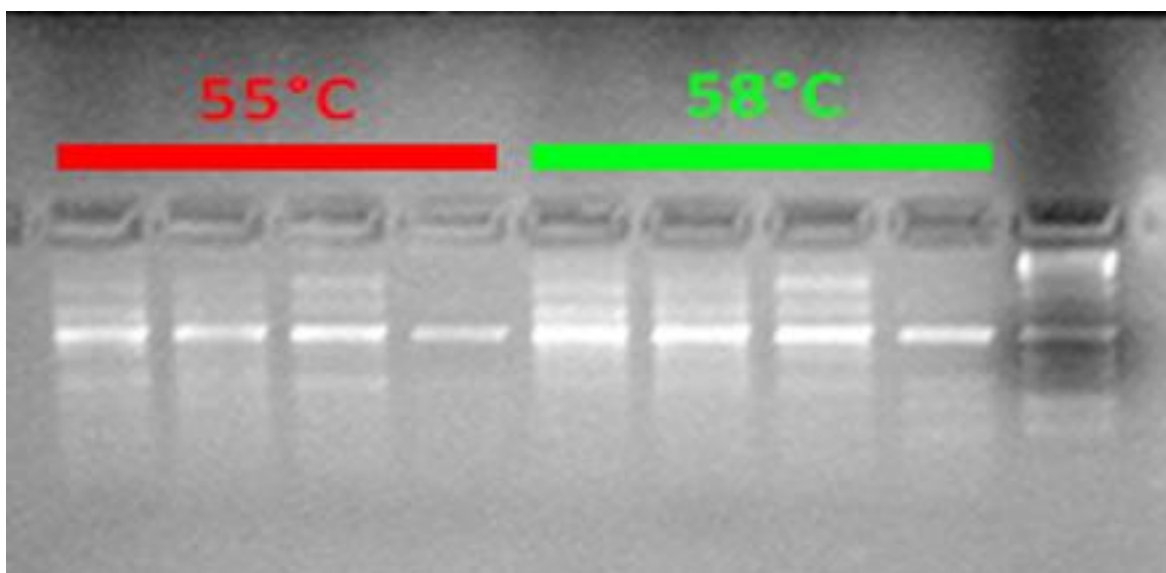
Slika 7: Rezultati vseh 12 temperturnih profilov



Slika 8: Rezultati najbolj učinkovitih temperatur prileganja, 56,7 do 58 °C.



Slika 9: Analiza z gelsko elektroforezo temperaturnih profilov od 56,7 do 58 °C, dolžina lestvice je 1 kbp



Slika 10: Primerjava uspešnosti pomnožitve DNA pri temperaturi prileganja od 55 do 58 °C

5 DISKUSIJA IN ZAKLJUČEK

Mikorizne glive so sestavni del večine kopenskih ekosistemov in prispevajo k številnim ekosistemskim storitvam, kot so absorpcija hranil, vgrajevanje ogljika in ohranjanje raznolikosti rastlin. Vzdrževanje raznolikost mikoriznih glivnih vrst v ekosistemih je zato pomemben vidik ohranjanja habitatov. Raziskovanje interakcij med mikoriznimi glivami in vretenčarji je pomemben del ohranjanja te raznolikosti. Mikofagija, ki jo prakticirajo številne razširjene živali, naj bi v veliki meri vplivala na strukturo glivne združbe in sočasno pojavljanje glivnih vrst. Nuske in sod. (2018) so ugotovili, da so v združbi ECM gliv v enem gozdu v severovzhodni Avstraliji prevladovale vrste, podobne tartufom. Skoraj 90 % teh taksonov je bilo najdenih tudi v prehrani specialista za glive, *Bettongia tropica*, vendar le 50 % teh taksonov zaužijejo sesalci, ki so generalisti. Avtorji so zaključili, da lahko izguba specialista za glive na tem območju povzroči spremembe v strukturi združbe ECM gliv. Prav tako je bilo ugotovljeno, da na neurejenih gozdnih rastiščih, poškodovanih od vetroloma, živi bistveno več podzemnih gliv kot na upravljanih rastiščih, verjetno zaradi večjega kritja za male sesalce (Vašutová in sod., 2018).

Med raziskovanjem moramo biti pazljivi pri posploševanju interakcij med živalmi in mikoriznimi glivami, saj so nekatere vrste gliv za razširjanje odvisne samo od ene ali dveh vrst vretenčarjev (Dighton in White, 2017).

V nalogi smo želeli primerjati in optimizirati protokol za uspešno izolacijo DNA mikoriznih gliv iz iztrebkov srnjadi in jelenjadi, saj so iztrebki pogost in dostopen vir genetskega materiala, ki se uporablja tudi pri študijah populacijske genetike (Al Sayegh - Petkovšek in sod., 2019).

Protokol bi lahko omogočil nadaljnje raziskovanje širjenja mikoriznih gliv, ki ga opravljajo parkljarji. Hkrati bi to omogočilo preučevanje raznolikosti glivnih vrst in njihovih interakcij s prostoživečimi živali.

Začeli smo s primerjavo DNA koncentracij, izoliranih z uporabo dveh različnih komercialnih kitov. Izolirali smo DNA iz 16 vzorcev, tako da smo dobili 16 parov koncentracij za našo primerjavo, kar je prikazano v Preglednica 1. Po izmeritvi koncentracij smo podatke vnesli v SPSS in izvedli Shapiro-Wilk test normalnosti. Test je pokazal, da podatki iz Stool kita niso bili normalno porazdeljeni. Podatki iz Soil kita so bili normalno porazdeljeni. Zato smo za analize uporabili še Mann-Whitney U test. Test je pokazal, da se koncentracije DNA pri uporabi Soil kita ne razlikujejo od koncentracij DNA, izolirane s Stool kitom, $p = 0,86502$. Optimizacija protokola v točkah 3.2.1.2 in 3.2.2.2 z uporabo Qiagen Tissuelyser II je pripomogla k boljši izolaciji DNA iz obeh kitov kot samo vorteksiranje, saj so bili vzorci pred izolacijo precej bolj homogeni (podatki, pridobljeni pri optimizaciji protokola, niso podani v nalogi). Upoštevati moramo, da še nobena raziskava ni uporabila Stool kita za izoliranje glivne DNA iz živalskih iztrebkov, razen človeka. Zato ne moremo potrditi ali ovreči, da je Stool kit primeren za izolacijo

glivne DNA iz iztrebkov kopitarjev. Fiedorová in sod. (2019) so v študiji primerjali 5 različnih kitov za izolacijo mikrobne in glivne DNA iz človeških iztrebkov, rezultati so pokazali, da je koncentracija DNA pri uporabi Stool kita med najnižjimi v študiji. Hkrati pa Lear in sod. (2018) svetujejo uporabo Soil kita za izolacijo glivne DNA iz živalskih iztrebkov. Uporaba Soil kita je priporočena tudi pri izolaciji DNA iz prsti, sedimenta, listnega opada in rastlinskega tkiva (Lear in sod., 2018). Če upoštevamo naše rezultate in rezultate drugih raziskav, lahko zaključimo, da je izolacija glivne DNA iz živalskih iztrebkov s Soil kitom uspešnejša kot s Stool kitom.

Za pomnoževanje s PCR smo najprej izbrali vse vzorce, izolirane s Soil kitom. Izbrali smo protokol s temperaturo prileganja 55 °C in 30 ciklov. Na Slika 4 vidimo uspešnost pomnoževanja s PCR na elektroforeznem gelu. Rezultati gela so pokazali, da so se pri vzorcih 3Z1, 3V2, 3V10 in 3V14 (obkroženi v Slika 4) produkti PCR, dolgi ~ 550 bp, najbolje pomnožili. Zato smo v nadaljevanju za primerjavo s Stool kitom izbrali samo te štiri vzorce. Prej omenjene vzorce, ki so bili izolirani s Soil kitom, smo pomnožili s PCR z istim protokolom. Na gelski elektroforezi na Slika 5 vidimo primerjavo uspešnosti pomnoževanja regije SSU pri uporabi DNA, izolirane z različnima kitoma. S Soil kitom izolirana DNA se je pokazala kot boljša za uporabo v nadaljnjih analizah. Na Slika 5 vidimo, da so produkti PCR v prvih štirih vzorcih bolj izraženi kot v naslednjih štirih. Vzorec z oznako 3Z1 smo izbrali kot najbolj primerne za uporabo pri qPCR za optimizacijo temperature prileganja.

Kvantitativni PCR v realnem času je tehnologija, ki se je razvila iz časovno in delovno potratne tehnike za določevanje uspešnosti pomnoževanja z uporabo gelske elektroforeze. qPCR omogoča hitro in učinkovito detekcijo in kvantifikacijo pomnožene DNA (Bustin, 2010). Naši rezultati so pokazali, da so višje temperature prileganja (med 56,7 in 58 °C) najboljše pri pomnoževanju samo regije SSU, saj, kot vidimo na Slika 7, se pri višjih temperaturah pomnoži manj nezaželene DNA drugih organizmov. Preverili smo, ali je temperatura 58 °C boljša za pomnoževanje kot temperatura 55 °C. To smo storili tako, da smo vzeli 4 vzorce (tiste, s katerimi smo tudi primerjali Stool in Soil kit) in jih pomnožili pri 55 °C in pri 58 °C. S Slika 10 je razvidno, da se je DNA v vzorcih, ki so bili pomnoženi pri 58 °C, bolj uspešno pomnožila kot v tistih, pomnoženih pri 55 °C.

Par začetnih oligonukleotidov NS31 in AM1 je od začetka, ko so ga Helgason in sod. (1998) osnovali, bistveno prispeval k preučevanju združb AM gliv. AM sekvence iz različnih geografskih regij ali različnih ekosistemov so bile analizirane z uporabo NS31-AM1 in so dale pomemben vpogled v odnos med AM glivami in rastlinami v različnih okoljih (Lee in sod., 2008). Vendar lahko primer AM1 amplificira samo redove Glomerales in Diversisporales, in ne Paraglomerales in Archaeosporales (Schüßler in sod.,

2001). Pod nekaterimi pogoji pa lahko pomnoži tudi sekvence, ki niso od AM gliv (Helgason in sod., 2002; Rodríguez-Echeverría in Freitas, 2006). Zato so študije, ki so uporabljale primer AM1, le študije redov Glomerales in Diversisporales, ostalih redov ni bilo mogoče zaznati. To bi lahko povzročilo pristranskost pri določanju raznolikosti AM gliv (DeBellis in Widden, 2006). Zato so Lee in sod. (2008) zasnovali nov par primerjev, AML1 in AML2, ki omogočata dobro pomnoževanje sekvenc AM gliv, in je primerljivo s tistim, pridobljenim s primerskim parom NS31-AM1. Poleg tega imata nova primerja dve pomembni prednosti, sta bolj specifična za glive iz skupine Glomeromycota in zagotavljata boljšo pokritost debla. Lear in sod. (2018) svetujejo uporabo primerja NS31 in AML2, saj sta se pokazala kot najbolj natančna pri pomnoževanju Glomeraceae.

Naša raziskava je pokazala, da je najboljši protokol za izolacijo gliv iz iztrebkov uporaba Soil kita (homogenizacija s TissueLyser II) in temperatura prileganja pri PCR od 58 °C. Začetna oligonukleotida, ki smo ju uporabili, torej NS31-AM1, sta se pokazala kot ustrezna za amplifikacijo AM gliv. Da bi bili prepričani, ali so je pomnožila DNA gliv, bi morali vzorce sekvenirati. V naši raziskavi smo v iztrebkih srnjadi in jelenjadi našli fragmente dolžine 550 bp, ki ustrezajo pomnoženi regiji SSU AM gliv. Zato lahko sklepamo, ampak ne morem trditi, da so prostoživeči kopitarji vektorji mikoriznih gliv, kar pomeni, da bi bilo treba nadaljevati analizo pomnoženih produktov s sekveniranjem prihodnje generacije. Vsekakor nam lahko podatki o načinu širjenja AM gliv lahko zagotovijo dodatna izhodišča za prostorske analize mikoriznih gliv.

6 LITERATURA IN VIRI

Al Sayegh-Petkovšek, S., Kotnik, K., Bužan, E. in Pokorny, B. 2019. *Strokovne podlage za zagotovitev ustreznih migracijskih koridorjev velikih zveri in drugih vrst velikih sesalcev na AC odseku Vrhnika-Postojna : DP-VŠVO-57-01/19.*

Allen, M. F. 1987. Re-establishment of mycorrhizas on Mount St Helens: Migration vectors. *Transactions of the British Mycological Society* 88(3): 413–417.

Anslan, S., Bahram, M. in Tedersoo, L. 2016. Temporal changes in fungal communities associated with guts and appendages of Collembola as based on culturing and high-throughput sequencing. *Soil Biology and Biochemistry* 96: 152–159.

Ashkannejhad, S. in Horton, T. R. 2006. Ectomycorrhizal ecology under primary succession on coastal sand dunes: interactions involving *Pinus contorta*, suilloid fungi and deer. *New Phytologist* 169(2): 345–354.

Bazzicalupo, A. L., Bálint, M. in Schmitt, I. 2013. Comparison of ITS1 and ITS2 rDNA in 454 sequencing of hyperdiverse fungal communities. *Fungal Ecology* 6(1): 102–109.

Brown, G. G. 1995. How do earthworms affect microfloral and faunal community diversity? *Plant and Soil* 170(1): 209–231.

Brundrett, M. C. 2009. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant and Soil* 320(1–2): 37–77.

Bustin, S. A. 2010. Why the need for qPCR publication guidelines?—The case for MIQE. *Methods* 50(4): 217–226.

Cairney, J. W. G. in Meharg, A. A. 2003. Ericoid mycorrhiza: a partnership that exploits harsh edaphic conditions. *European Journal of Soil Science* 54(4): 735–740.

Chu, H., Wang, C., Wang, H., Chen, H. in Tang, M. 2016. Pine wilt disease alters soil properties and root-associated fungal communities in *Pinus tabulaeformis* forest. *Plant and Soil* 404(1–2): 237–249.

Claridge, A. in Trappe, J. 2005. Sporocarp mycophagy: nutritional, behavioral, evolutionary, and physiological aspects. Its organization and role in the ecosystem 599–611.

Cooper, T. in Vernes, K. 2011. Mycophagy in the larger bodied skinks of the genera *Tiliqua* and *Egernia*: Are there implications for ecosystem health? *Australian Zoologist* 35: 681–684.

Correia, M., Heleno, R., da Silva, L. P., Costa, J. M. in Rodríguez-Echeverría, S. 2019. First evidence for the joint dispersal of mycorrhizal fungi and plant diaspores by birds. *New Phytologist* 222(2): 1054–1060.

Davison, J., Moora, M., Opik, M., Adholeya, A., Ainsaar, L., Ba, A., ... Zobel, M. 2015. Global assessment of arbuscular mycorrhizal fungus diversity reveals very low endemism. *Science* 349(6251): 970–973.

DeBellis, T. in Widden, P. 2006. Diversity of the small subunit ribosomal RNA gene of the arbuscular mycorrhizal fungi colonizing *Clintonia borealis* from a mixed-wood boreal forest. *FEMS Microbiology Ecology* 58(2): 225–235.

Dickie, I. A. in St John, M. G. 2016. Second-generation molecular understanding of mycorrhizas in soil ecosystems. V *Molecular Mycorrhizal Symbiosis* (str. 473–491). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.

Dighton, J. in White, J. 2017. *The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem, Fourth Edition*.

Eggert, L. S., Maldonado, J. E. in Fleischer, R. C. 2005. Nucleic Acid Isolation from Ecological Samples—Animal Scat and Other Associated Materials. V *Methods in Enzymology* (Let. 395, str. 73–82).

Fiedorová, K., Radvanský, M., Němcová, E., Grombířiková, H., Bosák, J., Černochová, M., ... Freiburger, T. 2019. The Impact of DNA Extraction Methods on Stool Bacterial and Fungal Microbiota Community Recovery. *Frontiers in Microbiology* 10(April): 1–11.

Gębczyńska, Z. 1980. Food of the roe deer and red deer in the Białowieża Primeval Forest. *Acta Theriologica* 25(2): 487–500.

Ghasemzadeh, I. in Namazi, S. H. 2015. Review of bacterial and viral zoonotic infections transmitted by dogs. *Journal of medicine and life* 8(Spec Iss 4): 1–5.

Godoy, J. A. in Jordano, P. 2001. Seed dispersal by animals: exact identification of source trees with endocarp DNA microsatellites. *Molecular Ecology* 10(9): 2275–2283.

Harder, L. D. in Wilson, W. G. 1998. Theoretical consequences of heterogeneous transport conditions for pollen dispersal by animals. *Ecology* 79(8): 2789–2807.

Harms, K. E., Wright, S. J., Calderón, O., Hernández, A. in Herre, E. A. 2000. Pervasive density-dependent recruitment enhances seedling diversity in a tropical forest. *Nature* 404(6777): 493–495.

Hart, M. M., Aleklett, K., Chagnon, P.-L., Egan, C., Ghignone, S., Helgason, T., ... Waller, L. 2015. Navigating the labyrinth: a guide to sequence-based, community ecology of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 207(1): 235–247.

Hassall, M., Turner, J. G. in Rands, M. R. W. 1987. Effects of terrestrial isopods on the decomposition of woodland leaf litter. *Oecologia* 72(4): 597–604.

Helgason, T., Daniell, T. J., Husband, R., Fitter, A. H. in Young, J. P. W. 1998. Ploughing up the wood-wide web? *Nature* 394(6692): 431–431.

Helgason, T., Merryweather, J. W., Denison, J., Wilson, P., Young, J. P. W. in Fitter, A. H. 2002. Selectivity and functional diversity in arbuscular mycorrhizas of co-occurring fungi and plants from a temperate deciduous woodland. *Journal of Ecology* 90(2): 371–384.

Horton, T. R. 2017. Spore Dispersal in Ectomycorrhizal Fungi at Fine and Regional Scales. V L. Tedersoo (ur.), *Biogeography of Mycorrhizal Symbiosis* (str. 61–78). Cham: Springer International Publishing.

Houston, T. F. in Bougher, N. L. 2010. Records of hypogeous mycorrhizal fungi in the diet of some Western Australian bolboceratine beetles (Coleoptera: Geotrupidae, Bolboceratinae). *Australian Journal of Entomology* 49(1): 49–55.

Ihrmark, K., Bödeker, I. T. M., Cruz-Martinez, K., Friberg, H., Kubartova, A., Schenck, J., ... Lindahl, B. D. 2012. New primers to amplify the fungal ITS2 region - evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS Microbiology Ecology* 82(3): 666–677.

Ingold, C. T. (Cecil T. 1953. *Dispersal in fungi*. Clarendon Press.

Jacobsen, R. M., Kauserud, H., Sverdrup-Thygeson, A., Bjorbækmo, M. M. in Birkemoe, T. 2017. Wood-inhabiting insects can function as targeted vectors for decomposer fungi. *Fungal Ecology* 29: 76–84.

Janos, D. P., Sahley, C. T. in Emmons, L. H. 1995. Rodent Dispersal of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Amazonian Peru. *Ecology* 76(6): 1852–1858.

Jiang, S., Shi, G., Mao, L., Pan, J., An, L., Liu, Y. in Feng, H. 2015. Comparison of different PCR primers on detecting arbuscular mycorrhizal communities inside plant roots. *Wei sheng wu xue bao = Acta microbiologica Sinica* 55(7): 916–25.

Johnson, C. N. 1996. Interactions between mammals and ectomycorrhizal fungi. *Trends in Ecology and Evolution*.

Kjøller, R., Olsrud, M. in Michelsen, A. 2010. Co-existing ericaceous plant species in a subarctic mire community share fungal root endophytes. *Fungal Ecology* 3(3): 205–214.

Koele, N., Dickie, I. A., Blum, J. D., Gleason, J. D. in de Graaf, L. 2014. Ecological significance of mineral weathering in ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal ecosystems from a field-based comparison. *Soil Biology and Biochemistry* 69: 63–70.

Lear, G., Dickie, I., Banks, J., Boyer, S., Buckley, H., Buckley, T., ... Holdaway, R. 2018. Methods for the extraction, storage, amplification and sequencing of DNA from environmental samples. *New Zealand Journal of Ecology* 42(1): 10.

Lee, J., Lee, S. in Young, J. P. W. 2008. Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Ecology* 65(2): 339–349.

Lekberg, Y., Meadow, J., Rohr, J. R., Redecker, D. in Zabinski, C. A. 2011. Importance of dispersal and thermal environment for mycorrhizal communities: lessons from Yellowstone National Park. *Ecology* 92(6): 1292–1302.

Lilleskov, E. A. in Bruns, T. D. 2005. Spore dispersal of a resupinate ectomycorrhizal fungus, *Tomentella sublilacina*, via soil food webs. *Mycologia* 97(4): 762–769.

Livne-Luzon, S., Avidan, Y., Weber, G., Migael, H., Bruns, T., Ovadia, O. in Shemesh, H. 2017. Wild boars as spore dispersal agents of ectomycorrhizal fungi: consequences for community composition at different habitat types. *Mycorrhiza* 27(3): 165–174.

Luoma, D. L., Trappe, J. M., Claridge, A. W., Jacobs, K. M. in Cázares, E. 2003. Relationships among fungi and small mammals in forested ecosystems. V C. J. Zabel in R. G. Anthony (ur.), *Mammal Community Dynamics* (str. 343–373). Cambridge: Cambridge University Press.

Mann, H. B. in Whitney, D. R. 1947. On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other. *The Annals of Mathematical Statistics* 18(1): 50–60.

Manzano, P. in Malo, J. E. 2006. Extreme long-distance seed dispersal via sheep. *Frontiers in Ecology and the Environment* 4(5): 244–248.

Maser, C., Claridge, A. W. in Trappe, J. M. 2008. *Trees, Truffles, and Beasts*. Rutgers University Press.

McIlveen, W. D. in Cole Jr., H. 1976. Spore dispersal of Endogonaceae by worms, ants, wasps, and birds. *Canadian Journal of Botany* 54(13): 1486–1489.

Nielsen, K. B., Kjøller, R., Bruun, H. H., Schnoor, T. K. in Rosendahl, S. 2016. Colonization of new land by arbuscular mycorrhizal fungi. *Fungal Ecology* 20: 22–29.

Nilsson, R. H., Ryberg, M., Abarenkov, K., Sjökvist, E. in Kristiansson, E. 2009. The ITS region as a target for characterization of fungal communities using emerging sequencing technologies. *FEMS Microbiology Letters* 296(1): 97–101.

Núñez, M. A., Hayward, J., Horton, T. R., Amico, G. C., Dimarco, R. D., Barrios-García, M. N. in Simberloff, D. 2013. Exotic Mammals Disperse Exotic Fungi That Promote Invasion by Exotic Trees. *PLoS ONE* 8(6): e66832.

Nuske, S. J., Vernes, K., May, T. W., Claridge, A. W., Congdon, B. C., Krockenberger, A. in Abell, S. E. 2017a. Data on the fungal species consumed by mammal species in Australia. *Data in Brief* 12: 251–260.

Nuske, S. J., Vernes, K., May, T. W., Claridge, A. W., Congdon, B. C., Krockenberger, A. in Abell, S. E. 2017b. Redundancy among mammalian fungal dispersers and the importance of declining specialists. *Fungal Ecology* 27: 1–13.

Nuske, Susan J., Anslan, S., Tedersoo, L., Bonner, M. T. L., Congdon, B. C. in Abell, S. E. 2018. The endangered northern bettong, *Bettongia tropica*, performs a unique and potentially irreplaceable dispersal function for ectomycorrhizal truffle fungi. *Molecular Ecology* 27(23): 4960–4971.

Oehl, F., Silva, G. A. da, Goto, B. T. in Sieverding, E. 2011. *Glomeromycota*: three new genera and glomoid species reorganized. *Mycotaxon* 116(1): 75–120.

Öpik, M., Vanatoa, A., Vanatoa, E., Moora, M., Davison, J., Kalwij, J. M., ... Zobel, M. 2010. The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomeromycota*). *New Phytologist* 188(1): 223–241.

Paugy, M., Baillon, F., Damien, C. in Duponnois, R. 2004. Elephants as dispersal agents of mycorrhizal spores in Burkina Faso. *African Journal of Ecology* 42: 225–227.

Piattoni, F., Amicucci, A., Iotti, M., Ori, F., Stocchi, V. in Zambonelli, A. 2014. Viability and morphology of *Tuber aestivum* spores after passage through the gut of *Sus scrofa*. *Fungal Ecology* 9(1): 52–60.

Picard, C., Ponsonnet, C., Paget, E., Nesme, X. in Simonet, P. 1992. Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. *Applied and environmental microbiology* 58(9): 2717–22.

Rabatin, S. C. in Stinner, B. R. 1985. Arthropods as Consumers of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Mycologia* 77(2): 320.

Rabatin, S. C. in Stinner, B. R. 1988. Indirect effects of interactions between VAM fungi and soil-inhabiting invertebrates on plant processes. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 24(1–3): 135–146.

Rodríguez-Echeverría, S. in Freitas, H. 2006. Diversity of AMF associated with *Ammophila arenaria* ssp. *arundinacea* in Portuguese sand dunes. *Mycorrhiza* 16(8): 543–552.

Roose-Amsaleg, C. ., Garnier-Sillam, E. in Harry, M. 2001. Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. *Applied Soil Ecology* 18(1): 47–60.

Schickmann, S., Urban, A., Kräutler, K., Nopp-Mayr, U. in Hackländer, K. 2012. The interrelationship of mycophagous small mammals and ectomycorrhizal fungi in primeval, disturbed and managed Central European mountainous forests. *Oecologia* 170(2): 395–409.

Schneider, K., Renker, C. in Maraun, M. 2005. Oribatid mite (Acari, Oribatida) feeding on ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 16(1): 67–72.

Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., ... Schindel, D. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(16): 6241–6246.

Schupp, E. W. 1993. Quantity, quality and the effectiveness of seed dispersal by animals. *Vegetatio* 107–108(1): 15–29.

Schüßler, A., Schwarzott, D. in Walker, C. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* 105(12): 1413–1421.

Sevcik, J. 2003. Insects associated with wood-decaying fungi in the Czech and Slovak republics: a review of present knowledge.

Sevcik, J. 2010. *Czech and Slovak Diptera associated with fungi*.

Shapiro, S. S. in Wilk, M. B. 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52(3–4): 591–611.

Steffan, R. J., Goksøyr, J., Bej, A. K. in Atlas, R. M. 1988. Recovery of DNA from soils and sediments. *Applied and environmental microbiology* 54(12): 2908–15.

Torsvik, V., Goksøyr, J. in Daae, F. L. 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and environmental microbiology* 56(3): 782–7.

Trappe, J. in Maser, C. 1977. Ectomycorrhizal fungi: Interactions of mushrooms and truffles with beast or man. *Mushrooms and Man, an Interdisciplinary Approach to Mycology* 165–179.

Urban, A. 2016. Truffles and Small Mammals (str. 353–373).

Vašutová, M., Edwards-Jonášová, M., Veselá, P., Effenberková, L., Fleischer, P. in Cudlín, P. 2018. Management regime is the most important factor influencing ectomycorrhizal species community in Norway spruce forests after windthrow. *Mycorrhiza* 28(3): 221–233.

Vernes, K., Cooper, T. in Green, S. 2015. Seasonal fungal diets of small mammals in an Australian temperate forest ecosystem. *Fungal Ecology* 18(May 1994): 107–114.

Vernes, K. in Poirier, N. 2007. Use of a Robin's Nest as a Cache Site for Truffles by a Red Squirrel. *Northeastern Naturalist* 14: 145–149.

Welter-Schultes, F. W. 2012. *European non-marine molluscs, a guide for species identification*. Planet Poster Editions.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. in Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics. V *PCR Protocols* (str. 315–322). Elsevier.

Wolf, F. T. in Wolf, F. A. 1939. The Snail *Polygyra thyroidus* as a Mycophagist. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 66(1): 1.

Wood, J. R., Dickie, I. A., Moeller, H. V., Peltzer, D. A., Bonner, K. I., Rattray, G. in Wilmschurst, J. M. 2015. Novel interactions between non-native mammals and fungi facilitate establishment of invasive pines. *Journal of Ecology* 103(1): 121–129.

Yamashita, S. in Hijii, N. 2003. Effects of mushroom size on the structure of a mycophagous arthropod community: Comparison between infracommunities with different types of resource utilization. *Ecological Research* 18(2): 131–143.

Zambonelli, A., Ori, F. in Hall, I. 2017. Mycophagy and Spore Dispersal by Vertebrates. *The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem* 347.

Zielinski, W. J., Duncan, N. P., Farmer, E. C., Truex, R. L., Clevenger, A. P. in Barrett, R. H. 1999. Diet of Fishers (*Martes pennanti*) at the Southernmost Extent of Their Range. *Journal of Mammalogy* 80(3): 961–971.