

Izolacija eksogene glivne DNA iz neinvazivnih vzorcev (iztrebkov) prostoživečih parkljarjev

Isolation of exogenous fungal DNA from non-invasive samples (faeces) of wild ungulates

Luka Duniš¹, Felicita Urzi¹, Irena Maček^{1,2}, Boštjan Pokorny^{3,4}, Elena Bužan^{1,3}

¹ Univerza na Primorskem, Fakulteta za matematiko, naravoslovje in informacijske tehnologije, Oddelek za biodiverzitetu, Glagoljaška 8, 6000 Koper

² Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Jamnikarjeva ulica 101, 1000 Ljubljana

³ Fakulteta za varstvo okolja, Trg mladosti 7, 3320 Velenje

⁴ Gozdarski inštitut Slovenije, Večna pot 2, 1000 Ljubljana

Izvleček

Arbuskolarne mikorizne glive so simbioti velike večine kopenskih rastlin. Simbiotsko razmerje omogoča izmenjavo hranilnih snovi, mikoriza pa ima za rastline in glive tudi druge koristi. Veliki sesalci so s svojimi presnovnimi procesi (prehrana in izločanje, zohorija) pomembni vektorji za prenos in širjenje gliv znotraj in med različnimi okolji. Njihovi iztrebki so pomemben vir njihove DNA, a tudi vrst DNA, s katerimi se prehranjujejo, in mikrobne DNA. Izolacija DNA iz iztrebkov je zato zelo zahtevna in velikokrat neuspešna ter je velik izziv za laboratorijsko delo. V pričujoči študiji smo razvili metodo za učinkovito izolacijo DNA arbuskularnih mikoriznih gliv iz iztrebkov parkljarjev. V molekularnem laboratoriju smo preizkusili učinkovitost dveh različnih izolacijskih kompletov (*Qiagen QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit* in *Qiagen DNeasy PowerSoil Kit*) za ekstrakcijo glivne DNA iz iztrebkov srnjadi (*Capreolus capreolus*) in jelenjadi (*Cervus elaphus*). Učinkovitost kompleta smo ocenili na podlagi količine izolirane DNA in uspešnega pomnoževanja odsekov DNA

tarčne skupine gliv. Za pomnoževanje odsekov DNA smo uporabili začetne oligonukleotide NS31 in AM1 za 18S regijo ribosomske RNA arbuskularnih mikoriznih gliv. Ugotovili smo, da sta izolacija in kakovost DNA boljši z uporabo kompleta Qiagen DNeasy PowerSoil Kit. Z analizo dolžine odsekov smo potrdili, da so iztrebki prostoživečih parkljarjev lahko koristno orodje v okoljski genetiki, na primer kot vir glivne DNA, ki omogoča proučevanje širjenja mikoriznih gliv z živalmi ter drugih ekoloških interakcij v kopenskih ekosistemih (npr. prehranske preference in uživanje gliv, vzroki za ritje divjih prašičev, prenos gliv z zohorijo).

Ključne besede: arbuskularna mikoriza, glive, prostoživeči parkljarji, jelenjad, srnjad, DNA, PCR, molekularna ekologija

Abstract

Arbuscular mycorrhizal fungi are symbionts of a large majority of terrestrial plants. Along with other benefits of mycorrhiza, the symbiotic relationship allows exchange of nutrients among

Izvirni znanstveni članek

*symbiotic partners. Large mammals with their metabolic processes (i.e., nutrition and excretion, zoohory) are important vectors for the transfer and dispersal of fungi within and between different environments. Their faeces are an important source of their DNA, as well as DNA from the species they eat and microbial DNA. However, isolating DNA from faeces is difficult and often unsuccessful and poses a major challenge for laboratory work. We tested the efficiency of two different DNA isolation kits (Qiagen QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit, and Qiagen DNeasy PowerSoil Kit) for fungal DNA extraction from faeces of European roe deer (*Capreolus capreolus*) and red deer (*Cervus elaphus*). We estimated the efficiency of the kits by measuring the concentration of isolated DNA and by amplification success using the arbuscular mycorrhizal fungal specific NS31 and AM1 primers for the 18S region of ribosomal RNA. Fragments of 550 bp arbuscular mycorrhizal DNA were isolated and amplified, and we optimized the annealing temperatures using qPCR. In terms of better PCR amplification, our results showed that the Qiagen DNeasy PowerSoil Kit performed better than the Qiagen QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit. By analysing the lengths of DNA fragments, we confirmed that wild ungulate faeces can be a useful tool in environmental genetics, for example as a source of fungal DNA, which allows us to study the potential animal dispersal of mycorrhizal fungi and other ecological interactions in terrestrial ecosystems (e.g. dietary preferences and consumption of fungi, reasons for wild boar rooting, transmission of fungi by zoohory).*

Keywords: arbuscular mycorrhiza, fungi, wild ungulates, red deer, roe deer, DNA isolation, PCR, molecular ecology

1 Uvod

Neinvazivno vzorčenje, npr. zbiranje iztrebkov, dlake, perja, kože in sline prostoživečih živali, omogoča zbiranje velikega števila genetskih vzorcev, ne ogroža osebkov ciljne vrste in je

varnejše za raziskovalce. V zadnjih dvajsetih letih so slednji razvili učinkovite genetske metode za izolacijo DNA iz neinvazivnih vzorcev, ki omogočajo identifikacijo DNA v vzorcu (Long in sod., 2008). Čeprav je takšne vzorce enostavno pridobiti, je kakovost izolirane DNA majhna, kar se odraža tudi pri uspešnosti nadaljnjih genetskih analiz. Neinvazivno zbrani vzorci namreč pogosto vsebujejo majhne količine DNA ciljne skupine, ki je pomešana z mikrobno DNA, DNA organizmov, s katerimi se je žival hranila, in snovmi, ki lahko zavirajo verižno reakcijo s polimerazo (PCR) (Eggert in sod., 2005). V molekularni ekologiji uporabljamo izraz eksogena DNA za opis celotne DNA, ki jo najdemo v nekem organizmu, ne izvira pa iz organizma samega (Legan, 2018). Eksogena DNA izvira predvsem iz bakterij, gliv in virusov, ki živali potrebujejo za lasten cikel razmnoževanja (njihovega mikrobioma), vendar je lahko to tudi DNA rastlin in organizmov, s katerimi se žival prehranjuje (Ghasemzadeh in Namazi, 2015; Harder in Wilson, 1998; Ingold, 1953; Schupp, 1993). Glivna DNA je eden od virov eksogene DNA, ki v prebavni trakt živali pride s prehranjevanjem (objedanje korenin, prehranjevanje z razmnoževalnimi strukturami gliv (sporami ali trosi, trosnjaki ali sporokarpi)) ali naključno, pri čemer trosi gliv praviloma preživijo skozi prebavni trakt živali in se izločijo z iztrebki (Nuske in sod., 2017).

Mikorizne glive so simbionti večine kopenskih rastlin, pri čemer je arbuskularna mikoriza na Zemlji prisotna že več kot 400 milijonov let in spada med evolucijsko najstarejše tipe mikorize (Strullu-Derrien in sod., 2018). Del organizma mikoriznih gliv je pri vseh tipih mikorize v tleh, del pa v sožitju z gostiteljsko rastlino v koreninah, s katerimi tvorijo specifične morfološke strukture, namenjene predvsem izmenjavi snovi (npr. hranil) med rastlino in glivo (Dighton in White, 2017).

Ashkannejhad in Horton (2006) sta odkrila, da evropska srna/srnjad (*Capreolus capreolus*) razširja trose ektomikoriznih (ECM) gliv, ki so pomembne za razvoj borovih sestojev na

območjih, kjer še ni micelijske mreže ECM gliv. To kaže, da ECM glive ustvarjajo posebne ekološke prilagoditve in so pomembne za sukcesijo v neoptimalnih ali na novo nastajajočih habitatih. Večina sesalcev lahko trose gliv raznaša tudi naključno.

Arbuskularne mikorizne (AM) glive lahko na lokalnem nivoju hitro kolonizirajo nova območja, prisotnost združb gliv AM tudi v oddaljenih območjih pa kaže, da je širjenje mogoče tudi na velike razdalje (Davison in sod., 2018). Veliki sesalci, npr. nekateri predstavniki družine jelenov (*Odocoileus* sp.), snežne koze (*Oreamnos americanus*) in medvedi (*Ursus* sp.), lahko glivne trose razširjajo na velike razdalje (Luoma in sod., 2003). Tudi divji prašiči (*Sus scrofa*) so pomembni raznašalci trosov mnogih gliv (zbrano v Pokorny in Jelenko Turinek, 2013). V veliki meri pa ostaja nejasno, kako biotski in abiotski vektorji prispevajo k naključnemu ali usmerjenemu prenosu (Finlay, 2002) ter vplivajo na raznolikost AM gliv (Bueno in Moora, 2019; Davison in sod., 2018). Dokazi, da troši lahko preživijo tudi po prehodu skozi prebavila nevretenčarjev, kot so skakači (*Collembola*), deževniki (*Lumbricidae*), hrošči (*Coleoptera*) in mokrice (*Oniscidea*), ter vretenčarjev (ptic, plazilcev, majhnih in velikih sesalcev), pa kažejo, da se biotsko razširjanje trosov gliv AM pojavlja v raznovrstnih ekosistemih (Anslan in sod., 2016; Brown, 1995; Cooper in Vernes, 2011; Correia in sod., 2019; Hassall in sod., 1987; Houston in Bougher, 2010; Lekberg in sod., 2011; Mangan in Adler, 2002; McIlveen in Cole, 1976; Rabatin in Stinner, 1985, 1988).

Mikofagija (tj. prehranjevanje z glivami) pripomore k uspešnemu razširjanju glivnih trosov, ko fungivori razpršijo spore z uživanjem in iztrebljanjem živih spor (Maser in Maser, 1988). Troši, razpršeni na tak način, kalijo in tvorijo nove micelijske mreže, s čimer naselijo nova območja ali potencialno povečujejo gensko raznolikost obstoječih gliv (Johnson, 1996). Mikorizne glive tvorijo simbiozo z rastlinami, kjer rastline

glivam dovajajo ogljik, asimiliran v fotosintezi, glive pa olajšajo vnos mineralnih hranil iz tal v korenine rastlin. To razmerje je bistvenega pomena za preživetje in rast večine drevesnih vrst ter grmovnic, a tudi zelnatih rastlin (Fogel in Trappe, 1978). Fungivori lahko posredno vplivajo na vegetacijsko sukcesijo z razširjanjem trosov mikoriznih gliv in tako spodbujajo širjenje ter obnovo rastlinske vegetacije (Schickmann in sod., 2012). Maser in sod. (2008) domnevajo, da bi bile brez živalskega razširjanja glivnih trosov rast, obnova in prilagoditev mreže mikoriznih gliv in dreves zelo oslABLJENE ali nemogoče.

Sesalci razširjajo tudi glive AM. Vitalne trose so, npr., našli v iztrebkih afriških slonov (*Loxodonta africana*) (Paugy in sod., 2004), vektorji prenosa trosov so tudi glodavci in vrečarji (Janos in sod., 1995; Vernes in sod., 2015). Severnoameriški bizon (*Bison bison*) je pomemben vektor gliv AM v Nacionalnem parku Yellowstone (Lekberg in sod., 2011). Poleg bizona so pomemben vektor tudi vapatiji (*Cervus canadensis*); ki so, npr., pomagali pri ponovni naselitvi gliv na vulkanskem območju po izbruhu vulkana na gori St. Helens, Washington, ZDA (Allen, 1987).

V raziskavah, osredotočenih na primerjavo učinkovitosti različnih kompletov za izolacijo glivne DNA, so večinoma uporabili človeške iztrebke. Fiedorová in sod. (2019) so primerjali pet različnih kompletov za izolacijo mikrobne in glivne DNA iz človeških iztrebkov, med njimi tudi *QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit*. Problematiko izolacije DNA iz različnih vzorcev in medijev so v pregledni študiji proučili Lear in sod. (2018). Po pregledu nedavnih trendov in uporabe različnih metod so predlagali standardiziran nabor postopkov za uporabo na različnih organizmih in vzorčnih medijih; pri izolaciji glivne DNA iz iztrebkov rastlinojedih živali so predlagali uporabo kompleta *Qiagen DNeasy PowerSoil Kit*. Uporaba slednjega je priporočljiva tudi pri izolaciji DNA iz tal, sedimenta, listnega odpada in rastlinskih tkiv (Lear in sod., 2018). Za molekularne analize je poleg velike koncentracije

Izvirni znanstveni članek

DNA pomembna tudi čistost in celovitost izolirane DNA. Vzorci iztrebkov vsebujejo veliko snovi, kot so polisaharidi, žolčne soli in lipidi, ki zavirajo encimske reakcije v reakciji PCR (QIAGEN, 2020). Oba kompleta zagotavljata odstranitev tovrstnih zaviralcev PCR, prisotnih v iztrebkih (QIAGEN, 2020). Kompleta za izolacijo smo izbrali na osnovi omenjenih člankov (Fiedorová in sod., 2019; Lear in sod., 2018), čeprav je v osnovi en komplet namenjen izoliranju DNA iz iztrebkov, drugi pa iz sedimenta.

Gełbczyńska (1980), Pokorny in sod. (2004) ter Claridge in Trappe (2005) so dokazali, da se srnjad in navadni jelen/jelenjad (*Cervus elaphus*) prehranjujeta z različnimi skupinami mikoriznih gliv. Vendar o širjenju gliv AM s srnjadjo in jelenjadjo vemo zelo malo; primanjkuje tudi genetskih analiz, ki bi pripomogle k pojasnjevanju širjenja gliv AM z živalskimi vektorji. K proučevanju ekologije združb gliv AM so bistveno pripomogle genetske analize, pri katerih je bil v reakcijah PCR uporabljen par začetnih oligonukleotidov NS31 in AM1 (Helgason in sod., 1998). Par začetnih oligonukleotidov NS31 in AM1 pomnožuje 18S regijo ribosomske DNA, ki je dolga približno 550 baznih parov (Jiang in sod., 2015). Sekvence gliv AM iz različnih geografskih regij ali različnih ekosistemov so kasneje pogosto analizirali z uporabo prave kombinacije začetnih oligonukleotidov in so omogočile vpogled v odnos med glivami AM ter rastlinami v različnih okoljih (Lee in sod., 2008). Zato smo v naši študiji za analizo gliv AM uporabili omenjeni par začetnih oligonukleotidov.

Čeprav je par začetnih oligonukleotidov (NS31 – AM1) zasnovan tako, da se v reakciji PCR pomnožijo odseki DNA vseh podskupin gliv AM in izključi sekvence drugih organizmov, se lahko v primeru majhne količine DNA AM gliv v izvornem substratu (npr. nizke stopnje kolonizacije rastlinskih korenin z AM glivami) pojavi težava, tj. nespecifično

pomnoževanje zaporedij, ki pripadajo drugim organizmom (Lee in sod., 2008). Uspešnost specifičnega pomnoževanja je odvisna tudi od izhodiščnega materiala, ki ga uporabimo za izolacijo DNA. Zato smo v pričujoči raziskavi želeli: (i) primerjati uspešnost izolacije DNA arbuskularnih mikoriznih gliv iz iztrebkov parkljarjev (srnjadi, jelenjadi) z uporabo dveh komercialnih kompletov; (ii) optimizirati postopek pomnoževanja 18S regije ribosomske DNA AM gliv.

2 Materiali in metode

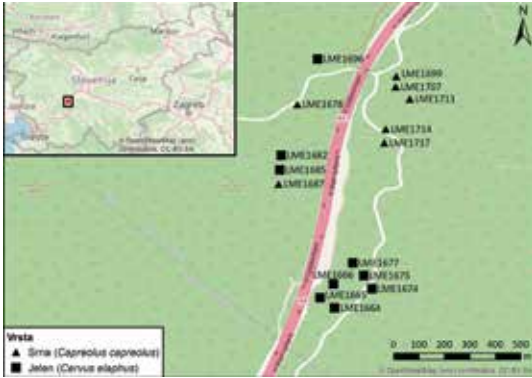
2.1 Vzorčenje

Sveže vzorce iztrebkov srnjadi in jelenjadi smo naključno zbrali na obeh straneh avtocestnega odseka Vrhnika–Logatec v obdobju marec–april 2019 (Slika 1 in Preglednica 1), in sicer v okviru raziskave *Strokovne podlage za zagotovitev ustreznih migracijskih koridorjev velikih zveri in drugih vrst velikih sesalcev na AC odseku Vrhnika–Postojna* (Al Sayegh-Petkovšek in sod., 2019). V pričujočo raziskavo smo vključili 16 vzorcev iztrebkov srnjadi (n = 7) in jelenjadi (n = 9). Vzorce smo hranili v zamrzovalnih posodicah v zmrzovalniku pri –80 °C.

2.2 Izolacija DNA

DNA smo izolirali z uporabo dveh različnih komercialnih kompletov: *Qiagen QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit* (Qiagen, Nemčija, kataloška številka 51604, leto izdelave 2019; v nadaljevanju: komplet *Stool*) in *Qiagen DNeasy PowerSoil Kit* (Qiagen, Nemčija, kataloška številka 12888-100, leto izdelave 2019; v nadaljevanju: komplet *Soil*). Za vsak komplet smo uporabili 200 mg svežih iztrebkov.

Izvirni znanstveni članek



Slika 1: Lokacije vzorčenja iztrebkov srnjadi in jelenjadi na obeh straneh avtocestnega odseka Vrhnika–Logatec. Vzorci so označeni z identifikacijsko oznako (LME); iztrebki srnjadi so označen s trikotnikom, jelenjadi pa s kvadratom.

Figure 1: Red deer and roe deer faeces sampling locations on both sides of the Vrhnika-Logatec motorway section. Samples are marked with an identification tag (LME); roe deer faeces are marked with a triangle and red deer faeces with a square.

Preglednica 1: Podatki o vzorcih iztrebkov, vključenih v raziskavo

Table 1: Data on the faeces samples included in the study.

LME koda	Vrsta	Bližnji objekt
LME1664	navadni jelen	podhod
LME1665	navadni jelen	podhod
LME1666	navadni jelen	podhod
LME1674	navadni jelen	podhod
LME1675	navadni jelen	podhod
LME1677	navadni jelen	podhod
LME1678	evropska srna	nadhod
LME1682	navadni jelen	nadhod
LME1685	navadni jelen	nadhod
LME1687	evropska srna	nadhod
LME1696	navadni jelen	nadhod
LME1699	evropska srna	nadhod
LME1707	evropska srna	nadhod
LME1711	evropska srna	nadhod
LME1714	evropska srna	nadhod
LME1717	evropska srna	nadhod

Komplet Stool

Komplet 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 iztrebkov v inhibitEX pufri ter čiščenje DNA na QIAamp Mini kolonah. Komplet vsebuje šest raztopin, epice in kolone z membrano iz silicijevega oksida. Pred začetkom smo pripravili raztopine po proizvajalčevih navodilu in sledili korakom v navodilih.

Komplet Soil

Komplet temelji na postopku odstranjevanja huminskih substanc. Postopek je učinkovit pri odstranjevanju zaviralcev reakcije PCR tudi iz najzahtevnejših 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 nato speremo in eluiramo z membrane. Izolirana DNA je pripravljena za analizo PCR in druge aplikacije. Komplet vsebuje šest raztopin, kolone z membrano iz silicijevega oksida, epice s kroglicami in 2 ml epice. Pred začetkom smo pripravili raztopine po proizvajalčevem navodilu in sledili korakom v navodilih.

2.3 Izbira vzorcev za prvi PCR test

Vzorci za analize PCR smo izbrali na osnovi najvišje vsebnosti izolirane DNA, saj je za uspešno PCR pomembna dovolj visoka koncentracija DNA. Zato smo izbrali set vzorcev, izoliranih s kompletom z višjo povprečno koncentracijo DNA. Po izolaciji DNA smo izmerili koncentracijo DNA v vseh 32 vzorcih (16 za vsak komplet) z uporabo reagentov Qubit® dsDNA BR (Thermo Fisher Scientific, ZDA) in fluorimetra Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific, ZDA).

Preglednica 2: Nukleotidno zaporedje para začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje 18S regije ribosomske DNA, uporabljenih v raziskavi

Table 2: Nucleotide sequence of the pair of primers for amplification of the 18S region of ribosomal DNA used in the study

Začetni oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje
Smerni (angl. <i>forward</i>) (NS31)	TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC
Protismerni (angl. <i>reverse</i>) (AM1)	GTTTCCCGTAAGGCGCCGAA

Preglednica 3: Reagenti, uporabljeni za reakcijo PCR

Table 3: Reagents used for the PCR reaction

Reagent	Volumen (µL)	Koncentracija
Taq AllTaq	0,30	0,08 U
Reakcijski pufer	5,00	5 mM
MgCl ₂	1,20	1,50 µM
dNTPs	0,50	0,25 mM
Smerni začetni oligonukleotid	0,30	0,15 µM
Protismerni začetni oligonukleotid	0,30	0,15 µM
Q raztopina	1,00	/
H ₂ O	8,40	/
DNA	3,00	/

Preglednica 4: Temperaturni protokol reakcije PCR

Table 4: Temperature protocol for the PCR reaction

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

2.4 Pomnoževanje DNA

Izolirano DNA smo pomnožili v reakciji PCR. Reakcijo smo izvedli na 16 vzorcih DNA, izolirane s kompletom Soil. V reakciji smo uporabili začetna oligonukleotida NS31 in AM1 (Preglednica 2) (Helgason in sod., 1998).

Pogoji reakcije PCR

Reakcijska mešanica je zajemala reagente, volumne, koncentracije in pogoje, kot so prikazani v Preglednicah 3 in 4.

2.5 Agarozna gelska elektroforeza

Najprej smo z uporabo agarozne gelske elektroforeze na 1,5 % gelu preverili uspešnost pomnoževanja odsekov DNA na 16 vzorcih, pri katerih smo DNA izolirali s kompletom *Soil*. Z uporabo agarozne gelske elektroforeze, pri kateri se pomnoženi odseki DNA, ki jim dodamo ustrezno fluorescentno barvilo, ločijo po velikosti, lahko končne produkte vizualiziramo pod UV-svetlobo in tako preverimo uspešnost pomnoževanja odsekov DNA.

Pripravili smo 1,5 % gel, uporabili fluorescentno barvilo Midori Green (NIPPON Genetics, Nemčija) ter velikostni standard TrackIt™ 50 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, ZDA), ki ima pri 500bp tudi določeno koncentracijo produkta. Koncentracijo oznake smo uporabili tudi za določevanje koncentracije produktov v izbranih vzorcih. Gelska elektroforeza je potekla na 120 V, 35 min. Preverili smo uspešnost pomnoževanja DNA na 16 vzorcih, pri katerih smo DNA izolirali s kompletom *Soil*. Koncentracijo produktov PCR smo ocenili s primerjavo intenzivnosti fluorescence fragmenta med vzorcem in velikostnim standardom, saj je koncentracija produkta dolžine 500 bp normalizirana na 26,8 ng/μL.

2.6 Izbira vzorcev za drugi PCR test

Na štirih vzorcih, pri katerih je bil prisoten odsek DNA dolžine približno 550 bp (pri drugih vzorcih ni bilo tarčnega produkta), smo ponovili PCR ter produkte reakcije uporabili za nadaljnjo primerjavo uspešnosti med kompletoma *Soil* in *Stool*.

2.7 Statistične analize

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

primerjalno analizo pa neparametrični Mann-Whitneyjev U-test (Mann in Whitney, 1947).

3 Rezultati

3.1 Koncentracija izolirane DNA

Z uporabljenima izolacijskima kompletoma smo uspešno izolirali DNA, in sicer iz 15 s kompletom *Soil* in iz 16 s kompletom *Stool*. Koncentracije izolirane DNA so bile, upoštevajoč oba kompleta skupaj, od 0 ng/μL do 29,4 ng/μL (povprečno $8,61 \pm 6,26$ ng/μL); vrednosti za posamezni komplet so navedene v preglednici 5.

Vrednosti koncentracije DNA, izolirane s kompletom *Stool*, niso bile normalno porazdeljene, zato smo za statistično analizo uporabili neparametrični Mann-Whitneyjev U-test. Rezultati primerjalne analize med kompletoma so pokazali, da je bila mediana koncentracije izolirane DNA značilno večja pri kompletu *Soil* kot pri kompletu *Stool* ($U = 62,0$, $p = 0,013$).

3.2 Analiza uspešnosti pomnoževanja regije male podenote ribosoma (SSU)

Za analizo uspešnosti pomnoženih produktov PCR smo uporabili agarozno gelsko elektroforezo. Rezultati uspešnosti pomnoževanja 16 vzorcev, pri katerih smo DNA izolirali s kompletom *Soil*, so prikazani na sliki 2. Pri vzorcih LME1678, LME1699, LME1707 in LME1711 je bila uspešnost pomnoževanja boljša (koncentracija višja od 67 ng/μl) v primerjavi s preostalimi dvanajstimi vzorci (prikazano z belim okvirjem).

Primerjava uspešnosti pomnoževanja regij SSU med obema kompletoma na izbranih vzorcih je prikazana na sliki 3. Jakost in položaj signala sta boljša pri vzorcih LME1678 in LME1699, kjer smo DNA izolirali s kompletom *Soil*.

Izvirni znanstveni članek

Preglednica 5: Koncentracija DNA (ng/μL) po izolaciji glede na uporabljen komplet

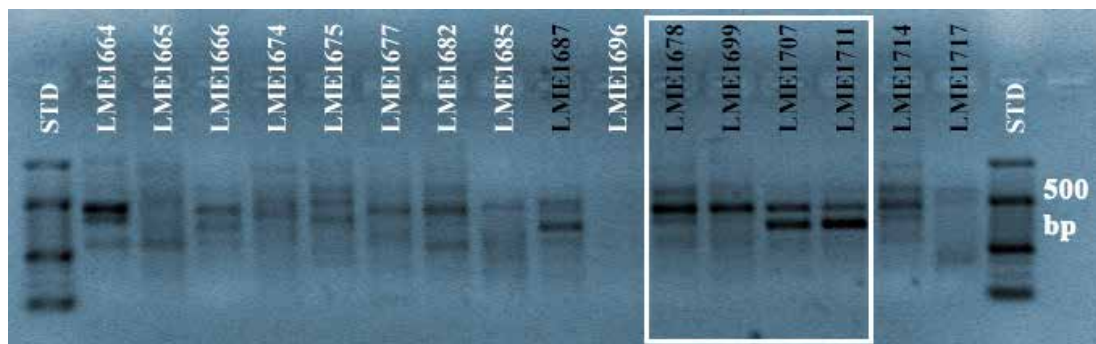
Table 5: DNA concentration (ng/μL) after isolation based on the kit used

Reagent	Komplet <i>Stool</i>	Koncentracija <i>Soil</i>
Uspešnost izolacije (%)	100	93,7
Povprečje (ng/μL)	6,67	10,6
Mediana (ng/μL)	4,07	10,5
Standardni odklon (ng/μL)	6,53	5,49
Minimum (ng/μL)	2,00	0,00
Maksimum (ng/μL)	29,4	20,2

4 Razprava

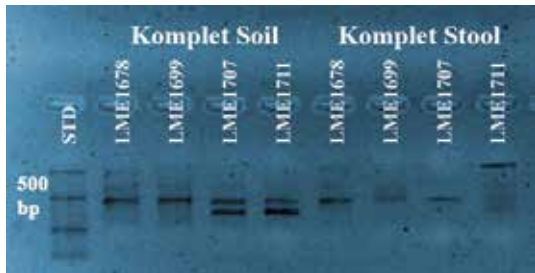
Namen raziskave je bil preizkusiti učinkovitost dveh različnih izolacijskih kompletov (*Qiagen QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit* in *Qiagen DNeasy PowerSoil Kit*) za pridobitev glivne (eksogene) DNA iz iztrebkov srnjadi in jelenjadi. Iztrebki so pogost in dostopen vir genetskega materiala, ki se uporablja v mnogih molekularno-genetskih študijah. Zato so testiranja optimalnih protokolov za izolacijo DNA gliv AM izjemno pomembna za pospeševanje raziskav pomena širjenja gliv AM z zoohorijo, a tudi za proučevanje raznolikosti glivnih vrst, njihove ekologije in interakcije s prostoživečimi živalmi.

Na podlagi koncentracije DNA in rezultatov agarozne gelske elektroforeze smo ugotovili, da je komplet *Qiagen DNeasy PowerSoil Kit* učinkovitejši za izolacijo glivne DNA v primerjavi s kompletom *QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit*. V dveh predhodnih raziskavah so že uporabili živalske iztrebke za določitev in prepoznavo DNA gliv AM (Lekberg in sod., 2011; Nielsen in sod., 2016), in sicer so v prvi uporabili komplet *Microbial DNA Isolation Kit*, v drugi pa so DNA izolirali s klasično metodo (kloroform/izopropanol) brez uporabe specifičnega kompleta. Po našem vedenju še nikoli ni bil uporabljen komplet *QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit* v raziskavah, kjer bi tarčno iskali glivno DNA v živalskih iztrebkih. Če strnemo rezultate, lahko zaključimo, da so z uporabo



Slika 2: Gelska elektroforeza vzorcev (agarozni gel), izoliranih s kompletom *Soil*. V beli barvi so napisani vzorci jelenjadi, v črni pa srnjadi. Oznake predstavljajo dolžino (bp) posameznega fragmenta DNA; STD predstavlja lestvico dolžine tisoč baznih parov. Označen je standard z dolžino 500 bp, kjer pričakujemo, da se bo pojavil pomnožek DNA pri vzorcih, ki vsebujejo DNA gliv AM. Uporabljeni standard je TrackIt™ 50 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, ZDA), volumen nanosa je 2 μL.

Figure 2: Gel electrophoresis of samples (agarose gel) isolated with the *Soil* kit. Red deer samples are in white and roe deer samples are in black. The markings represent the length (bp) of each DNA fragment; STD represents the thousand base pair length scale. A standard of 500 bp is indicated, where DNA amplification is expected to occur in samples containing AM fungal DNA. The standard used is TrackIt™ 50 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA), the loading volume is 2 μL.



Slika 3: Gelska elektroforeza oz. primerjava izbranih štirih vzorcev. Prvi fragment je standard (STD), ki je isti kot na sliki 2. Naslednji štiri fragmenti so fragmenti DNA, izolirani s kompletom Soil, zadnje štiri pa smo izolirali s kompletom Stool. Uporabljeni standard je TrackIt™ 50 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, ZDA), volumen nanosa je 2 μ L.

Figure 3: Gel electrophoresis comparison of four selected samples. The first fragment is the standard (STD), which is the same as in Figure 2. The next four fragments are DNA fragments isolated with the Soil kit, and the last four were isolated with the Stool kit. The standard used is TrackIt™ 50 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA), the loading volume is 2 μ L.

kompleta *Qiagen DNeasy PowerSoil Kit*, v primerjavi s kompletom *QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit*, koncentracije glivnih DNA, izoliranih iz živalskih iztrebkov, večje.

Pomnoževanje regije SSU, ki je najbolj uporabljena regija za določitev gliv AM (Hart in sod., 2015; Öpik in sod., 2010), je bila uspešna v 69 % vzorcev. Regija SSU je bila uspešno pomnožena pri vseh štirih testnih vzorcih (LME1678, LME1699, LME1707 in LME1711), izoliranih s kompletom *Qiagen DNeasy PowerSoil*.

Dosedanje raziskave so pokazale zelo pomembno vlogo malih sesalcev pri širjenju trosov (spor) AM gliv (Paz in sod., 2021). Veliki sesalci imajo zaradi svojih po navadi obsežnih življenjskih okolišev, velikega vnosa hranil in njihovega dolgega časa zadrževanja v črevesju edinstveno in ključno vlogo v procesu širjenja trosov na velike razdalje (Forbes in sod., 2019). Zaradi velikega življenjskega okoliša, pogostega širjenja in selitev je bil navadni jelen že pred desetletji prepoznani kot pomemben vektor širjenja AM gliv (Allen, 1987). Na podlagi molekularnih analiz so Nielsen in

sod. (2016) ugotovili, da lahko tudi gosi (*Anser sp.*) pripomorejo k širjenju gliv AM med oddaljenimi otoki. Vendar raziskave, ki bi obravnavale vpliv selitev oz. prostorskega vedenja sesalcev in ptic na strukturo glivnih združb, še niso bile opravljene. Prav ptice in sesalci sta najbolj spregledani skupini potencialno pomembnih razširjevalcev trosov gliv AM; doslej so bile namreč objavljene le posamezne publikacije na to temo o pticah in velikih sesalcih, medtem ko so bili mali sesalci kot vektor širjenja gliv AM obravnavani v 120 publikacijah (zbrano v Paz in sod., 2021). Z našo raziskavo smo dokazali, da sta smjad in jelenjad pomembna vektorja za širjenje gliv AM, saj smo z genetskimi analizami potrdili prisotnost glivne DNA v analiziranih iztrebkih.

V prihodnje bi bilo treba ugotoviti, kako prostorsko vedenje (selitve, širitve) živali vpliva na razširjanje gliv in kako učinkovito prepoznati uspešne razširjevalce gliv AM, saj je dokazovanje prisotnosti DNA gliv v iztrebkih živih organizmov težavno in zamudno zaradi morebitne hkratne določitve eksogene DNA, ki prihaja iz drugih virusov (rastlin, bakterij). Ravno zato je prvi korak k uspešni določitvi tarčne DNA uspešna izolacija iz izhodnega materiala (npr. iztrebki, vsebina črevesja oz. želodca). Dokazali smo, da na učinkovitost izolacije DNA značilno vplivata protokol in uporabljeni komplet reagentov. Koncentracija skupne izolirane DNA iz iztrebkov je bila pri uporabi kompleta *Qiagen DNeasy PowerSoil* značilno večja kot koncentracija DNA, izolirana s kompletom *QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit*. Ravno tako je bila uspešnost pomnoženih specifičnih fragmentov SSU regije AM gliv večja pri vzorcih DNA, izolirane s kompletom *Qiagen DNeasy PowerSoil*.

5 Zaključki

Arbuskulame mikorizne glive so sestavni del večine kopenskih ekosistemov in pomembno prispevajo k ekosistemskim storitvam, kot so privzem mineralnih hranil, vezava ogljika in ohranjanje raznolikosti rastlin. Ohranjanje raznolikosti mikoriznih gliv v ekosistemih je zato pomemben vidik ohranjanja

Izvirni znanstveni članek

habitatov in biotske raznovrstnosti. Mikofagija (prehranjevanje z glivami), ki jo prakticirajo številne živali, naj bi v veliki meri vplivala na strukturo glivnih združb in sočasno razširjanje vrst mikoriznih gliv (Vašutová in sod., 2019). Vendar moramo biti pri posploševanju ugotovitev o odnosu med živalmi in mikoriznimi glivami pazljivi, saj je po sedaj znanih podatkih razširjanje nekaterih vrst mikoriznih gliv odvisno samo od ene ali dveh vrst vretenčarjev (Dighton in White, 2017).

Ugotovili smo, da je med dvema testiranima protokoloma za izolacijo DNA gliv iz iztrebkov boljša uporaba kompleta *Soil*. Par začetnih oligonukleotidov, ki smo ga uporabili (NS31–AM1), se je pokazal kot ustrezen za pomnoževanje SSU regije AM-gliv iz iztrebkov prostoživečih prežvekovalcev. Ugotovili smo, da v iztrebkih srnjadi in jelenjadi najdemo DNA AM- gliv (le-to smo izolirali iz prav vseh analiziranih iztrebkov). Zato lahko sklepamo, da so prostoživeči parkljarji pomembni vektorji širjenja te taksonomske skupine gliv.

6 Summary

Arbuscular mycorrhizal (AM) fungi are an integral component of most terrestrial ecosystems and contribute to many ecosystem services, such as nutrient fixation, carbon sequestration and maintenance of plant diversity. Therefore, maintaining the diversity of mycorrhizal fungal taxa in ecosystems is an important aspect of habitat conservation. Mycophagy, practiced by many widespread animals, is thought to have a major impact on fungal community structure and the coexistence of fungal taxa. However, we need to be careful in generalizing interactions between animals and mycorrhizal fungi, because some fungal taxa depend on only one or two species of vertebrates to disperse them. The objective of this study was to compare and optimize the protocol for successful DNA isolation of AM mycorrhizal fungi from deer faeces, as faeces are a common and accessible source of genetic material used in population genetics studies. The protocol would allow further research on the dispersal of mycorrhizal

fungi by ungulates while allowing the study of fungal diversity and interactions with wildlife. Our research showed that among the tested protocols, the best one for isolating fungi from faeces is to use the Soil kit and PCR annealing temperatures of 58°C. The primers we used (NS31–AM1) were found to be suitable for amplification of AM fungi from this source. We found (extracted) AM fungal DNA from all analysed faeces of (red and roe) deer; which confirms that these two species (and wild ungulates in general) are important vectors of mycorrhizal fungi.

7 Viri

Al Sayegh-Petkovšek, S., Kotnik, K., Bužan, E., 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. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(87\)80019-0](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(87)80019-0)

Anslan, S., Bahram, M., 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. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.02.006>

Ashkannejhad, S., 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. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01593.x>

Brown, G. G. (1995). How do earthworms affect microfloral and faunal community diversity? *Plant and Soil*, 170(1), 209–231. <https://doi.org/10.1007/BF02183068>

Bueno, C. G., Moora, M. (2019). How do arbuscular mycorrhizal fungi travel? *New Phytologist*, 222(2), 645–647. <https://doi.org/10.1111/nph.15722>

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

Izvirni znanstveni članek

- Cooper, T., 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. <https://doi.org/10.7882/AZ.2011.020>
- Correia, M., Heleno, R., da Silva, L. P., Costa, J. M., Rodríguez-Echeverría, S. (2019). First evidence for the joint dispersal of mycorrhizal fungi and plant diaspores by birds. *New Phytologist*, 222(2), 1054–1060. <https://doi.org/10.1111/nph.15571>
- Davison, J., Moora, M., Öpik, M., Ainsaar, L., Ducousso, M., Hiiesalu, I., in sod. (2018). Microbial island biogeography: isolation shapes the life history characteristics but not diversity of root-symbiotic fungal communities. *The ISME Journal*, 12(9), 2211–2224. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0196-8>
- Dighton, J., White, J. (2017). *The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem*. Fourth Edition, CRC Press.
- Eggert, L. S., Maldonado, J. E., Fleischer, R. C. (2005). Nucleic acid isolation from ecological samples – animal scat and other associated materials. V: *Methods in Enzymology* 395, 73–82. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)95006-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)95006-4)
- Fiedorová, K., Radvanský, M., Němcová, E., Grombířiková, H., Bosák, J., Černochová, M., in sod. (2019). The impact of DNA extraction methods on stool bacterial and fungal microbiota community recovery. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00821>
- Finlay, B. J. (2002). Global dispersal of free-living microbial Eukaryote species. *Science*, 296(5570), 1061–1063. <https://doi.org/10.1126/science.1070710>
- Fogel, R., Trappe, J. (1978). Fungus consumption (mycophagy) by small animals. *Northwest Science*.
- Forbes, E. S., Cushman, J. H., Burkepille, D. E., Young, T. P., Klope, M., Young, H. S. (2019). Synthesizing the effects of large, wild herbivore exclusion on ecosystem function. *Functional Ecology*, 33(9), 1597–1610. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13376>
- Gełczyńska, Z. (1980). Food of the roe deer and red deer in the Białowieża Primeval Forest. *Acta Theriologica*, 25(2), 487–500. <https://doi.org/10.4098/AT.arch.80-44>
- Ghasemzadeh, I., Namazi, S. H. (2015). Review of bacterial and viral zoonotic infections transmitted by dogs. *Journal of medicine and life*, 8(4), 1–5.
- Harder, L. D., Wilson, W. G. (1998). Theoretical consequences of heterogeneous transport conditions for pollen dispersal by animals. *Ecology*, 79(8), 2789–2807.
- Hart, M. M., Aleklett, K., Chagnon, P.-L., Egan, C., Ghignone, S., Helgason, T., in sod. (2015). Navigating the labyrinth: a guide to sequence-based, community ecology of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 207(1), 235–247. <https://doi.org/10.1111/nph.13340>
- Hassall, M., Turner, J. G., Rands, M. R. W. (1987). Effects of terrestrial isopods on the decomposition of woodland leaf litter. *Oecologia*, 72(4), 597–604. <https://doi.org/10.1007/BF00378988>
- Helgason, T., Daniell, T. J., Husband, R., Fitter, A. H., Young, J. P. W. (1998). Ploughing up the wood-wide web? *Nature*, 394(6692), 431–431. <https://doi.org/10.1038/28764>
- Houston, T. F., 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. <https://doi.org/10.1111/j.1440-6055.2009.00720.x>
- Ingold, C. T. (1953). *Dispersal in fungi*. Clarendon Press.
- Janos, D. P., Sahley, C. T., Emmons, L. H. (1995). Rodent dispersal of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in Amazonian Peru. *Ecology*, 76(6), 1852–1858. <https://doi.org/10.2307/1940717>
- Jiang, S., Shi, G., Mao, L., Pan, J., An, L., Liu, Y., Feng, H. (2015). Comparison of different PCR primers on detecting arbuscular mycorrhizal communities inside plant roots. *Acta microbiologica Sinica*, 55(7), 916–25. <https://doi.org/10.13343/j.enki.wsxb.20140581>
- Johnson, C. N. (1996). Interactions between mammals and ectomycorrhizal fungi. *Trends in Ecology and Evolution*. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(96\)10053-7](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(96)10053-7)

Izvirni znanstveni članek

- Lear, G. D., Banks, I., Boyer, J., Buckley, S., Buckley, H., in sod. (2018). Methods for the extraction, storage, amplification and sequencing of DNA from environmental samples. *New Zealand Journal of Ecology*, 42(1), 10-50A.
- Lee, J., Lee, S., Young, J. P. W. (2008). Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, 65(2), 339-349. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00531.x>
- Legan M. (ur.), in sod. (2018). Slovenski medicinski slovar. On-line.
- Lekberg, Y. M., Rohr, J., Redecker, D., Zabinski, C. A. (2011). Importance of dispersal and thermal environment for mycorrhizal communities: lessons from Yellowstone National Park. *Ecology*, 92(6), 1292-1302. <https://doi.org/10.1890/10-1516.1>
- Long, R. A., MacKay, P., Ray, J. C., Zielinski, W. J. (Eds.). (2008). *Noninvasive Survey Methods for Carnivores*. Washington: Island Press.
- Mangan, S. A., Adler, G. H. (2002). Seasonal dispersal of arbuscular mycorrhizal fungi by spiny rats in a neotropical forest. *Oecologia*, 131(4), 587-597. <https://doi.org/10.1007/s00442-002-0907-7>
- Mann, H. B., 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. <https://doi.org/10.1214/aoms/1177730491>
- Maser, C., Claridge, A. W., Trappe, J. M. (2008). *Trees, Truffles, and Beasts*. Rutgers University Press.
- Maser, C., Maser, Z. (1988). Interactions among squirrels, mycorrhizal fungi, and coniferous forests in Oregon. *The Great Basin naturalist*, 48, 8.
- McIlveen, W. D., Cole Jr., H. (1976). Spore dispersal of Endogonaceae by worms, ants, wasps, and birds. *Canadian Journal of Botany*, 54(13), 1486-1489. <https://doi.org/10.1139/b76-161>
- Nielsen, K. B., Kjølner, R., Bruun, H. H., Schnoor, T. K., Rosendahl, S. (2016). Colonization of new land by arbuscular mycorrhizal fungi. *Fungal Ecology*, 20, 22-29. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.10.004>
- Nuske, S. J., Vernes, K., May, T. W., Claridge, A. W., Congdon, B. C., Krockenberger, A., Abell, S. E. (2017). Data on the fungal species consumed by mammal species in Australia. *Data in Brief*, 12, 251-260. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2017.03.053>
- Öpik, M., Vanatoa, A., Vanatoa, E., Moora, M., Davison, J., Kalwij, J. M., in sod. (2010). The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *New Phytologist*, 188(1), 223-241. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03334.x>
- Paugy, M., Baillon, F., Damien, C., Duponnois, R. (2004). Elephants as dispersal agents of mycorrhizal spores in Burkina Faso. *African Journal of Ecology*, 42, 225-227. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2028.2004.00524.x>
- Paz, C., Öpik, M., Bulascoschi, L., Bueno, C. G., Galetti, M. (2021). Dispersal of arbuscular mycorrhizal fungi: Evidence and insights for ecological studies. *Microbial Ecology*, 81(2), 283-292. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01582-x>
- QIAGEN. (2020). QIAamp® Fast DNA Stool Mini Handbook, (February), 44.
- Rabatin, S. C., Stinner, B. R. (1985). Arthropods as consumers of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologia*, 77(2), 320. <https://doi.org/10.2307/3793086>
- Rabatin, S. C., 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. [https://doi.org/10.1016/0167-8809\(88\)90061-8](https://doi.org/10.1016/0167-8809(88)90061-8)
- Schickmann, S., Urban, A., Kräutler, K., Nopp-Mayr, U., 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. <https://doi.org/10.1007/s00442-012-2303-2>
- Schupp, E. W. (1993). Quantity, quality and the effectiveness of seed dispersal by animals. *Vegetatio*, 107-108(1), 15-29. <https://doi.org/10.1007/BF00052209>

Izvirni znanstveni članek

Shapiro, S. S., Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52(3–4), 591–611. <https://doi.org/10.1093/biomet/52.3-4.591>

Strullu-Derrien, C., Selosse, M.-A., Kenrick, P., Martin, F. M. (2018). The origin and evolution of mycorrhizal symbioses: from palaeomycology to phylogenomics. *New Phytologist*, 220(4), 1012–1030. <https://doi.org/10.1111/nph.15076>

Vašutová, M., Mlecško, P., López-García, A., Maček, I., Boros, G., Ševčík, J., in sod. (2019). Taxi drivers: the role of animals in transporting mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 29(5), 413–434. <https://doi.org/10.1007/s00572-019-00906-1>

Vernes, K., Cooper, T., Green, S. (2015). Seasonal fungal diets of small mammals in an Australian temperate forest ecosystem. *Fungal Ecology*, 18, 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.09.015>