

# FOLIA BIOLOGICA ET GEOLOGICA



---

# FOLIA BIOLOGICA ET GEOLOGICA

---

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

**66/2**  
**2025**

---

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

---



LJUBLJANA 2025

Uredniški odbor / *Editorial Board*

Dalibor Ballian (Bosna in Hercegovina), Matjaž Gogala, Špela Goričan, Jožica Gričar, Hojka Kraigher, Ivan Kreft, Ljudevit Ilijanič (Hrvaška), Branko Vreš in Mitja Zupančič

Glavna in odgovorna urednica / *Editor*

Hojka Kraigher

Tehnični urednik / *Technical Editor*

Janez Kikelj

Oblikovanje / *Design*

Milojka Žalik Huzjan

Prelom / *Layout*

Medija grafično oblikovanje

Sprejeto na seji razreda za naravoslovne vede SAZU dne 13. septembra 2022 in na seji predsedstva SAZU 11. oktobra 2022.

Naslov Uredništva / *Editorial Office Address*

FOLIA BIOLOGICA ET GEOLOGICA

SAZU

Novi trg 3, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

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

Avtorji v celoti odgovarjajo za vsebino in jezik prispevkov.

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

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

**FOLIA BIOLOGICA ET GEOLOGICA (Ex Razprave IV. razreda SAZU)** je vključena v / *is included into*: COBISS.SI; Aquatic Sciences and Fisheries Abstracts (ASFA); CAB Abstracts; GeoRef; Zoological Record; Directory of Open Access Journals (DOAJ) (v postopku).

© 2025, Slovenska akademija znanosti in umetnosti

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

Naslovnica: Seme (samare) gorskega javorja s Pokljuke (Foto: Peter Čadež, Zavod za gozdove Slovenije, OE Bled).

Cover photo: Seeds (samara) of mountain maple from Pokljuka (Photo: Peter Čadež, Slovenia Forest Service, RU Bled).

## VSEBINA CONTENTS

*Tina Unuk Nahberger*

- 5 Plant growth promoting microorganisms: a promising tool for improving forest tree seedlings survival (a review)
- 5 Rastlinam koristni mikroorganizmi: obetavno orodje za izboljšanje preživetja gozdnih sadik (pregledni članek)

*Kristina Andrejc, Maša Jarčič, Ion Gutierrez-Aguirre, Denis Kutnjak, Katarina Bačnik*

- 21 Viromska analiza RNA virusov v vzorcih Triglavskega ledenika in ledenika pod Skuto
- 21 Viromics analysis of RNA viruses in samples from the Triglav and Skuta glacier

*Gregor Božič, Marijana Vidrih Minič, Boris Rantaša, Andrej Breznikar*

- 39 Obseg opravljenih del in stroškov obnove gozdov s sajenjem in setvijo ter ukrepov varstva pred poškodbami po divjadi v obdobju 2007–2020
- 39 The extent of labour and costs of forest restoration with planting, sowing, and protection measures against game damages in Slovenia in the period 2007-2020



# PLANT GROWTH PROMOTING MICROORGANISMS: A PROMISING TOOL FOR IMPROVING FOREST TREE SEEDLINGS SURVIVAL (A REVIEW)

## RASTLINAM KORISTNI MIKROORGANIZMI: OBETAVNO ORODJE ZA IZBOLJŠANJE PREŽIVETJA GOZDNIH SADIK (PREGLEDNI ČLANEK)

Tina UNUK NAHBERGER<sup>1</sup>

<http://dx.doi.org/10.3986/fbg0115>

### ABSTRACT

Severe drought events and increasingly frequent large-scale forest disturbances can lead to a significant and irreversible decline in the natural regeneration of various forest tree species. Extensive research is being carried out to develop strategies to help plants cope with the increasing stress. However, most of these technologies are costly and time-consuming, so the application of plant growth-promoting microorganisms (PGPMs) appears to be an easy-to-use and efficient method to alleviate abiotic and biotic stress in plants. PGPM inoculants are a sustainable alternative strategy to not only alleviate stress through various mechanisms, but also to promote plant growth and development. Previous studies have revealed a wide range of PGPM genera that colonise plant roots and enhance the ability of plants to cope with abiotic and biotic stress in agriculture. However, records on the potential benefits of PGPMs in forest seedlings are still sparse, with only a few reports and mostly isolated strains from the genera *Pinus*, *Quercus*, *Abies* and *Picea*. This review addresses the current knowledge on plant growth-promoting mechanisms and provides an overview of isolated microorganisms with proven plant growth-promoting mechanisms from different forest tree species.

**Keywords:** plant growth promoting microorganisms, reforestation, nurseries, forest tree seedling survival

### IZVLEČEK

Pogoste hude suše in vse večje obsežne motnje v gozdovih ogrožajo naravno regeneracijo številnih drevesnih vrst ter lahko povzročijo pomemben in nepovraten upad gozdnih ekosistemov. V zadnjih letih potekajo številne raziskave za razvoj strategij, ki bi povečale odpornost rastlin na tovrstne obremenitve, vendar so obstoječe tehnologije pogosto drage in časovno zahtevne. Uporaba rastlinam koristnih mikroorganizmov (PGPMs) se zato kaže kot obetavna, trajnostna in stroškovno učinkovita alternativa za zmanjševanje abiotičnih in biotskih stresov ter za spodbujanje rasti in razvoja rastlin. PGPMs inokulanti delujejo preko različnih mehanizmov, vključno z mobilizacijo hranil, sintezo fitohormonov, uravnavanjem stresnih hormonov in zatiranjem patogenov, s čimer krepijo rast in odpornost rastlin. Čeprav so številni rodovi PGPMs dobro dokumentirani v kmetijstvu, so podatki o njihovih učinkih pri gozdnih sadih še vedno omejeni, največkrat na posamezne seve, povezane z rodovi *Pinus*, *Quercus*, *Abies* in *Picea*. Ta pregled povzema trenutno znanje o mehanizmi delovanja PGPMs ter predstavlja pregled izoliranih mikroorganizmov z dokazanimi rast spodbujevalnimi učinki pri različnih gozdnih drevesnih vrstah. Razširitev uporabe PGPMs v gozdarstvu bi lahko pomembno prispevala k večjemu preživetju sadik, izboljšani regeneraciji gozdov ter krepitvi odpornosti gozdnih ekosistemov v pogojih podnebnih sprememb.

**Ključne besede:** rastlinam koristni mikroorganizmi, gozdozgojba, drevesničarstvo, preživetje sadik gozdnega drevja

<sup>1</sup> Slovenian Forestry Institute, Večna pot 2, 1000 Ljubljana, tina.unuk@gozdis.si

## INTRODUCTION

Human pressure continues to damage ecosystems, as deforestation rates from 2015 to 2020 reached an estimated 10 million hectares per year, resulting in the loss of 420 million hectares of forest since 1990 due to land-use changes. These trends, coupled with global concerns over climate change and biodiversity loss, emphasize the critical role of forest restoration (STANTURF et al. 2014, STANTURF et al. 2019), which is essential to slow global warming (IPCC 2014). Restoration of forest sites relies on the successful establishment of seedlings, which has

been challenging, particularly in recent years, partly because of the inadequacy of practical methodologies and the lack of empirical evidence to support best practices (CHAZDON & GUARIGUATA 2018). Harsher microsite characteristics in face of global warming, e.g. longer drought periods or longer periods of water scarcity and osmotic stress, have a major impact on sapling survival and growth (SANCHEZ-CRUZ et al. 2020, AHANGER et al. 2012). Survival rate is a common metric of early success (LE et al. 2012) and maximising survival of planted sap-

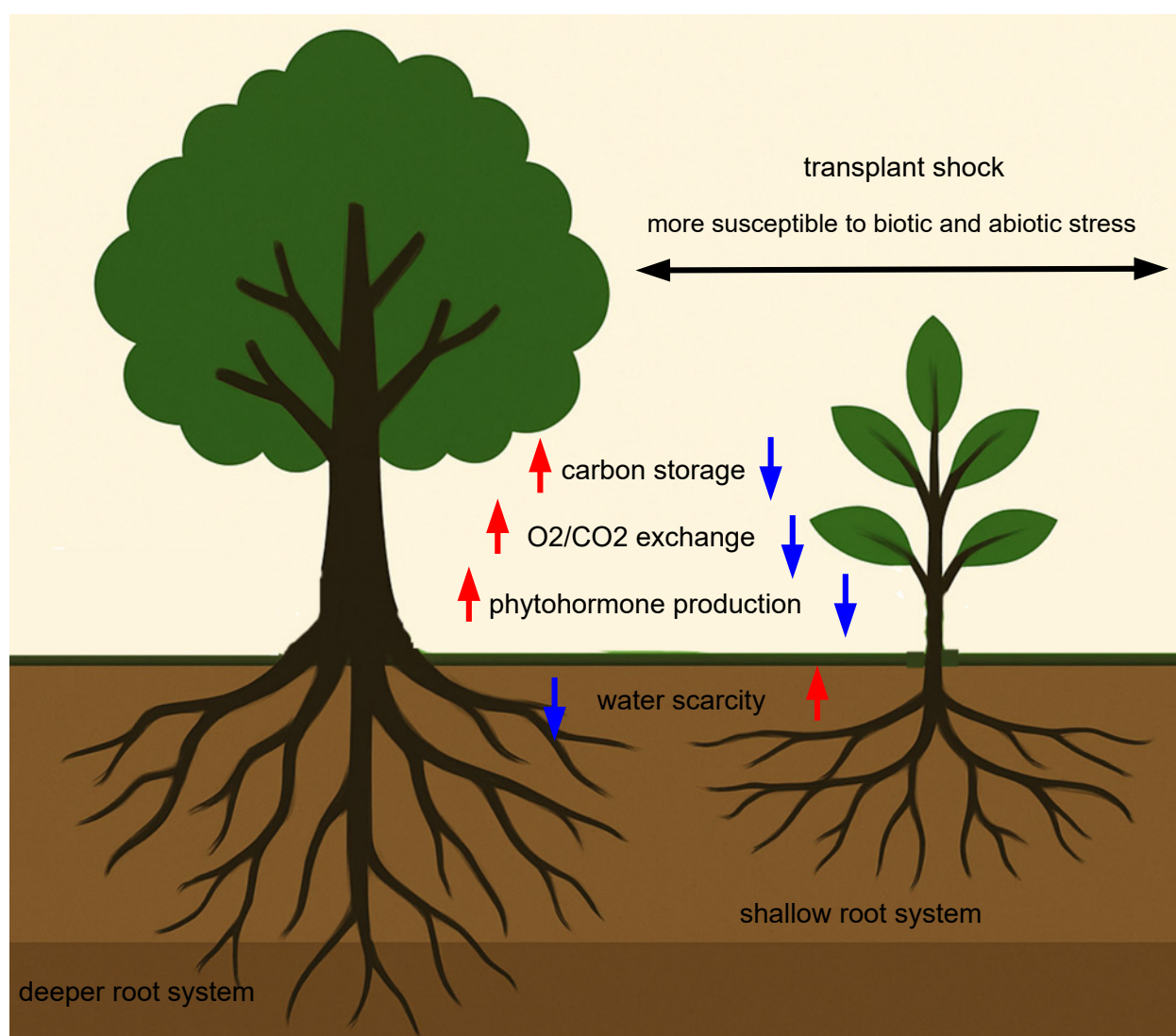


Figure 1: Adult tree versus sapling physiological characteristics, that make saplings more susceptible to different biotic and/or abiotic stressors.

Slika 1: Fiziološke značilnosti odraslega drevesa v primerjavi s sadiko, zaradi katerih so slednje občutljivejše na različne biotske in/ali abiotske stresne dejavnike.

lings is essential for the economic and environmental success of reforestation plantings. However, most reforestation studies and practices accept that a proportion of planted saplings will succumb to transplant shock (CLOSE et al. 2005). Moreover, compared to adult trees, saplings are more susceptible to biotic and abiotic stresses, especially to those related with global warming. Compared to adult trees, sapling's root system is shallow, with growth restricted to the upper soil layers, which makes them more susceptible to drainage by evapotranspiration, during dry periods, when water uptake is restricted (GOKE & MARTIN 2022; MEDIAVILLA & ESCUDERO 2003). Also, sapling's carbon reserves are insufficient to sustain physiological functions under stress periods (GOKE & MARTIN 2022). To prevent water losses, sapling stomata are closed early, which results in a lower  $O_2/CO_2$  exchange, carbon starvation (DOMINGO et al. 2023; HARTMANN et al. 2022) as well as in accumulation of harmful reactive oxygen species (FADIJI et al. 2022; ZHANG et al. 2023). Thereby, it was pointed out that already nursery stage of saplings needs critical care to ensure their long-term productivity (OU et al. 2023) (Figure 1).

One of the ways to solve the problem of obtaining high-quality forest seedlings for reforestation and to enhance plant survival during the adaptation phase, is the application of microbial technology into the tech-

nology of forest seedlings cultivation (Su et al. 2017, CASTILLO-ARGUERO et al. 2014). The application of plant growth-promoting microorganisms (PGPMs) seems to provide an easy to apply, and efficient way of alleviating biotic and abiotic stresses in plants (HANAKA et al. 2021). PGPMs is a group of free-living microorganisms in the rhizosphere soil, rhizoplane, phyllosphere or endosphere, and can promote plant growth or reduce biotic or abiotic stresses through a wide range of functional traits (FADIJI et al. 2022; CAO et al. 2023; COMPANT et al. 2010) and are at the same time ecofriendly to soil (KHATOON et al. 2022). PGPMs can be classified into bacterial and fungal types, among which bacterial PGPMs mainly include species from genera *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Actinomycetes*, *Burkholderia*, *Agrobacterium*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia* and so on (KHATOON et al. 2022). Among fungal PGPMs most common are *Trichoderma*, *Penicillium*, *Rhodotorula*, several arbuscular mycorrhizal species and etc. (HERMOSA et al. 2012; HOSSAIN et al. 2008; PATHAK et al. 2017; SILAMBARASAN et al. 2019). However, up-to date bacterial strains mechanisms have been widely studied and used, especially in agriculture, where there is still a lack of knowledge about the fungal mechanisms and their potential in plant growth promotion.

## PGPMS MECHANISMS IN PLANT GROWTH PROMOTION AND ALLEVIATING ABIOTIC/BIOTIC STRESSES

PGPMs promotes plant growth through different mode of action, which can be summarized as 1) siderophores biosynthesis, 2) providing plant by phytohormones such as 3-indole acetic acid, gibberellic acids, and cytokinins, 4) increasing the bioavailability of insoluble nutrients due to mobilization, 4) mitigation of the stress effect on plant and elevate the plant tolerance against stress conditions e.g. drought, salinity, and temperature, and secretion of 1- aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACCd) that depress the ethylene level in the plant body and 5) production of antagonistic compounds like hydrogen cyanide, and antibiotics that protect the plant against pathogens and diseases (EL-MARAGHY et al. 2021).

Siderophores produced by various microorganisms are beneficial for plants because they can increase plant growth by increasing the availability of iron in soil (SANTANA et al. 2016). In addition, siderophores can also act as biocontrol agents, as can inhibit the growth of pathogens by binding to  $Fe^{3+}$  which causes the pathogen

to lack  $Fe^{3+}$  (NIEHUS et al. 2017). Siderophores are produced from a wide range of microorganisms including bacteria and fungi and is considered as one of the major approaches of PGPMs that is implicated in the biological control of plant diseases (LI et al. 2016).

Plant physiologic functions, such as growth, differentiation, development, and stomata movement, are also regulated by phytohormones. Plants inoculation with PGPMs can also modulate plant hormone synthesis to promote plant tolerance to different stresses. PGPMs produce several external plant growth regulators such as auxin or indole-acetic acid (IAA), cytokinin (CK), ethylene (ET), abscisic acid (ABA), salicylic acid (SA), and jasmonic acid (JA) (KOTIYAL & SHARMA 2024). IAA can be produced by more than 80% of rhizosphere-associated microorganisms, including bacteria and fungi IAA is the main active natural form of auxin involved directly in plant development (AGAKE et al. 2022) and is involved in the regulation of different biological processes connected to plant

growth, including seed germination; cell division, elongation, and differentiation; gene expression; photosynthesis initiation and proliferation of lateral and adventitious roots. Plant roots excrete L-tryptophan, a major precursor for IAA (NAJAFI ZILAIE et al. 2022), which is in the rhizosphere convert to IAA, by PGPMs and is further taken up by the plants. PGPMs can also produce their own IAA, which is assimilated by plant cells and activates the auxin signal transduction pathway in plants, which stimulates plant cell proliferation (LI et al. 2020). Microorganism's IAA induce different

responses in plants depending on the physiological concentration. For example, modest levels of IAA produced by PGPMs can boost primary root elongation and plant growth, whereas high levels of exogenous IAA can inhibit primary root elongation and enhance lateral and root hair development. However, the synthesis of large amounts of IAA by PGPMs was found to impede rather than enhance root development (KOTIYAL & SHARMA 2024).

ABA is a key plant growth regulator that is involved in plant development, plant defence and abiotic stress

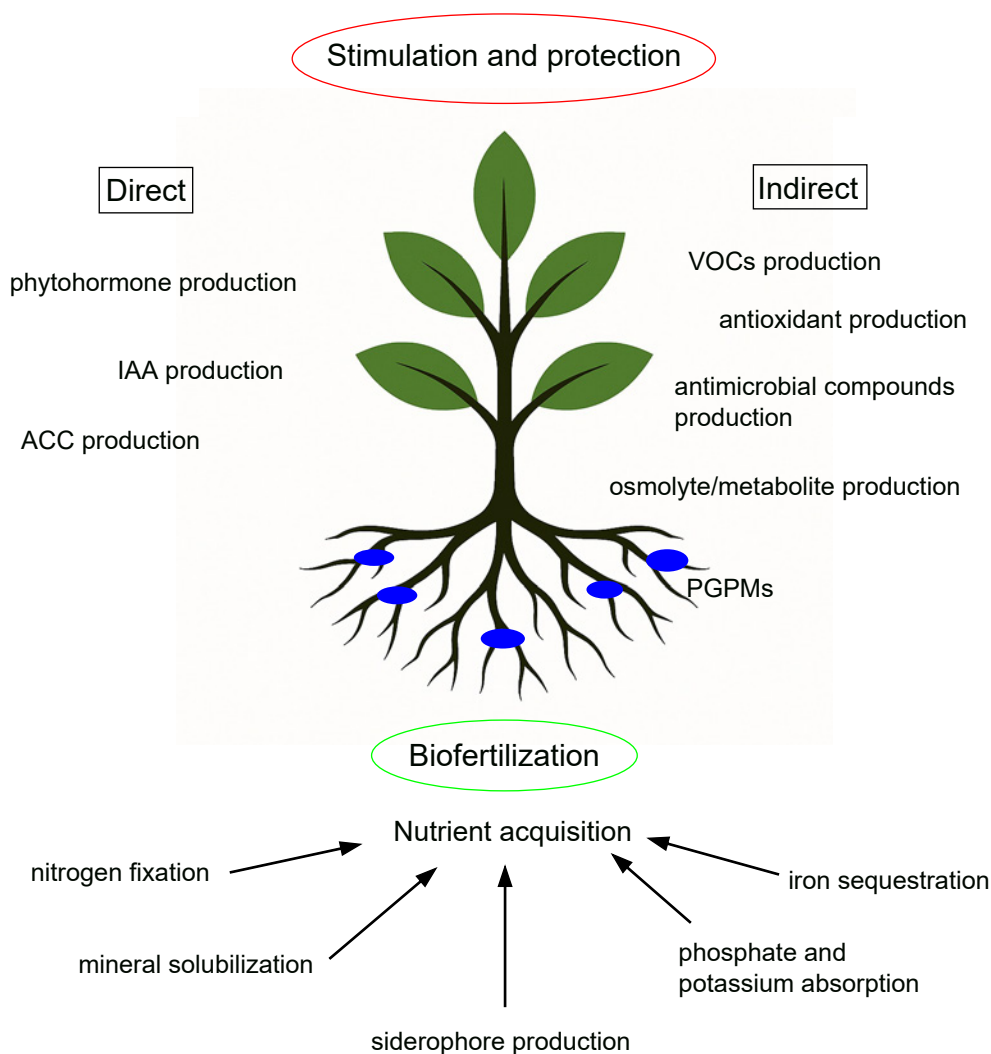


Figure 2: Various roles of beneficial microorganism in plant growth promotion. These mechanisms can be divided in two broad categories: biofertilization, and stimulation and protection, which can be further divided in direct or indirect mechanisms.

PGPMs: Plant growth promoting microorganisms.

Slika 2: Različni mehanizmi rastlinam koristnih mikroorganizmov pri spodbujanju rasti rastlin. Mehanizme lahko razdelimo v dve glavni kategoriji: biofertilizacija ter stimulacija in zaščita, ki se lahko nadalje delita na neposredne ali posredne mehanizme. PGPMs: rastlinam koristni mikroorganizmi.

responses. ABA-dependent signalling pathways are important for stress-responsive gene expression under drought, salt, and osmotic stress (CUTLER et al. 2010; LI et al. 2015). Furthermore, ABA also maintains the hydraulic conductivity of plant roots and shoots, allowing them to better uptake soil moisture and sustain cell turgor potential. Under drought stress, ABA affects different aspects of plant growth, such as inhibiting leaf surface area expansion, reducing photosynthesis, decreasing lateral root initiation, enhancing the primary root length and density, and decreasing the shoot-to-root ratio to improve the uptake of water and nutrient from soil. Several PGPMs species are known to induce drought stress tolerance through the ABA pathway, alleviating drought stress effects. Increased ABA content in inoculated plants, can reduce leaf transpiration and improved osmotic stress tolerance in the plants (BRES-SON et al. 2013).

One of the important plant hormones which is largely known for its role in systemic acquired resistance (SAR) and induced systemic resistance (ISR) is SA. It functions as signalling molecules to activate genes and secondary metabolites responsive to stress. Several SA producing beneficial microorganisms can colonize roots and cause them to be more resistant to plant pathogens and environmental stress (KOTIYAL & SHARMA 2024).

In addition to being a plant growth regulator, ET also acts as a growth inhibitor or a stress hormone under adverse conditions such as salinity, heavy metal toxicity, and drought stress. Under stress conditions, the endogenous amounts of ET are significantly increased which may reach levels that adversely limit plant development. Plants enhance the synthesis of endogenous ET in response to stress stimuli, resulting in reduced root and

shoot development, and plant growth retardation (SALEEM et al. 2007)). Some PGPMs strains have been shown to produce the enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylase (ACC) deaminase, which reduces endogenous ET levels in plants and subsequently, increase stressed plants' chances of surviving (DEL CARMEN OROZCO-MOSQUEDA et al. 2020). Thus, ACC deaminase producing PGPMs improve multiple physiological and biochemical features in plants, including root and shoot growth, mineral nutrients uptake, membrane stability, photosynthetic pigment production, rhizobial nodule formation, and mycorrhizal colonization in various crops (LI et al. 2020). Therefore, PGPMs that produce ACC deaminase are involved in the direct negative regulation of endogenous ET levels in plants and in stimulating plant growth (KOTIYAL & SHARMA 2024).

Strong evidence published in the literature suggests that the beneficial effect of some PGPMs are also mediated by the release of volatile organic compounds (VOCs) that modify plant and root growth, both directly and indirectly (POVEDA 2021). VOCs are classified into small and heavier categories. Small VOCs include ethanol, and methanol, while heavier VOCs are compounds such as terpenes, methyl jasmonate, and methyl salicylate. The emission rates of volatile compounds are generally associated with the severity of stress. Stress-induced VOCs act as priming signalling agents and have been implicated in systemic defence responses and in improving plant growth. Several PGPMs strains, including bacterial and fungal, produce distinct VOCs that have a direct effect on plant development and indirectly control interactions between plants and other microorganisms. Microbial VOCs may also promote plant tolerance to different environmental stressors, primarily biotic stressors (CHIEB & GACHOMO 2023).

## WHAT ABOUT THE USE OF PGPMs IN FORESTRY?

Our knowledge about PGPMs in forest ecosystems, particularly boreal and temperate forests, is still elementary (PURI et al. 2020). The potential of PGPMs related with forest has been less extensively studied, and the number of related PGPMs reported is also very limited. The application of PGPMs in silviculture and forest seedlings production is not a common practice (SÃO JOSÉ et al. 2019), however there is an increasing interest in the use of beneficial microorganisms as inoculants for nursery tree seedlings due to the repeated demonstrations of agricultural and horticultural plant growth stimulation by PGPMs, and the fact that inoculation of forest seedlings with PGPMs prior to outplanting is inexpensive, envi-

ronmentally friendly, and easily applied in nursery treatments. The use of PGPMs technology can produce more vigorous forest plants, and therefore, could increase seedlings survival when outplanting in fields for reforestation purposes (GARCIA et al. 2004).

Although limited, there are records of plant growth enhancement by PGPMs, mostly in commercially interesting tree genera, such as *Pinus*, *Quercus*, *Picea*, *Populus*, however up-to date mainly bacterial strains were used. Records about potential plant growth promotion by PGPMs in other, important forest tree species, such as *Fagus*, *Abies*, *Larix*, etc. are almost nil. Moreover, most of the studies focusing on microorganisms

with plant growth promotion potential in forestry, are based on research of bacteria and rhizobacteria, while the potential of fungi associated with different forest tree species from different environments is much under-explored. Despite the general known that different mycorrhizal fungi help forest tree species with improving

water and nutrient uptake, there are almost no research, where fungal strains associated with forest tree species would be tested for plant growth promotion potential *in vivo* and in greenhouses. In Table 1 records of PGPMs with confirmed plant growth promotion from different forest tree species were gathered.

Table 1: List of PGPMs strains suggested being able to promote growth, mitigate abiotic and/or biotic stresses and their mechanisms. Only PGPMs strains isolated from the forest tree species are included.

Tabela 1: Seznam sevov PGPM z domnevno sposobnostjo spodbujanja rasti ter blažitvijo abiotiskih in/ali biotskih stresnih dejavnikov ter njihovi mehanizmi delovanja. V tabelo so vključeni le tisti sevi PGPM, ki so bili izolirani iz gozdnih drevesnih vrst.

| PGP bacterial genus | Tree species   | PGPMs mechanisms                                                                                                                                              | References                                   |
|---------------------|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| <i>Enterobacter</i> | <i>Pinus</i>   | IAAs production, phosphate solubilization, bioinucikant                                                                                                       | SANCHEZ-CRUZ et al. 2020, GARCIA et al. 2004 |
|                     | <i>Quercus</i> | IAA production, iron mobilization, stem root growth promotion                                                                                                 | GARCIA et al. 2004                           |
| <i>Arthrobacter</i> | <i>Juglans</i> | Protease production, antibiotic production                                                                                                                    | GHOEBANI & HARIGHI 2017                      |
| <i>Roseomonas</i>   | <i>Juglans</i> | Antibiotic production                                                                                                                                         | GHOEBANI & HARIGHI 2017                      |
| <i>Streptomyces</i> | <i>Juglans</i> | Nitrogen fixation activity, lipase production, antibiotic production                                                                                          | GHOEBANI & HARIGHI 2017                      |
|                     | <i>Pinus</i>   | IAA production, siderophore production, phosphate solubilization, chitinase activity                                                                          | FLORES-NUNEZ et al., 2018                    |
| <i>Pseudomonas</i>  | <i>Juglans</i> | Phosphate solubilization, nitrogen fixation activity, protease production, hydrogen cyanide production, lipase production, antibiotic production              | GHOEBANI & HARIGHI 2017                      |
|                     | <i>Pinus</i>   | IAA production, siderophore production, phosphate solubilization,                                                                                             | SONG et al., 2021                            |
|                     |                | IAA production, iron mobilization, stem root growth promotion                                                                                                 | GARCIA et al. 2004                           |
|                     |                | IAA production, Root and shoot growth promotion,                                                                                                              | NAZAROV et al. 2023                          |
|                     |                | IAA and siderophore production, phosphate solubilization                                                                                                      | FLORES-NUNEZ et al., 2018                    |
|                     | <i>Quercus</i> | IAA production, iron mobilization, stem root growth promotion                                                                                                 | GARCIA et al. 2004                           |
|                     |                | Siderophore production, phosphate solubilizing, hydrogen cyanide production                                                                                   | REIS et al. 2021                             |
|                     |                | IAA production, GA production, phosphate solubilization, siderophore production, protease production, hydrogen cyanide production, nitrogen fixation activity | TASHI-OSHONEI et al. 2017                    |
|                     |                | Increased proline content, improved photosynthetic leaf content under stress                                                                                  | HEYDARI et al. 2023                          |
|                     | <i>Populus</i> | IAA production, root and shoot growth promotion,                                                                                                              | NAZAROV et al. 2023                          |
|                     | <i>Picea</i>   | ACC production, siderophore production, phosphate solubilization, IAA production                                                                              | MAGOSH et al. 2025                           |

| PGP bacterial genus     | Tree species   | PGPMs mechanisms                                                                                                                                             | References                   |
|-------------------------|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
|                         |                | Phosphate solubilization, phytate hydrolization, IAA production, ACC activity, cellulase activity, chitinase activity, glucanase activity, protease activity | PURI et al. 2020             |
| <i>Bacillus</i>         | <i>Juglans</i> | Siderophore production, nitrogen fixation activity, protease production, lipase production, antibiotic production                                            | GHOEBANI & HARIGHI 2017      |
|                         | <i>Abies</i>   | IAA production, seed germination promotion, antioxidative enzyme activity level promotion                                                                    | GARCIA-LEMONS et al. 2020    |
|                         | <i>Pinus</i>   | IAA production, seed germination promotion, stem and root growth promotion                                                                                   | MORENO-VALENCIA et al., 2024 |
|                         |                | IAA production, siderophore production, phosphate solubilization, chitinase activity                                                                         | FLORES-NUNEZ et al., 2018    |
|                         | <i>Quercus</i> | Siderophore production, phosphate solubilizing, hydrogen cyanide production, antifungal activity                                                             | REIS et al. 2021             |
|                         |                | IAA production, GA production, siderophore production, phosphate solubilization, protease production, protease production                                    | TASHI-OSHONEI et al. 2017    |
|                         | <i>Picea</i>   | ACC production, siderophore production, phosphate solubilization, IAA production, N fixation activity                                                        | MAGOSH et al. 2025           |
| <i>Paenibacillus</i>    | <i>Abies</i>   | IAA production, seed germination promotion, root growth promotion, antioxidative enzyme activity level promotion                                             | GARCIA-LEMONS et al. 2020    |
|                         | <i>Pinus</i>   | IAA production, phosphate solubilization, chitinase activity                                                                                                 | FLORES-NUNEZ et al., 2018    |
| <i>Viridibacillus</i>   | <i>Pinus</i>   | IAA and siderophore production                                                                                                                               | FLORES-NUNEZ et al., 2018    |
| <i>Serratia</i>         | <i>Pinus</i>   | IAA production, siderophore production, phosphate solubilization                                                                                             | SONG et al. 2021             |
|                         |                | IAA production, siderophore production, phosphate solubilization, ACC production, seed germination promotion, stem and root growth promotion                 | MORENO-VALENCIA et al. 2024  |
|                         | <i>Quercus</i> | Siderophore production, phosphate solubilizing, hydrogen cyanide production, antifungal activity                                                             | REIS et al. 2021             |
| <i>Chryseobacterium</i> | <i>Pinus</i>   | IAA production, stem root growth promotion                                                                                                                   | LUCAS-GARCIA et al. 2004     |
|                         | <i>Quercus</i> | IAA production, stem root growth promotion                                                                                                                   | LUCAS-GARCIA et al. 2004     |
| <i>Klebsiella</i>       | <i>Quercus</i> | Siderophore production, phosphate solubilizing, hydrogen cyanide production, antifungal activity                                                             | REIS et al. 2021             |
| <i>Cedecea</i>          | <i>Quercus</i> | Siderophore production, phosphate solubilizing, hydrogen cyanide production, antifungal activity                                                             | REIS et al. 2021             |
| <i>Rouxiiella</i>       | <i>Quercus</i> | Siderophore production, phosphate solubilizing, hydrogen cyanide production, antifungal activity                                                             | REIS et al. 2021             |

| PGP bacterial genus     | Tree species   | PGPMs mechanisms                                                                                                                          | References                |
|-------------------------|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| <i>Ewingella</i>        | <i>Quercus</i> | Siderophore production, phosphate solubilizing, hydrogen cyanide production                                                               | REIS et al. 2021          |
| <i>Stenotrophomonas</i> | <i>Quercus</i> | IAA production, GA production, phosphate solubilization, protease production, hydrogen cyanide production                                 | TASHI-OSHONEI et al. 2017 |
| <i>Paraburkholderia</i> | <i>Picea</i>   | ACC production, siderophore production, phosphate solubilization, IAA production                                                          | MAGOSH et al. 2025        |
| <i>Rhizobium</i>        | <i>Picea</i>   | ACC production, siderophore production, phosphate solubilization, IAA production                                                          | MAGOSH et al. 2025        |
| <i>Caballeronia</i>     | <i>Picea</i>   | ACC production, siderophore production, phosphate solubilization, IAA production, N fixation activity                                     | MAGOSH et al. 2025        |
| <i>Paraburkholderia</i> | <i>Picea</i>   | ACC production, siderophore production, phosphate solubilization, IAA production, N fixation activity                                     | MAGOSH et al. 2025        |
| <i>Collimonas</i>       | <i>Picea</i>   | ACC production, siderophore production, phosphate solubilization, IAA production                                                          | MAGOSH et al. 2025        |
| <i>Streptomyces</i>     | <i>Picea</i>   | ACC production, siderophore production, phosphate solubilization, IAA production, N fixation activity                                     | MAGOSH et al. 2025        |
|                         | <i>Populus</i> | IAA production                                                                                                                            | TIAN et al. 2019          |
| <i>Rhodococcus</i>      | <i>Picea</i>   | ACC production, siderophore production, phosphate solubilization, IAA production, N fixation activity                                     | MAGOSH et al. 2025        |
| <i>Sporosarcina</i>     | <i>Picea</i>   | IAA production                                                                                                                            | MAGOSH et al. 2025        |
| <i>Lysinibacillus</i>   | <i>Picea</i>   | Siderophore production, IAA production                                                                                                    | MAGOSH et al. 2025        |
| <i>Psychrobacillus</i>  | <i>Picea</i>   | Siderophore production, IAA production                                                                                                    | MAGOSH et al. 2025        |
| <i>Herbaspirillum</i>   | <i>Picea</i>   | ACC production, siderophore production, IAA production                                                                                    | MAGOSH et al. 2025        |
| <i>Herbicomix</i>       | <i>Picea</i>   | IAA production, ACC activity, cellulase activity, chitinase activity, glucanase activity                                                  | PURI et al. 2020          |
| <i>Pigmentiphaga</i>    | <i>Picea</i>   | IAA production, ACC activity, cellulase activity, chitinase activity, glucanase activity                                                  | PURI et al. 2020          |
| <i>Chitinophaga</i>     | <i>Pinus</i>   | IAA production, phosphate solubilization, chitinase activity                                                                              | FLORES-NUNEZ et al., 2018 |
| <i>Caballeronia</i>     | <i>Picea</i>   | Phosphate solubilization, phytate hydrolyzation, IAA production, ACC activity, cellulase activity, chitinase activity, glucanase activity | PURI et al. 2020          |
| PGP fungal genus        | Tree species   | PGP mechanisms                                                                                                                            | References                |
| <i>Umbelopsis</i>       | <i>Picea</i>   | Phosphate solubilization, IAA production                                                                                                  | MAGOSH et al. 2025        |
| <i>Tolypocladium</i>    | <i>Picea</i>   | Phosphate solubilization, IAA production                                                                                                  | MAGOSH et al. 2025        |
| <i>Lycoperdon</i>       | <i>Picea</i>   | IAA production                                                                                                                            | MAGOSH et al. 2025        |

| PGP fungal genus      | Tree species   | PGP mechanisms                                         | References            |
|-----------------------|----------------|--------------------------------------------------------|-----------------------|
| <i>Gymnopus</i>       | <i>Picea</i>   | IAA production                                         | MAGOSH et al. 2025    |
| <i>Podila</i>         | <i>Picea</i>   | Phosphate solubilization, IAA production               | MAGOSH et al. 2025    |
| <i>Mortierella</i>    | <i>Picea</i>   | Phosphate solubilization, IAA production               | MAGOSH et al. 2025    |
|                       | <i>Populus</i> | GA production                                          | LIAO et al. 2019      |
| <i>Methylorubrum</i>  | <i>Pinus</i>   | Auxin and ethylene production                          | KOSKIMÄKI et al. 2022 |
| <i>Pisolithus</i>     | <i>Pinus</i>   | IBA and IAA production                                 | NIEMI et al. 2002     |
| <i>Trichoderma</i>    | <i>Pinus</i>   | Organic acids and siderophore production               | BABU et al. 2014      |
| <i>Centraalbureau</i> | <i>Picea</i>   | Polyketide metabolites – biocontrol against herbivores | SUMARAH et al. 2008   |

For improving forest tree seedlings survival after outplanting it is crucial to gain additional knowledge about plant growth promoting potential of different microorganisms, not only from different forest tree species, but also from different environment. It is worth noticing that specific bacterial and fungal strains may promote growth only in certain tree species; even trees of the same species, but from different altitudes or regions, present differential responses to bacterial and fungal inoculation (LUCY et al. 2004). Therefore, it would also be important to isolate PGPMs

native strains from the specific plant rhizosphere to develop efficient biofertilizers to use in forestry. Inoculation of exogenous microorganisms not only influence the microbiome structures of rhizosphere soil of plants, but recruits many taxa attributed to plant developments (HAO et al. 2021). However, the interspecific interactions within the rhizosphere fungal microbiome are complex, and the synergistic relationships between PGPMs and “probiotic taxa” that drive rhizosphere reassembly and plant interactions remain poorly understood.

## FUTURE CHALLENGES IN THE USE OF PGPMs IN FORESTRY

The use of PGPMs as inoculants is centuries old, and their use have been largely focussed in agriculture (SESSITSCH & MITTER 2015). Development of new PGPMs inocula is based on a laboratory screening assays that rely on specific plant growth-promoting mechanisms, such as nitrogen fixation, ACC deaminase activity, auxin synthesis, calcium phosphate solubilization, etc. Currently efforts are more focused on the rhizomicrobiome as it has the greatest microbial diversity (SUBRAMANIAN et al. 2016a, b). However, screening of pure culture isolates for those with plant growth promoting functions does not always result in isolates that promote plant growth under field conditions. At the same time, those which have minimal *in vitro* growth promoting functions may have alternate mechanisms to promote plant growth (SESSITSCH & MITTER 2015).

Thereby plant growth experimentations should be combined with *in vitro* screening of promising isolates, with greenhouse experiments, which should be conducted under both optimal and stressful plant-growth conditions.

It is worth noticing, that microbial isolates from stress-prone habitats are more effective than those from stress-free environments in developing plant tolerance to abiotic stresses such as drought, salt, and heavy metals (GARCIA et al. 2024, LUCY et al. 2004). This is particularly relevant in the context of sustainable environmental practices. Moreover, growth promoting effects are also highly variable depending on host plant genotype and selected microbial species or strain and can change with environmental conditions or plant development. It is necessary for researchers to carefully evaluate

the stress-adaptive characteristics of PGPMs before utilizing them in fields subjected to biotic or abiotic challenges. The kind of soil and the particular strains employed affect how effective PGPMs-mediated stress tolerance is (KOTIYAL & SHARMA 2024).

For efficient inoculation, colonisation and, consequently efficient performance of PGPMs under field condition, the appropriate strategy is of key importance. PGPMs are often used to inoculate plant material without an appropriate carrier or in quantities that do not allow for efficient rhizosphere colonization under field conditions, due to competition with resident soil micro- and macro-fauna (DANGI et al. 2017). It is necessary to develop strategies, which would allow PGPMs to gain advantage in colonization efficiency over other microorganisms, to elicit their positive effects on plant growth and development.

There is still a lack of knowledge of potential emergent properties of the microbial consortium effects on plant growth, as previous investigations mainly focused on traits of single strain (EJAZ et al. 2020; SIVASAKTHI et al. 2014; TIAN et al. 2023). Microorganisms rather function as communities, as in forest soils, bacterial and fungal strains interact symbiotically to enhance plant

growth by improving nutrient acquisition and stress tolerance. Mycorrhizal fungi extend the root system's absorptive capacity, facilitating the uptake of phosphorus, nitrogen, and micronutrients, while associated bacteria mobilize nutrients through mineralization and nitrogen fixation. These microbes also produce growth-promoting compounds and suppress soil-borne pathogens, creating a favorable rhizosphere environment. Such synergistic interactions increase plant vigor, resilience to environmental stress, and ultimately contribute to forest productivity and regeneration (SMITH & READ 2008; VAN DER HEIJDEN et al. 2008). However, most studies focusing on plant growth promoting properties of microorganisms have mainly used single or mixed bacterial strains, while there are only a few reports on the promotion of plant growth by a mixed consortium of bacterial and fungal strains.

To expand our knowledge in this sector, more investigation is required, especially fieldwork involving individual strains and a consortium of microorganisms with plant growth promoting ability, as it's possible that functional capacity of the microorganism's community or consortia is far beyond the sum of each individual due to beneficial interactions with each other.

## CONCLUSIONS

The successful establishment of seedlings is a critical prerequisite for effective forest restoration, yet it remains strongly constrained by abiotic and biotic stresses intensified under global change. Plant growth-promoting microorganisms (PGPMs) represent a promising, sustainable strategy to enhance seedling survival, growth, and resilience, though their application in for-

estry is still limited. Current knowledge is largely restricted to bacterial strains, while the functional roles of fungal taxa and microbial consortia remain underexplored. Future research integrating strain selection, host specificity, and field-based validation is essential to advance PGPMs as reliable tools in silviculture and large-scale reforestation.

## POVZETEK

Hitre spremembe rabe tal in naraščajoče klimatske spremembe, večajo pritisk na naravne ekosisteme in z tem povzročajo obsežno degradacijo gozdov. Med letoma 2015 in 2020 je bila povprečna stopnja krčenja gozdov ocenjena na 10 milijonov hektarjev letno, skupno pa je bilo od leta 1990 izgubljenih že več kot 420 milijonov hektarjev gozdnih površin. V luči podnebnih sprememb in upada biotske raznovrstnosti obnova gozdov postaja ključen ukrep za ublažitev globalnega segrevanja. Uspeh reforestacijskih prizadevanj je neposredno povezan z uspešno vzgojo in preživetjem sadik, kar pa je pogosto omejeno zaradi neustreznih metodologij ter povečane

izpostavljenosti stresnim abiotskim dejavnikom, kot so dolgotrajne suše, vodni deficit in osmotski stres. V primerjavi z odraslimi drevesi so sadike fiziološko ranljivejšje zaradi plitvega koreninskega sistema, omejenih ogljikovih rezerv in hitrega zapiranja listnih rež, kar vodi v ogljično stradanje in oksidativni stres. Zato je že faza pridelave v drevesnicah kritična za dolgoročno uspešnost.

Ena izmed obetavnih strategij za povečanje kakovosti sadik je uporaba rastlinam koristnih mikroorganizmov (PGPMs). Ti vključujejo širok spekter bakterij in gliv, ki izboljšujejo rast ter zmanjšujejo vpliv abiotskih

in biotskih stresorjev. Med bakterijskimi rodovi so najpogostejše zastopani *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Rhizobium* in *Actinomycetes*, med glivnimi pa *Trichoderma*, *Penicillium* in arbuskularne ter ektomikorize. Bakterijski in glivni mehanizmi so predvsem v kmetijstvu že dobro raziskani in uveljavljeni, medtem ko omenjeni mehanizmi ostajajo v kontekstu gozdarstva bistveno manj poznani.

PGPMs pospešujejo rast preko več mehanizmov: (I) biosinteze sideroforov, ki povečujejo dostopnost železa in omejujejo rast patogenov; (II) sinteze fitohormonov, ki modirajo razvoj in odzivnost rastlin; (III) izločanja ACC deaminaze, ki znižuje ravni stresnega etilena; (iv) tvorbe antagonističnih metabolitov (antibiotiki, HCN) ter (v) sproščanja hlapnih organskih spojin (VOCs), ki delujejo kot signalne molekule in modulatorji rasti. Posebno pomembna je sposobnost PGPMs, da uravnavajo hormonsko ravnovesje rastlin, kar se odraža v povečani odpornosti proti suši in boleznim ter v izboljšani presnovni učinkovitosti.

Uporaba PGPMs v drevesnicah je enostavna, stroškovno učinkovita in okolju prijazna metoda, ki lahko znatno izboljša vitalnost sadik in poveča njihovo preži-

vetje na terenu. Kljub temu so obstoječe študije v gozdarstvu omejene predvsem na komercialno zanimive rodove (*Pinus*, *Quercus*, *Picea*, *Populus*), medtem ko so raziskave o drugih pomembnih vrstah, kot so *Fagus*, *Abies* in *Larix*, redke. Prav tako je potencial glivnih sevov v primerjavi z bakterijskimi v veliki meri neizkoriščen.

Prihodnji razvoj uporabe PGPMs v gozdarstvu zahteva: (1) izolacijo bakterijskih kot tudi glivnih sevov iz različnih habitatov in drevesnih vrst, (2) optimizacijo metod inokulacije, ki bodo omogočala uspešno kolonizacijo mikrobnih sevov, (3) dodatne raziskave o sinergijskih učinkih mikrobnih konzorcijev, kjer je funkcionalna kapaciteta skupnosti lahko večja od seštevka posameznih sevov; ter (4) validacijo rezultatov iz laboratorija in rastlinjakov ter prenos znanj v realne terenske pogoje.

Sklepno je mogoče poudariti, da imajo PGPMs velik potencial za izboljšanje uspešnosti sadnje, saj bi njihova uporaba lahko povečala odpornost sadik na stresne razmere, izboljšala njihovo preživetje po sajenju ter s tem pomembno prispevala k trajnostnemu gospodarjenju z gozdovi in blaženju posledic podnebnih sprememb.

## ZAHVALE

Raziskava je bila financirana v okviru raziskovalnega programa P4-0107 Gozdna biologija, ekologija in tehnologija (ARIS) in ciljnega razvojnega projekta V4-2222

Ukrepi za ohranjanje biotske raznovrstnosti v gozdnih ekosistemih (ARIS in MKGP) ter Javne gozdarske službe JGS /GIS (MKGP).

## REFERENCES

- AGAKE S I, DO AMARAL F P, YAMADA T, SEKIMOTO H, STACEY G, YOKOYAMA T & N OHKAMA-OHTSU 2022: Plant growth-promoting effects of viable and dead spores of *Bacillus pumilus* TUAT1 on *Setaria viridis*. *Microbes and environments* 37: <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME21060>
- AHANGAR A, DAR G H, HASSAN A A, & Z BHAT 2012: Growth response and nutrient uptake of blue pine (*Pinus wallichiana*) seedlings inoculated with rhizosphere microorganisms under temperate nursery conditions. *Ann For Res* 55: <https://doi.org/10.15287/afr.2012.62>
- BABU A G, SHEA P J, & B T OH 2014: *Trichoderma* sp. PDR1-7 promotes *Pinus sylvestris* reforestation of lead-contaminated mine tailing sites. *Sci Total Environ* 476: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.119>
- BRESSON J, VAROQUAUX F, BONTPART T, TOURAINE B & D VILE 2013: The PGPR. Strain *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 induces a reproductive delay and physiological changes that result in improved drought tolerance in *Arabidopsis*. *New Phytol* 200: 10.1111/nph.12383
- CAO M, NARAYANAN M, SHI X, CHEN X, LI Z & Y MA 2023: Optimistic contributions of plant growth-promoting bacteria for sustainable agriculture and climate stress alleviation. *Environ Res* 217: 10.1016/j.envres.2022.114924.
- CASTILLO-ARGÜERO S, MARTÍNEZ-OREA Y & BARAJAS-GUZMÁN 2014: Establecimiento de tres especies arbóreas en la cuenca del río Magdalena, México. *Bot Sci* 92: 10.17129/botsci.100
- CHAZDON R L & M R GUARIGUATA 2018: Decision support tools for forest landscape restoration: Current status and future outlook. CIFOR

- CLOSE D C, BEADLE C L & P H BROWN 2005: The physiological basis of containerised tree seedling 'transplant shock': a review. *Aust For* 68: <https://doi.org/10.1080/00049158.2005.10674954>
- COMPANT S, CLÉMENT C & A SESSITSCH 2010: Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol and Biochem* 42: 10.1016/j.soilbio.2009.11.024
- CUTLER S R, RODRIGUEZ P L, FINKELSTEIN R R & S R ABRAMS 2010: Absciscic acid: emergence of a core signaling network. *Annu Rev Plant Biol* 61: <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112122>
- DANGI S R, TIRADO-CORBALÁ R, GERIK J & B D HANSON: 2017: Effect of long-term continuous fumigation on soil microbial communities. *Agronomy* 7: <https://doi.org/10.3390/agronomy7020037>.
- DEL CARMEN OROZCO-MOSQUEDA M, GLICK B R & G SANTOYO 2020: ACC deaminase in plant growth-promoting bacteria (PGPB): An efficient mechanism to counter salt stress in crops. *Microbiol Res* 235: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126439>
- DOMINGO G, VANNINI C, MARSONI M, COSTANTINI E, BRACALE M & A DI IORIO 2023: A multifaceted approach to reveal the very-fine root's response of *Fagus sylvatica* seedlings to different drought intensities. *Physiol Plant* 175: 10.1111/pp.13934.
- EJAZ S, BATOOL S, ANJUM M A, NAZ S, QAYYUM M F, NAQQASH T, ... & S ALI 2020: Effects of inoculation of root-associative *Azospirillum* and *Agrobacterium* strains on growth, yield and quality of pea (*Pisum sativum* L.) grown under different nitrogen and phosphorus regimes. *Sci Hortic*, 270: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109401>
- EL-MARAGHY S S, TOHAMY A T & K A HUSSEIN 2021: Plant protection properties of the Plant Growth-Promoting Fungi (PGPF): Mechanisms and potentiality. *Curr Res Environ Appl Mycol* 11: 10.5943/cream/11/1/29
- FADIJI A E, SANTOYO G, YADAV A N, BABALOLA & O OLUBUKOLA 2022: Efforts towards overcoming drought stress in crops: Revisiting the mechanisms employed by plant growth-promoting bacteria. *Front Microbiol* 13: 10.3389/fmicb.2022.962427
- FLORES-NUNEZ V M, AMORA-LAZCANO E, RODRÍGUEZ-DORANTES A, CRUZ-MAYA J A & J JAN-ROBLERO 2018: Comparison of plant growth-promoting rhizobacteria in a pine forest soil and an agricultural soil. *Soil Res* 56: 10.1071/SR17227
- GARCÍA J A L, DOMENECH J, SANTAMARÍA C, CAMACHO M, DAZA A, & F. J. G. MAÑERO 2004: Growth of forest plants (pine and holm-oak) inoculated with rhizobacteria: relationship with microbial community structure and biological activity of its rhizosphere. *Environ and Exper Bot* 52: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2004.02.003>
- GARCIA-LEMONS A M, GOBBI A, NICOLAISEN M H, HANSEN L H, ROITSCH T, VEIERSKOV B & O NYBROE 2020: Under the christmas tree: Belowground bacterial associations with *Abies Nordmanniana* across production systems and plant development. *Front in Microbiol* 11, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00198>
- GHOORBANI S & B HARIGHI 2018: Characterization of endophytic bacteria with plant growth promotion and biological control potential isolated from walnut trees. *For Pathol*, 48: <https://doi.org/10.1111/efp.12403>
- GOKE A & P H MARTIN 2022: Poor acclimation to experimental field drought in subalpine forest tree seedlings. *AoB PLANTS* 14: 10.1093/aobpla/plab077
- HANAKA A, OZIMEK E, RESZCZYŃSKA E, JAROSZUK-ŚCISEŁ J & M STOLARZ 2021: Plant tolerance to drought stress in the presence of supporting bacteria and fungi: An efficient strategy in horticulture. *Horticulturae*, 7: <https://doi.org/10.3390/horticulturae7100390>
- HAO L, ZHANG Z, HAO B, DIAO F, ZHANG J, BAO Z & W GUO 2021: Arbuscular mycorrhizal fungi alter microbiome structure of rhizosphere soil to enhance maize tolerance to La. *Ecotoxicol Environ Saf* 212: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.111996>
- HARTMANN H, BASTOS A, DAS J A, ESQUIVEL-MUELBERT A, HAMMOND W M, MARTINEZ-VILILTA J, MCDOWEL N G, POWERS J S, PUGH T A M, RUTHROF K X & C D ALLEN 2022: Climate Change Risks to Global Forest Health: Emergence of Unexpected Events of Elevated Tree Mortality Worldwide. *Ann Rev of Plant Biol* 73: 10.1146/annurev-arplant-102820-012804.
- HERMOSA R, VITERBO A, CHET I & E MONTE E 2012: Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology* 158: 10.1099/mic.0.052274-0
- HEYDARI M, HAJINIA S, JAFARIAN N, KARAMIAN M, MOSA Z, ASGHARZADEH S, REZAEI N, GUIDI L, VALKÓ O & B PRÉVOSTO 2023: Synergistic use of biochar and the plant growth-promoting rhizobacteria in mitigating drought stress on oak (*Quercus brantii* Lindl.) seedlings. *For Ecol and Man* 531: <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2023.120793>

- HOSSAIN M M, SULTANA F, KUBOTA M & M HYAKUMACHI 2008: Differential inducible defense mechanisms against bacterial speck pathogen in *Arabidopsis thaliana* by plant-growth-promoting-fungus *Penicillium* sp. GP16-2 and its cell free filtrate. *Plant and Soil*, 304: 10.1007/s11104-008-9542-3
- IPCC, 2014: Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Core Writing Team: Pachauri R.K., Meyer L.A. (eds.). Geneva
- KHATOON Z, HUANG S, FAROOQ M A, SANTOYO G, RAFIQUE M, JAVED S & B GUL 2022: Role of plant growth-promoting bacteria (PGPB) in abiotic stress management. *Mitigation of Plant Abiotic Stress by Microorganisms*: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90568-8.00012-2>
- KOSKIMÄKI J J, POHJANEN J, KVIST J, FESTER T, HÄRTIG C, PODOLICH O, EDESI J, HÄGGMAN H & A M PIRTILÄ 2022: The meristem-associated endosymbiont *Methylobacterium extorquens* DSM13060 reprograms development and stress responses of pine seedlings. *Tree Physiol* 42: 10.1093/treephys/tpab102
- KOTIYAL P B & S K SHARMA 2024: Alleviating abiotic and abiotic stress, enhancing soil fertility, and growth of forest tree species PGPR: A Review. *Asian J Biol* 20: 10.9734/ajob/2024/v20i7419
- LE H D, SMITH C, HERBOHN J & S HARRISON 2012: More than just trees: Assessing reforestation success in tropical developing countries. *J Rural Stud* 28: <https://doi.org/10.1016/j.jrurstud.2011.07.006>
- LI Y, WANG Z, LIU X, SONG Z, LI R, SAHO C & Y YIN 2016: Siderophore Biosynthesis but Not Reductive Iron Assimilation Is Essential for the Dimorphic Fungus *Nomuraea rileyi* Conidiation, Dimorphism Transition, Resistance to Oxidative Stress, Pigmented Microsclerotium Formation, and Virulence. *Front Microbiol* 7: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00931>
- LI Z, ZHOU H, PENG Y, ZHANG X, MA X, HUANG L & Y YAN 2015: Exogenously applied spermidine improves drought tolerance in creeping bentgrass associated with changes in antioxidant defense, endogenous polyamines and phytohormones. *Plant Growth Regul* 76: 10.1007/s10725-014-9978-9
- LIAO H L, BONITO G, ROJAS J A, HAMEED K, WU S, SCHADT C W, LABBE J, TUSKAN G A, MARTIN F, GRIGORIEV I V & R VILGALYS 2019: Fungal endophytes of *Populus trichocarpa* alter host phenotype, gene expression, and rhizobiome composition. *MPI* 32: <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-18-0133-R>
- LUCY M, REED E & B R GLICK 2004: Applications of free-living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 86: 0.1023/B:ANTO.0000024903.10757.6e
- MAGOSCH S, BARRERA C, BÖLZ A, PRITSCH K, ROTHBALLER M & J P BENZ 2025: Improving Seedling Survival for Forest Restorations: A Novel Screening Method to Identify Microbial Allies Against Drought Stress. *bioRxiv*, 2025-04: <https://doi.org/10.1101/2025.04.24.650507>
- MEDIAVILLA S & A ESCUDERO 2003: Stomatal responses to drought at a Mediterranean site: a comparative study of co-occurring woody species differing in leaf longevity. *Tree PHYSIOL* 23: 10.1093/treephys/23.14.987
- MORENO-VALENCIA F D, PLASCENCIA-ESPINOSA M Á, MORALES-GARCÍA Y E & J MUÑOZ-ROJAS 2024: Selection and Effect of Plant Growth-Promoting Bacteria on Pine Seedlings (*Pinus montezumae* and *Pinus patula*). *Life*, 14: <https://doi.org/10.3390/life14101320>
- NADELL C D, DRESCHER K & K R FOSTER 2016: Spatial structure, cooperation and competition in biofilms. *Nat Rev Microbiol* 14: <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.84>
- NAJAFI ZILAIE M, MOSLEH ARANI A, ETESAMI H & M DINARVAND 2022: Improved salinity and dust stress tolerance in the desert halophyte *Haloxylon aphyllum* by halotolerant plant growth-promoting rhizobacteria. *Front Plant Sci* 13: <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.948260>
- NAZAROV A, CHETVERIKOV S, CHETVERIKOVA D, TUKTAROVA I, IVANOV R, URAZGILDIN R, GARANKOV I & G KUDYAROVA 2023: Microbial preparations combined with humic substances improve the quality of tree planting material needed for reforestation to increase carbon sequestration. *Sustainability* 15: <https://doi.org/10.3390/su15097709>
- NIEHUS R, PICOT A, OLIVEIRA N M, MITRI S & K R FOSTER 2017: The evolution of siderophore production as a competitive trait. *Evolution*, 71: 10.1111/evo.13230
- NIEMI K, VUORINEN T & A ERNSTSEN 2002: Ectomycorrhizal fungi and exogenous auxins influence root and mycorrhiza formation of Scots pine hypocotyl cuttings in vitro. *Tree Physiol* 22: 10.1093/treephys/22.17.1231
- OU T, ZHANG M, GAO H, WANG F, XU W, LIU X., WANG L, WANG R & J XIE 2023: Study on the potential for stimulating mulberry growth and drought tolerance of plant growth-promoting fungi. *Int J Mol Sci* 24: <https://doi.org/10.3390/ijms24044090>

- PATHAK D, LONE R & K K KOUL 2017: Arbuscular Mycorrhizal fungi (AMF) and plant growth-promoting Rhizobacteria (PGPR) Association in Potato (*Solanum tuberosum* L.: A brief Review. *Probiotics and plant health*: 10.1007/978-981-10-3473-2\_18
- POVEDA J, 2021: Beneficial effects of microbial volatile organic compounds (MVOCs) in plants. *Appl Soil Ecol* 168: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104118>
- PURI A, PADDA K P & C P CHANWAY 2020: In vitro and in vivo analyses of plant-growth-promoting potential of bacteria naturally associated with spruce trees growing on nutrient-poor soils. *Appl Soil Ecol* 149: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103538>
- REIS F, PEREIRA A J, TAVARES R M, BAPTISTA P & T LINO-NETO 2021: Cork oak forests soil bacteria: potential for sustainable agroforest production. *Microorganisms* 9: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091973>
- SALEEM M, ARSHAD M, HUSSAIN S & A S BHATTI 2007: Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *J Ind Microbiol Biotechnol* 34: 10.1007/s10295-007-0240-6
- SÁNCHEZ-CRUZ N D, MEZA-CONTRERAS J C, ESCALANTE F M, MACÍAS-RODRÍGUEZ M E, SALCEDO-PEREZ E & Y GONZÁLEZ-GARCÍA 2020: Phosphate solubilization and indole-like compounds production by bacteria isolated from forest soil with plant growth promoting activity on pine seedlings. *Geomicrobiology* 37: 10.1080/01490451.2020.1797945
- SANTANA E B, MARQUES E L S & J C T DIAS 2016: Effects of phosphate-solubilizing bacteria, native microorganisms, and rock dust on *Jatropha curcas* L. growth. *Genet Mol Res* 15: 10.4238/gmr.15048729
- SÃO JOSÉ J F B, VOLPIANO C G, VARGAS L K, HERNANDES M A S, LISBOA B B, SCHLINDWEIN G, BENEDUZI A, LONGONI L S & J A T SAMPAIO 2019: Influence of hot water on breaking dormancy, incubation temperature and rhizobial inoculation on germination of *Acacia mearnsii* seeds. *Aust. For.* 82: 10.1080/00049158.2019.1636350
- SESSITSCH A & B MITTER 2015: 21st century agriculture: integration of plant microbiomes for improved crop production and food security. *Microb Biotech* 8: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12180>
- SILAMBARASAN S, LOGESWARI P, CORNEJO P & V R KANNAN 2019: Evaluation of the production of exopolysaccharide by plant growth promoting yeast *Rhodotorula* sp. strain CAH2 under abiotic stress conditions. *Int J Biol Macromol* 121: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.016>
- SIVASAKTHI S, USHARANI G & P SARANRAJ 2014: Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR)-*Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: A review. *Afr J Agric Res* 9: 10.5897/AJAR2013.7914
- SMITH S. E. & READ D. J. 2008: *Mycorrhizal Symbiosis* (3rd ed.). Academic Press.
- SONG Q, SONG X, DENG X, LUO J, WANG J, MIN K & R SONG 2021: Effects of plant growth promoting Rhizobacteria microbial on the growth, rhizosphere soil properties, and bacterial community of *Pinus sylvestris* var. *mongolica* seedlings. *Scand J Forest Res* 36: <https://doi.org/10.1080/02827581.2021.1917649>
- STANTURF J A, KLEINE M, MANSOURIAN S, PARROTTA J, MADSEN P, KANT P, BURN J & BOLTE 2019: Implementing forest landscape restoration under the Bonn Challenge: A systematic approach. *Ann For Sci* 76: <https://doi.org/10.1007/s13595-019-0833-z>
- STANTURF J A, PALIK B J, WILLIAMS M I, DUMROESE R K & P MADSEN 2014: Forest restoration paradigms. *J. Sustain. Forest* 33: <https://doi.org/10.1080/10549811.2014.884004>
- SU P, TAN X, LI C, ZHANG D, CHENG J, ZHANG S, ZHOU X, YAN Q, PENG J, ZHANG Z, LIU Y & X LU 2017: Photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas palustris* GJ-22 induces systemic resistance against viruses. *Microb Biotechnol* 10: 10.1111/1751-7915.12704
- SUBRAMANIAN S, RICCI E, SOULEIMANOV A, & D L SMITH 2016a: A proteomic approach to lipochitoooligosaccharide and thuricin 17 effects on soybean germination unstressed and salt stress. *PLoS One* 11: 10.1371/journal.pone.0160660
- SUBRAMANIAN S, SOULEIMANOV A, & D L SMITH 2016b: Proteomic studies on the effects of lipochitoooligosaccharide and thuricin 17 under unstressed and salt stressed conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci* 7: 10.3389/fpls.2016.01314
- SUMARAH M W, ADAMS G W, BERGHOUT J, SLACK G J, WILSON A M & J D MILLER 2008: Spread and persistence of a rugulosin-producing endophyte in *Picea glauca* seedlings. *Mycological Research* 112: <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2008.01.007>
- TASHI-OSHNOEI F, HARIGHI B & J ABDOLLAHZADEH 2017: Isolation and identification of endophytic bacteria with plant growth promoting and biocontrol potential from oak trees. *Forest Pathology* 47: <https://doi.org/10.1111/efp.12360>

- TIAN Y, LIU Y, UWAREMWE C, ZHAO X, YUE L, ZHOU Q, WANG Y, PHAN TRAM L.S, LI W, CHEN G, SHA Y & R WANG 2023: Characterization of three new plant growth-promoting microbes and effects of the interkingdom interactions on plant growth and disease prevention. *Plant Cell Reports* 42: 10.1007/s00299-023-03060-3
- VAN DER HEIJDEN M. G. A., BARDGETT R. D., VAN STRAALEN N. M. 2008: The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity. *Ecol Lett*, 11: <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01139.x>
- ZHANG Y, XU J, L RU, GE Y, LI Y & R LI 2023, Plants' Response to Abiotic Stress: Mechanisms and Strategies. *Int J Mol Sci* 24: 10.3390/ijms241310915



# VIROMSKA ANALIZA RNA VIRUSOV V VZORCIH TRIGLAVSKEGA LEDENIKA IN LEDENIKA POD SKUTO

## VIROMICS ANALYSIS OF RNA VIRUSES IN SAMPLES FROM THE TRIGLAV AND SKUTA GLACIER

Kristina ANDREJC<sup>1</sup>, Maša JARČIČ<sup>2,3</sup>, Ion GUTIERREZ-AGUIRRE<sup>1</sup>, Denis KUTNJAK<sup>1</sup>, Katarina BAČNIK<sup>1</sup>

<http://dx.doi.org/10.3986/fbg0116>

### IZVLEČEK

V ledenikih se kljub nizkim temperaturam in omejeni količini dosegljive vode ter hranil skriva velika biološka raznolikost. V ledeniških mikrobni skupnostih prevladujejo bakterije, alge in glive. Znanje o virusih v teh ekstremnih okoljih pa je omejeno, kar smo želeli nasloviti z viromsko analizo slovenskih ledenikov: Triglavskega ledenika in ledenika pod Skuto. Iz koncentriranih vzorcev staljenega ledeniškega ledu smo izolirali ribonukleinske kisline (RNA), jih pomnožili z naključnimi oligonukleotidnimi začetniki in netačno določili njihova zaporedja s platformo Illumina. S pomočjo bioinformatičnih analiz smo v pridobljenih podatkih poiskali virusna zaporedja in jih taksonomsko uvrstili. Odstotki odčitkov, ki so se klasificirali kot virusni, so bili pričakovano nizki. Kljub osredotočenosti na opis raznolikosti RNA virusnih zaporedij, smo v vseh vzorcih slovenskih ledenikov najbolj pogosto zaznali virusne odčitke, ki so pripadali DNA bakteriofagom, klasificiranim v svet *Duplodnaviria*. Virusna zaporedja odkrita v vzorcih slovenskih ledenikov so večinoma izkazovala nizke identitete z znanimi virusnimi zaporedji iz podatkovnih baz, kar kaže na prisotnost številnih novih virusnih vrst. Daljša sestavljena virusna zaporedja verjetno predstavljajo celotne genome novo odkritih RNA virusov (npr. virusna zaporedja iz skupine toti-podobnih in picorna-podobnih virusov). Za taka zaporedja smo s filogenetskimi analizami pokazali, katerim znanim virusom so najbolj sorodni in kakšne organizme potencialno okužujejo. Raziskava viroma slovenskih ledenikov predstavlja prvi vpogled v prisotnost virusov v teh okoljih pri nas in razkriva, da se v njih skriva velika in neraziskana raznolikost teh bioloških entitet.

**Ključne besede:** virusi, viromska analiza, Triglavski ledenik, ledenik pod Skuto

### ABSTRACT

Despite low temperatures and limited availability of water and nutrients, there is a high level of biological diversity hidden in the glaciers. Glacial microbial ecosystems are primarily composed of bacteria, algae, and fungi. However, knowledge about viruses in these extreme environments remains limited. To address this gap, we conducted virome analysis on two Slovenian glaciers: Triglavski ledenik (Triglav glacier) and ledenik pod Skuto (glacier below Skuta). From concentrated samples of melted glacial ice, we isolated ribonucleic acids (RNA), amplified them using random oligonucleotide primers, and performed untargeted sequencing using the Illumina platform. Through bioinformatic analyses, we identified viral sequences in the obtained data and classified them taxonomically. As expected, the proportion of reads classified as viral was low. Despite focusing on the description of RNA viral diversity, the most frequently detected viral reads in all glacier samples were those belonging to DNA bacteriophages, classified within the realm *Duplodnaviria*. Most of the viral sequences discovered in the Slovenian glacier samples showed low identity with known viral sequences in databases, indicating the presence of numerous novel viral species. Longer assembled viral sequences likely represent complete genomes of newly discovered RNA viruses (e.g., sequences related to toti-like and picorna-like virus groups). For these sequences, phylogenetic analyses revealed their closest known viral relatives and potential host organisms. This study represents the first insight into the presence of viruses in Slovenian glacier environments and reveals a large, previously unexplored diversity of these biological entities.

**Key words:** viruses, virome analysis, Triglav glacier, glacier below Skuta

<sup>1</sup> Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo, Večna pot 121, 1000 Ljubljana, kristina.andrejca@gmail.com, ion.gutierrez@nib.si, denis.kutnjak@nib.si, katarina.bacnik@nib.si

<sup>2</sup> Biotehniška fakulteta, Oddelek za mikrobiologijo, Večna pot 111, 1000 Ljubljana

<sup>3</sup> Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Oddelek za mikrobiološke raziskave, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor, masa.jarcic@gmail.com

## UVOD

Ledeniki se nahajajo v hladnih območjih z obilnimi snežnimi padavinami, predvsem na visokih geografskih širinah in nadmorskih višinah (DEBEER et al. 2020). Njihovo oblikovanje je dolgotrajen proces, ki vključuje akumulacijo snega in ablacijo zaradi taljenja, evaporacije ter lomljenja ledu (BENN & EVANS 2014). Ledeniki imajo ključno vlogo v alpskem hidrološkem sistemu (LAMBRECHT & KUHN 2007) ter služijo kot indikatorji podnebnih sprememb (RAPER & BRAITHWAITE 2009). V Sloveniji se nahajata dva ledenika; Triglavski ledenik leži v Julijskih Alpah, severovzhodno pod Triglavom, ledenik pod Skuto pa se nahaja tik pod najvišjimi vrhovi na obojni strani v Kamniško-Savinjskih Alpah. Oba ledenika se že več desetletij hitro manjšata (PAVŠEK 2007). Ob nadaljevanju svetovnega trenda dvigovanja temperatur lahko v naslednjih desetletjih pričakujemo, da bosta tudi Triglavski ledenik in ledenik pod Skuto, tako kot številni drugi po svetu, izginila (PAVŠEK 2007).

Ledeniška okolja so ena izmed biološko najmanj raziskanih okolij na Zemlji, saj so za njih značilni zahtevni življenjski pogoji, kot so nizke temperature, omejena dostopnost hranil in tekoče vode. Ledeniške ekosisteme naseljujejo skoraj izključno mikroorganizmi, predvsem bakterije in mikrobní evkarionti (ANESIO & LAYBOURN-PARRY 2012; HODSON et al. 2008). O raznolikosti in strukturah virusnih skupnosti v ledeniških okoljih je trenutno na voljo malo raziskav, ki pa nakazujejo na veliko genetsko kompleksnost in raznolikost virusov. Na primer (LÓPEZ-BUENO et al. 2009) so v antarktičnem sladkovodnem jezeru Limnopolar na otoku Livingston zaznali veliko morfološko in taksonomsko raznolikost virusov, katerih prevladujoč delež predstavljajo virusi evkariontov, vključno z enoverižnimi (ss)DNA virusi sorodnimi virusom, ki okužujejo živali in rastline, in dvoverižnimi (ds)DNA virusi, ki okužujejo alge. Leta 2015 so poročali o prvi metagenomski študiji RNA virusov v zgoraj imenovanem antarktičnem jezeru. V raziskavi so pokazali, da so v vzorcih prevladovali ssRNA virusi sorodni predstavnikom redu *Picornavirales*, in opisali njihovo časovno-prostorsko spreminjanje (LÓPEZ-BUENO et al. 2015). Nedavno so raziskali DNA in RNA virom kriosfere tibetanskega platoja (Liu et al.

2023, 2024). V vzorcih ledenikov, proglacialnih jezerskih sedimentov, permafrosta in gorskih tal so zaznali več kot 4900 novih RNA virusnih operacijskih taksonomskih enot. Med njimi tudi številne predstavnike povsem novih, divergentnih skupin RNA virusov, ki okužujejo prokariote, kar pogloblja naše razumevanje njihove raznolikosti (Liu et al. 2024).

Virusi v ledeniških okoljih so maloštevilni in razpršeni, zato je potrebno koncentriranje virusov iz večje količine vzorca, da pridobimo dovolj materiala za nadaljnje analize (RASSNER 2017). To lahko predstavlja tako metodološki kot tudi logistični problem. Poznamo različne postopke virusnega koncentriranja (npr. ultracentrifugiranje, flokulacija ali filtracija), v tej raziskavi pa smo se odločili za uporabo CIM monolitne kromatografije, ki je pokazala visoko učinkovitost pri koncentriranju virusov iz različnih vodnih vzorcev, kot so pitna voda, rečna voda, ustekleničena voda, prečiščene odpadne vode in morska voda (GUTIÉRREZ-AGUIRRE et al. 2018). Za karakterizacijo viromov vodnih vzorcev najpogosteje uporabljamo netarčno visokozmogljivo sekvenciranje (ROSE et al. 2016) oziroma t.i. metagenomski pristop, ki omogoča vpogled v prisotnost znanih in novih virusnih zaporedij, njihovo taksonomsko klasifikacijo ter karakterizacijo virusnih genomov. Z bioinformatičnimi orodji lahko pridobljena kratka zaporedja (odčitke) ali pa sestavljena zaporedja primerjamo z zaporedji znanih virusov oziroma zaporedja vključimo v filogenetske analize.

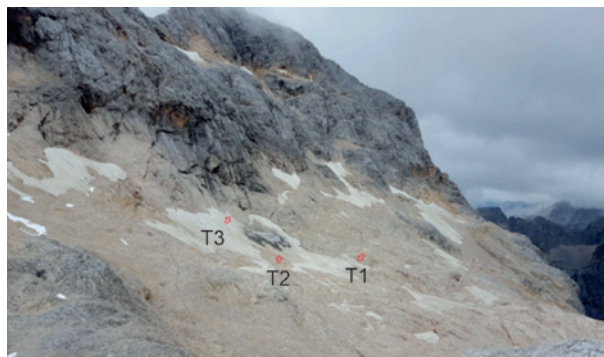
Z tej raziskavi smo želeli zapolniti vrzel v poznavanju virusnih skupnosti v slovenskih ledenikih, ki kljub svoji majhnosti predstavljata pomemben del slovenske naravne dediščine. To znanje želimo pridobiti dokler je to, zaradi njunega pospešenega izginjanja, še mogoče. Naš cilj je bil določiti prisotnost in raznolikost virusnih zaporedij z uporabo visokozmogljivega sekvenciranja. Poglobljena analiza nabora metagenomskih podatkov je potrdila, da so ledeniške virusne skupnosti raznolike, pri čemer večji del predstavljajo virusi brez bližnjih sorodnikov v obstoječih zbirkah podatkov. Viromi opisani v naši raziskavi se razlikujejo od prej opisanih sladkovodnih viromov.

## MATERIALI IN METODE

### Lokacije in potek vzorčenja

Vzorci ledu s Triglavskega ledenika in ledenika pod Skuto smo pridobili septembra 2018 (JARČIČ 2021) (Pre-

glednica 1). Triglavski ledenik smo vzorčili na lokacijah z geografskimi koordinatami 46°22'43.6"N in 13°50'35.7"E. Vzorec T1 smo odvzeli na najnižji točki ledeniške zaplate (globina 20 cm), vzorec T2 na osrednjem delu (globina



Slika 1: Triglavski ledenik z označenimi mesti vzorčenja (JARČIČ 2021)

Figure 1: Triglav glacier with marked sampling sites (JARČIČ 2021)



Slika 2: Ledenik pod Skuto z označenimi mesti vzorčenja (JARČIČ 2021)

Figure 2: Glacier under Skuta with marked sampling sites (JARČIČ 2021)

30–40 cm), vzorec T3 pa na najvišje ležečem delu ledenika (Slika 1). Ledenik pod Skuto smo vzorčili na mestih z geografskimi koordinatami 46°21'57.4"N in 44°33'33.7"E. Vzorec S1 smo odvzeli na spodnjem levem delu ledenika, S2 na zgornjem desnem robu, S3 pa na najvišji točki (Slika 2). Pri vzorčenju smo uporabili cepine in lopate. Vzorci so merili približno 35 cm × 30 cm × 20 cm. Shranili smo jih v sterilne vrečke. Na terenu smo jih delno odtajali (40 minut), nato smo jih sprali s sterilno vodo, ponovno zaprli v sterilne vrečke in jih prenesli v laboratorij za nadaljnje analize (JARČIČ 2021).

### Koncentriranje vzorcev in izolacija RNA

Koncentriranje vzorcev ledenikov smo izvedli takoj po vzorčenju leta 2018 po postopku opisanem v (BAČNIK et

al. 2020). Pred koncentriranjem smo vzorce filtrirali preko filter papirja in celulozno acetatne membrane z velikostjo por 0,8 µm (Sartorius, Nemčija). Koncentriranje smo izvedli s CIM QA (ang. quaternary amine) 8 mL monolitno kolono (BIA Separations, Ajdovščina, Slovenija) na hitrem proteinsko tekočinskem kromatografskem sistemu AKTA Purifier 100 (GE Healthcare, Chicago, IL, ZDA). Po nalaganju vzorcev ledenikov (2 L) in spiranju kolone je sledila elucija s 50 mM pufrom HEPES (pH = 7) z 1 M NaCl v dve 15 mL elucijski frakciji (E1, E2). Kolono smo očistili z dvournim prečrpavanjem 1 M raztopine NaOH. Sledilo je nalaganje 200 mL ultračiste (Mili-Q) vode na kolono ter elucija s 50 mM pufrom HEPES (pH = 7) z 1 M NaCl. Eluat z dodatkom sintetične RNA luciferaze (Promega, Madison, Wisconsin, ZDA) v nadaljevanju predstavlja negativno kontrolo sistema AKTA Purifier 100.

Za izolacijo RNA iz koncentriranih vzorcev slovenskih ledenikov smo uporabili reagent TRIzol LS (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, ZDA) po protokolu proizvajalca z dodatkom glikogena (100 mg) v 400 µL vzorca na začetku izolacije in z uporabo mikrocentrifugirk z gelom MaxTract (Qiagen, Hilden, Nemčija). V protokol izolacije smo vključili tudi negativno kontrolo, kateri smo namesto vzorca dodali enako količino vode brez ribonukleaz ter sintetično RNA luciferaze (Promega, Madison, Wisconsin, ZDA). S kasnejšo analizo te kontrole smo preverili možne kontaminacije med postopkom izolacije in sekvenciranja. Koncentracijo celokupne RNA v vzorcih po izolaciji smo izmerili z uporabo fluorometra Qubit 2.0 in visoko občutljivega kita za zaznavanje (ang. high sensitivity) (hs)RNA (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, ZDA) po navodilih proizvajalca.

### Pomnoževanje z naključnimi oligonukleotidnimi začetniki in sekvenciranje

Po izolaciji RNA smo zaradi nizke koncentracije RNA v vzorcih izvedli naključno pomnoževanje nukleinskih kislin. Postopek pomnoževanja z naključnimi oligonukleotidnimi začetniki smo povzeli po FERNÁNDEZ-CASSI et al. (2018) ter WANG et al. (2003) in zajema več korakov. Prvi korak predstavlja sinteza komplementarne DNA - sinteza prve verige z reverzno transkriptazo (SuperScript III; Life Technologies, Massachusetts, ZDA) in uporabo oligonukleotidnega začetnika A (5'-GTTTCCCAGTCACGATANNNNNNNN-3') ter sinteza druge verige s sekvencazo (Sequenase 2.0; Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ZDA). Temu sledi pomnoževanje DNA z uporabo oligonukleotidnega začetnika B (5'-GTTTCCCAGTCACGATA0-3') in DNA polimera-

ze (AmpliQGold; Thermo Fisher, Massachusetts, ZDA). Produkta PCR smo očistili in koncentrirali z uporabo Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, Kalifornija, ZDA). Preden smo vzorce shranili na  $-80^{\circ}\text{C}$ , smo izmerili koncentracijo nukleinskih kislin v vzorcih po pomnoževanju z uporabo fluorometra Qubit 2.0 in visoko občutljivega kita za zaznavanje hsDNA (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, ZDA) po navodilih proizvajalca.

Po izolaciji nukleinskih kislin in pomnoževanju z naključnimi oligonukleotidnimi začetniki smo pridobeno DNA iz obeh elucijskih frakcij, ki sta pripadali istemu vzorcu ledenika, združili v en vzorec. Združevanje smo izvedli tako, da smo iz vsake frakcije dodali enako maso (ng) DNA, ki smo jo izračunali iz izmerjenih koncentracij DNA v posameznih elucijskih frakcijah po pomnoževanju. Vzorce smo nato poslali na netačno sekvenciranje (ang. shotgun sequencing) v podjetje Novogene Europe (Cambridge, Združeno kraljestvo) vključ-

no z negativno kontrolo izolacije ter negativno kontrolo sistema AKTA Purifier 100. V podjetju Novogene so vzorce pripravili po delotoku PA WGS in jih sekvencirali na platformi Illumina (NovaSeq PE150). V Preglednici 1 so zbrani podatki o vzorcih slovenskih ledenikov. Natančnejša lokacija posameznih vzorcev (T1-3 in S1-3) je razložena v poglavju »lokacije in potek vzorčenja« in prikazana na Slikah 1 in 2.

### Analize viromskih podatkov

Po sekvenciranju smo preverili kakovost podatkov s programsko opremo CLC Genomics Workbench (verzija 22.0.2). S tem orodjem smo izvedli rezanje koncev (ang. trimming) za odstranitev preostalih adapterskih zaporedij in zaporedij začetnih oligonukleotidov uporabljenih za pomnoževanje. Odstranili smo zaporedja z nizko kakovostjo (meja = 0,01) in kratka zaporedja (dol-

Preglednica 1: Informacije o vzorcih slovenskih ledenikov.

| Ledenik:                                      | Triglavski ledenik        |      |      |      |      |       | Ledenik pod Skuto         |      |      |      |      |       |
|-----------------------------------------------|---------------------------|------|------|------|------|-------|---------------------------|------|------|------|------|-------|
| Čas vzorčenja:                                | začetek septembra (2018)  |      |      |      |      |       | začetek septembra (2018)  |      |      |      |      |       |
| Koordinate vzorčenja:                         | 46°22'43.6"N 13°50'35.7"E |      |      |      |      |       | 46°21'57.4"N 44°33'33.7"E |      |      |      |      |       |
| Oznaka elucijske frakcije po koncentriranju   | T1E1                      | T1E2 | T2E1 | T2E2 | T3E1 | T3E2  | S1E1                      | S1E2 | S2E1 | S2E2 | S3E1 | S3E2  |
| Koncentracija RNA po izolaciji [ng/μL]        | *                         | *    | 11,2 | *    | 7,76 | *     | *                         | *    | 6,6  | *    | 12,7 | 4,0   |
| Koncentracija DNA po pomnoževanju [ng/μL]     | 74,8                      | 14,9 | 56,6 | 67,4 | 78,0 | 100,0 | 63,2                      | 53,0 | 75,0 | 92,8 | 70,4 | 104,0 |
| Oznaka vzorca po združenju elucijskih frakcij | T1                        |      | T2   |      | T3   |       | S1                        |      | S2   |      | S3   |       |

\* Pod mejo detekcije

Table 1: Information about samples from Slovenian glaciers.

| Glacier:                                                | Triglav glacier           |      |      |      |      |       | Glacier below Skuta       |      |      |      |      |       |
|---------------------------------------------------------|---------------------------|------|------|------|------|-------|---------------------------|------|------|------|------|-------|
| Sampling time:                                          | Early September (2018)    |      |      |      |      |       | Early September (2018)    |      |      |      |      |       |
| Sampling coordinates:                                   | 46°22'43.6"N 13°50'35.7"E |      |      |      |      |       | 46°21'57.4"N 44°33'33.7"E |      |      |      |      |       |
| Elution fraction name after concentration               | T1E1                      | T1E2 | T2E1 | T2E2 | T3E1 | T3E2  | S1E1                      | S1E2 | S2E1 | S2E2 | S3E1 | S3E2  |
| RNA concentration after isolation [ng/μL]               | *                         | *    | 11.2 | *    | 7.76 | *     | *                         | *    | 6.6  | *    | 12.7 | 4.0   |
| DNA concentration after random preamplification [ng/μL] | 74.8                      | 14.9 | 56.6 | 67.4 | 78.0 | 100.0 | 63.2                      | 53.0 | 75.0 | 92.8 | 70.4 | 104.0 |
| Sample name after pooling of elution fractions          | T1                        |      | T2   |      | T3   |       | S1                        |      | S2   |      | S3   |       |

\* Below detection limit

žina < 25 nukleotidov). Pridobljena zaporedja smo nato uporabili za *de novo* sestavljanje zaporedij z uporabo programske opreme SPAdes 3.15.5 (BANKEVICH et al. 2012). Zaporedja odčitkov in *de novo* sestavljena zaporedja smo z uporabo DIAMOND BLASTx (Buchfink et al. 2015) primerjali s celotno ne-redundantno (nr) proteinsko podatkovno bazo NCBI (julij 2022). Taksonomsko klasifikacijo odčitkov in vizualizacijo rezultatov smo izvedli z uporabo programske opreme MEGAN Community Edition (verzija 6.24.0) (HUSON et al. 2016) z uporabo baze NCBI-nr vnosov posodobljenih februarja 2022, z analizo najnižjega skupnega prednika (ang. Lowest Common Ancestor).

Identiteto z znanimi virusnimi zaporedji, ki so depenirana v podatkovnih bazah, smo za daljša sestavljena zaporedja dodatno določili z uporabo NCBI BLASTx (2023-09-11). Njihovo pokritost z odčitki smo določili z CLC Genomics Workbench (orodje imenovano „Map reads to contigs“; dolžinsko ujemanje = 0,90, ujemanje podobnosti = 0,90). Prisotnost virusnih družin v vzorcih smo v obliki tabele izvozili iz programa MEGAN na podlagi taksonomske določitve odčitkov in sestavljenih zaporedij. Tekom pregledovanja prisotnosti virusnih družin smo ročno popravili nekatere napake v uporabljeni verziji programske opreme MEGAN (Community Edition, verzija 6.24.0), pri čemer smo upoštevali takrat veljavno klasifikacijo (Current ICTV Taxonomy Release 2023).

## Filogenetske analize izbranih virusnih zaporedij

Za izgradnjo filogenetskih dreves smo se omejili na RNA virusom podobna zaporedja, ki so se pojavila v več vzorcih slovenskih ledenikov in so bila daljša od 1.000 nukleotidov. Izbrana sestavljena zaporedja so spadala v toti-podobno (zaporedje\_T1\_NODE282, zaporedje\_T2\_NODE2220, zaporedje\_T3\_NODE103) ter picorna-podobno (zaporedje\_S2\_NODE1003, zaporedje\_S3\_NODE129) virusno skupino. Izbranim nukleotidnim zaporedjem (Priloga A) smo z orodjem ORFfinder določili odprte bralne okvirje (ORF; ang. open reading frame). Proteinska zaporedja smo primerjali s podatko-

vno bazo NCBI nr proteinskih zaporedij z orodjem BLASTp. Analizo smo izvedli aprila 2023. Za izgradnjo filogenetskih dreves smo uporabili proteinska zaporedja. Ta so glede na analizo BLASTp predstavljala zaporedja od RNA odvisne RNA polimeraze (RdRp; ang. RNA-dependent RNA polymerase), ki velja za najbolj ohranjeno zaporedje pri RNA virusih (CHARON et al. 2020; SHI et al. 2016). Glede na rezultate analiz BLASTp smo za vsako virusno skupino pridobili zaporedja znanih virusov, ki so bila najbolj podobna našim zaporedjem (pridobili smo do 50 takih zaporedij).

Za vsako virusno skupino smo pridobljena zaporedja, skupaj z zaporedji pridobljenimi v naši raziskavi, uvozili v program MEGA (TAMURA et al. 2021). Dodali smo tudi zaporedje, ki predstavlja zunanjo skupino (ang. outgroup). Za zunanje skupine smo izbrali primerna sorodna virusna zaporedja, glede na predhodno objavljeno literaturo (CHARON et al. 2020; LEFKOWITZ et al. 2018; Shi et al. 2016). Vsa zaporedja smo poravnali z orodjem ClustalW (samodejni parametri) v MEGA, ter jih ročno pregledali. Nato smo jih dodatno poravnali z orodjem MAFFT (v. 7) z uporabo strategije »auto« (KATO & STANDLEY 2013). Pridobljeno poravnavo smo nato obdelali z orodjem za rezanje sekvenc TrimAL (v. 1.3) (CAPELLA-GUTIÉRREZ et al. 2009) z uporabo metode »automated 1«. Tako pridobljene poravnave (dolžina aminokislinske poravnave za toti-podobno skupino je bila 633 nukleotidov in za picorna-podobno skupino 339 nukleotidov), smo uporabili za izgradnjo dreves po metodi največjega verjetja (ang. Maximum Likelihood) z uporabo IQ-Tree z avtomatsko določitvijo substitucijskega modela in z določitvijo statistične podpore vej z metodo zankanja s 1000 ponovitvami (ang. bootstrap) (NGUYEN et al. 2015). Za prikaz filogenetskih dreves smo uporabili spletno orodje iTOL (ang. Interactive Tree Of Life) (Letunic & Bork 2021). Tekom poravnave zaporedij smo izločili taka, ki so bila identična ali pa se niso dobro prilegala poravnavi (so bila prekratka ali preveč različna). NCBI (eng. National Center for Biotechnology Information) identifikacijske oznake za zaporedja znanih virusov vključena v filogenetske analize so razvidna iz filogenetskih dreves.

## REZULTATI IN RAZPRAVA

### Pregled rezultatov sekvenciranja in viromske analize

S sekvenciranjem šestih vzorcev ledenikov in dveh kontrol smo skupno pridobili 34.3 giga baz podatkov. Število

odčitkov se je za posamezni vzorec gibalo med 19.263.088 in 34.328.752, s povprečno dolžino 143 nukleotidov (Preglednica 2). Število odčitkov, ki so se z analizo DIAMOND/MEGAN klasificirali kot virusni se je gibalo med 35.812 in 162.372. Pri vzorcih Triglavskega ledeni-

Preglednica 2: Rezultati sekvenciranja za vzorce slovenskih ledenikov. Celokupno število odčitkov ter število odčitkov, ki so se klasificirali kot virusni.

| Identifikacijska oznaka | SRA* Identifikacijska oznaka | Št. odčitkov | Št. odčitkov po rezanju koncev | Št. virusnih odčitkov | Virusni odčitki [%] |
|-------------------------|------------------------------|--------------|--------------------------------|-----------------------|---------------------|
| T1                      | SRR33121138                  | 19263088     | 18565601                       | 44137                 | 0,23                |
| T2                      | SRR33121137                  | 34328752     | 32771522                       | 134932                | 0,41                |
| T3                      | SRR33121136                  | 28789468     | 27718269                       | 35812                 | 0,12                |
| S1                      | SRR33121135                  | 33035406     | 31981686                       | 162372                | 0,49                |
| S2                      | SRR33121134                  | 28411040     | 27035177                       | 82848                 | 0,29                |
| S3                      | SRR33121133                  | 27831094     | 26706246                       | 98437                 | 0,35                |

\* Sequence Read Archive (SRA)

Table 2: Sequencing results for Slovenian glacier samples. Total read numbers and numbers of reads classified as viral.

| Sample | SRA* accession number | Raw Reads  | Reads after Trimming | No. of reads classified as viral | Reads classified as viral [%] |
|--------|-----------------------|------------|----------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| T1     | SRR33121138           | 19,263,088 | 18,565,601           | 44,137                           | 0.23                          |
| T2     | SRR33121137           | 34,328,752 | 32,771,522           | 134,932                          | 0.41                          |
| T3     | SRR33121136           | 28,789,468 | 27,718,269           | 35,812                           | 0.12                          |
| S1     | SRR33121135           | 33,035,406 | 31,981,686           | 162,372                          | 0.49                          |
| S2     | SRR33121134           | 28,411,040 | 27,035,177           | 82,848                           | 0.29                          |
| S3     | SRR33121133           | 27,831,094 | 26,706,246           | 98,437                           | 0.35                          |

\* Sequence Read Archive (SRA)

ka, število takih virusnih odčitkov predstavlja povprečno  $0,26 \pm 0,12$  (standardni odklon) % vseh odčitkov, pri vzorcih ledenika pod Skuto pa  $0,38 \pm 0,08$  (standardni odklon) % (Preglednica 2).

Nizki odstotki virusnih odčitkov v vzorcih ledenikov so pričakovani in v skladu s predhodnimi raziskavami okoljskih vzorcev (DE CÁRCER et al. 2015; Prado et al. 2022). Najverjetneje je to posledica nizke koncentracije virusov in njihovih nukleinskih kislin v vzorcih, omejitev virusnih podatkovnih baz, kratkih dolžin odčitkov nastalih pri sekvenciranju s platformo Illumina ter novosti tipa podatkovnih setov (BELLAS & ANESIO 2013). Zaradi omejenih informacij o virusih v ekstremnih okoljih, je njihova zastopanost v podatkovnih bazah nizka (EDWARDS et al. 2013). V raziskavi antarktičnih vodnih okolij večine odčitkov in sestavljenih zaporedij ni bilo možno taksonomsko določiti, kar nakazuje, da ima velik del analizirane virusne raznolikosti nizko podobnost z zaporedji prisotnimi v podatkovnih bazah in predstavlja nove še ne odkrite virusne vrste (De Cárcer et al. 2016).

V vseh vzorcih slovenskih ledenikov se je največje število odčitkov klasificiralo znotraj virusnega sveta *Duplodnaviria*, kamor spadajo virusi z linearnimi dsDNA genomi in značilnimi kapsidnimi proteini s t.i.

»HK97 fold« (DUDA & TESCHKE 2019). Temu pa so sledili svetovi: *Riboviria* z RNA virusi, ki kodirajo homologno od RNA odvisno polimerazo (KUHN et al. 2017), *Monodnaviria* z virusi s krožnimi ssDNA genomi (KAZLAUSKAS et al. 2019) in *Varidnaviria*, kamor spadajo virusi z dsDNA, za katere so značilni homologni kapsidni proteini, ki vsebujejo t.i. »jelly roll« proteinsko strukturo (Woo et al. 2021) (Slika 3).

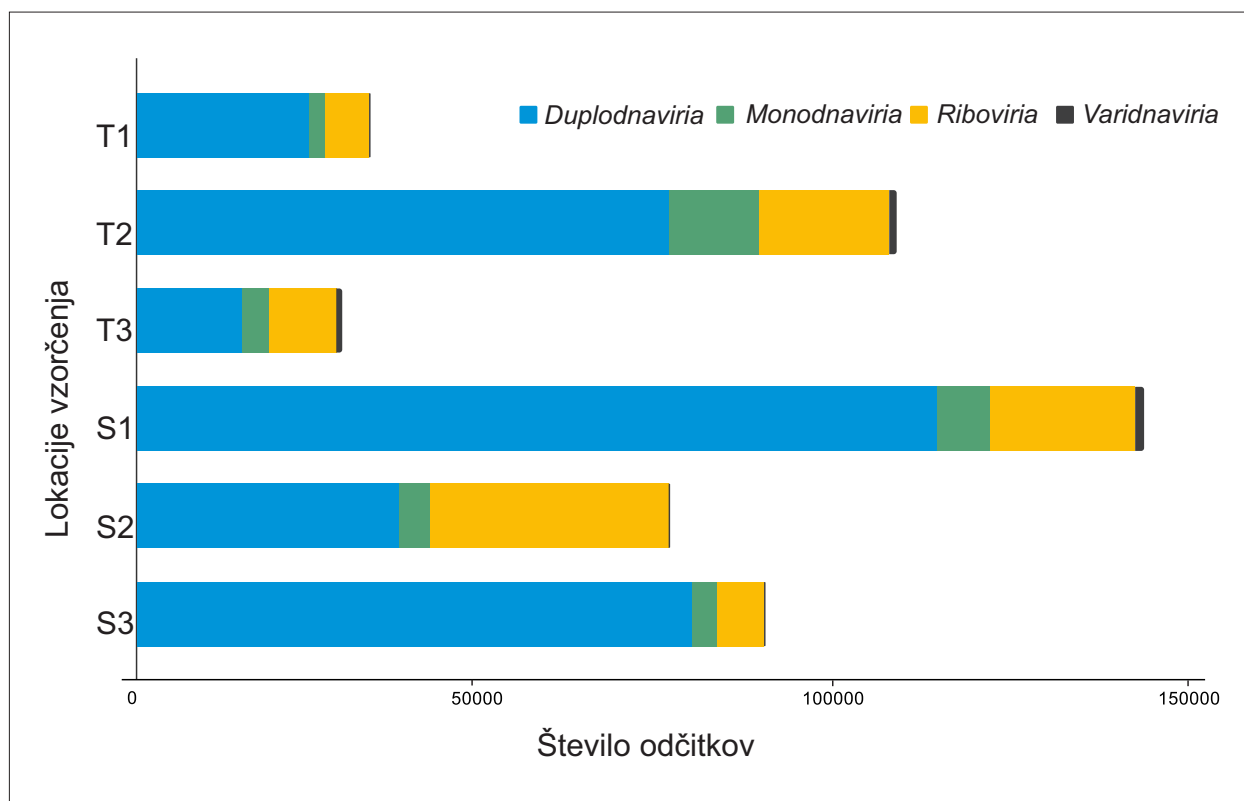
Postopek priprave vzorcev slovenskih ledenikov pred sekvenciranjem (zlasti izolacija nukleinskih kislin) smo usmerili v opis raznolikosti RNA virusnih zaporedij, ki spadajo v svet *Riboviria*. Kljub temu v vzorcih prevladujejo odčitki, ki so se klasificirali znotraj sveta *Duplodnaviria*, natančneje kot razred *Caudoviricetes*, kamor spadajo dsDNA bakteriofagi (Slika 3). Za zaznavo virusne DNA obstajajo različni razlogi, npr. izolacija DNA skupaj z RNA, saj po izolaciji nismo izvedli reakcije z DNazo ali pa zaznava informacijske RNA DNA virusov. Predstavniki razreda *Caudoviricetes* so ena izmed najbolj razširjenih bioloških entitet na svetu, zaradi česar so dobro zastopani v podatkovnih bazah (KRUPOVIC et al. 2011). V viromskih raziskavah antarktične prsti so v vseh vzorcih prevladovali predstavniki razreda *Caudoviricetes* (ADRIAENSSENS et al. 2017).

### Taksonomska določitev zaporedij RNA virusov

V nadaljevanju rezultatov in diskusije se bomo osredotočili na RNA virusna zaporedja, ki so se v analizi podatkov klasificirala znotraj sveta *Riboviria*. V vseh vzorcih slovenskih ledenikov smo zaznali naslednje virusne družine: *Totiviridae*, *Leviviridae*, *Narnaviridae* in *Partitiviridae* (Slika 4). Predstavniki družine *Totiviridae* okužujejo glive in praživali (KING et al. 2011), nedavno pa so bili odkriti tudi v številnih nevretenčarjih (ZHAO et al. 2022). Virusi iz virusne družine *Narnaviridae* okužujejo predvsem kvasovke in oomicete (HILLMAN & CAI 2013), predstavniki virusne družine *Partitiviridae* pa so povezani z okužbami gliv, praživali ter rastlin (VAINIO et al. 2018). Levivirusi so ssRNA bakteriofagi brez ovojnice. Red *Picornavirales* trenutno združuje 9 virusnih družin, od katerih se je v vsaj enem izmed vzorcev slovenskih ledenikov pojavilo 5 družin - *Dicistroviridae*, *Iflaviridae*, *Marnaviridae*, *Picornaviridae* in *Secoviridae*. Predstavniki virusnih družin znotraj reda okužujejo zelo različne gostitelje (KING et al. 2011). V raziskavi antark-

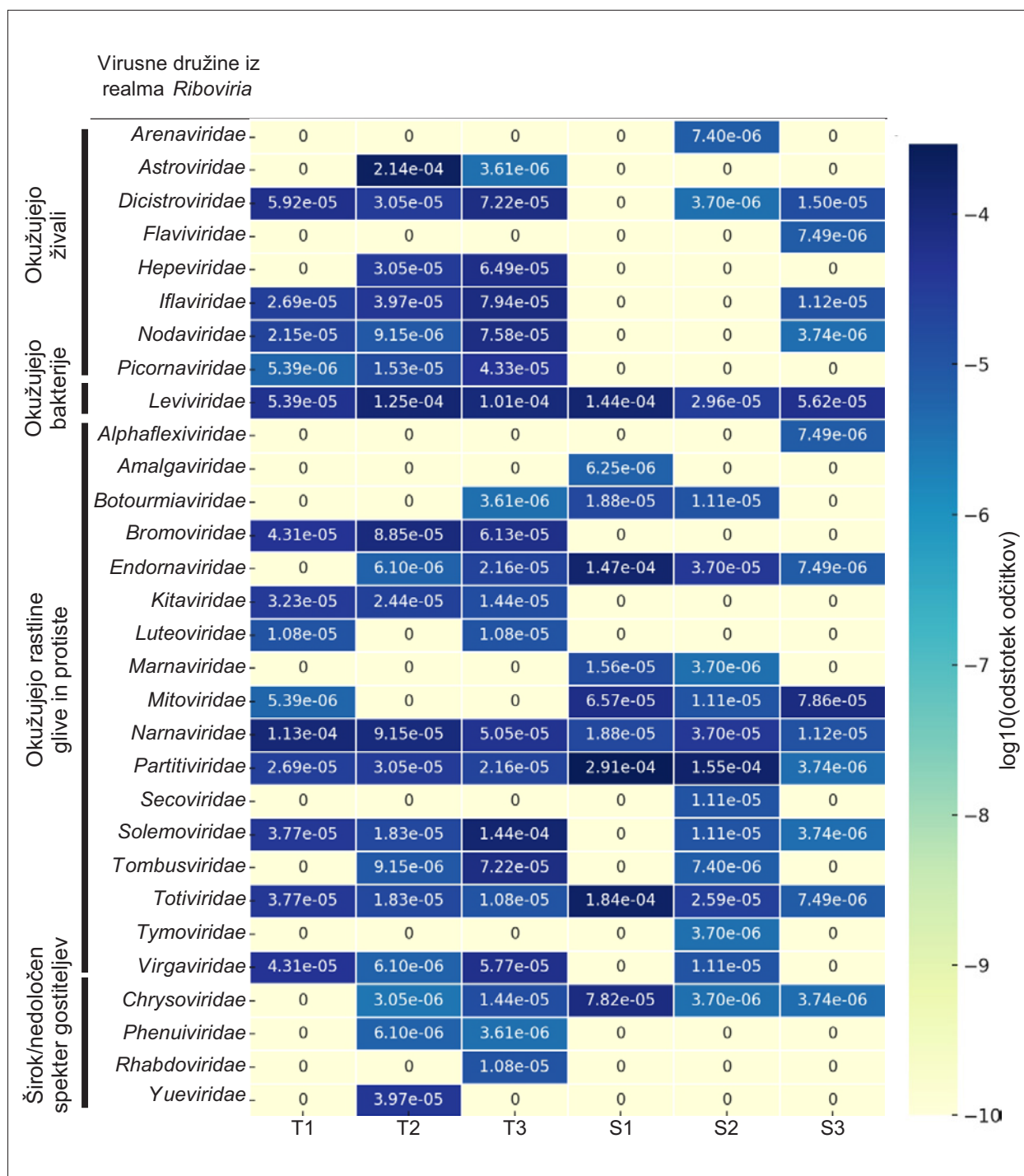
tičnega jezera Limnopolar so odkrili, da med RNA virusi prevladujejo ssRNA virusi iz reda *Picornavirales*. Identificirali so štiri skoraj popolne virusne genome; eden je najbolj soroden virusom žuželk, trije pa so glede na filogenetsko analizo najbolj podobni drugim predstavnikom reda, ki okužujejo protiste. (LÓPEZ-BUENO et al. 2015).

Kratki odčitki pridobljeni s sekvenciranjem na platformi Illumina nam lahko podajo omejeno količino informacij o taksonomski sestavi virusne skupnosti, saj številni odčitki pripadajo zelo divergentnim regijam virusnih genomov, ki imajo nizko podobnost s tistimi, ki so na voljo v bazah podatkov. Drugačen vpogled lahko dobimo, če odčitke sestavimo v daljša zaporedja, ki jim lahko bolj zanesljivo določimo podobnost z že znanimi virusnimi zaporedji, jih taksonomsko klasificiramo in vključimo v filogenetsko analizo. Pogosto pa so nekatera virusna zaporedja, kljub temu, da predstavljajo skoraj celoten virusni genom, tako drugačna od znanih virusnih zaporedij, da jih ne moremo uvrstiti v nobeno znano virusno družino (RASTROJO & ALCAMÍ 2017).



Slika 3: Klasifikacija odčitkov pridobljenih z viromsko analizo vzorcev slovenskih ledenikov v različne virusne svetove. Identifikacijske oznake lokacij vzorčenja so razložene v Preglednici 1.

Figure 3: Classification of reads obtained from viromic analysis of Slovenian glacier samples into different viral realms. Identification labels for sampling locations are explained in Table 1.



Slika 4: Virusne družine iz sveta *Riboviria* (v vrsticah) zaznane v vzorcih slovenskih ledenikov (v stolpcih) na podlagi analize odčitkov. Predstavljeni so odstotki odčitkov klasificiranih v virusne družine znotraj sveta *Riboviria* glede na število vseh odčitkov pridobljenih pri sekvenciranju posameznih vzorcev. Barvna intenzivnost odraža logaritmično transformirane vrednosti. Imena družin virusov na levi so združena v skladu s kategorijami gostiteljev.

Figure 4: Viral families from the realm *Riboviria* (in lines) detected in Slovenian glacier samples (in columns) based on reads analysis. The percentage of reads classified into viral families within the realm *Riboviria* are presented according to the number of all reads obtained by sequencing of individual Slovenian glacier samples. Color intensity reflects logarithmically transformed values. Viral family names on the left are grouped according to the host-based categories.

## Analiza izbranih RNA virusnih sestavljenih zaporedij in rezultati filogenetskih analiz

V vzorcih analiziranih ledenikov se je število sestavljenih zaporedij gibalo med 18.966 in 116.375. Zaporedja smo taksonomsko določili z analizo s programoma DIAMOND in MEGAN ter tako zaznali od 887 do 2.912 virusnih sestavljenih zaporedij na vzorec. V vseh vzorcih Triglavskega ledenika smo zaznali sestavljena zaporedja, ki so se klasificirale znotraj RNA virusnih družin *Leviviridae*, *Narnaviridae* in *Solemoviridae*. V vseh vzorcih ledenika pod Skuto pa zaporedja, ki so se klasificirala znotraj RNA virusnih družin *Totiviridae*, *Endornaviridae*, *Mitoviridae* in *Partitiviridae* (Priloga B). Številnim virusnim družinam sta se v posameznem ledeniškem vzorcu pripisala samo en ali dva sestavljena zaporedja. Za nadaljnje analize vzorcev Triglavskega ledenika smo izbrali sestavljena zaporedja, ki so se v analizi klasificirala kot pripadniki sveta *Riboviria* in so bila daljša od 3.000 nukleotidov (identificirali smo 29 takšnih zaporedij, Priloga A). Pri vzorcih ledenika pod Skuto pa smo v analizi vključili sestavljena zaporedja daljša od 1.000 nukleotidov (identificirali smo 19 takšnih virusnih zaporedij). Daljša virusna zaporedja so imela nizko podobnost z znanimi virusnimi zaporedji (Priloga A), kar je v skladu z že objavljenimi študijami (DE CÁRCER et al. 2015, 2016). Za sestavljena zaporedja iz vzorcev Triglavskega ledenika so bile identitete aminokislinskih zaporedij v primerjavi z najbolj podobnimi znanimi zaporedji med 27 % in 57 %, pri ledeniku pod Skuto pa med 24 % in 87 %. Nizke vrednosti identitet pridobljene v analizi BLASTx nakazujejo na to, da gre za zaporedja novih divergentnih virusov, ki se razlikujejo od zaporedij že objavljenih virusnih genomov. Najvišjo identiteto z znanimi zaporedji (87 %) smo določili zaporedju iz vzorca ledenika pod Skuto (zaporedje\_S1\_NODE2809, 2.579 nt). Analiza BLASTx je kot najbližji zadetek podala kratko zaporedje RdRp poimenovano *Riboviria* sp. (QRQ90237.1, 165 aa), ki so ga zaznali v raziskavi vodnih vzorcev iz pristanišč kitajske reke Jangce (LU et al. 2022).

Nekatera daljša virusna zaporedja bi lahko predstavljala skoraj celotne virusne genome, glede na to, da sta dolžina in genomska organizacija podobni znanim virusom, ki predstavljajo najboljše zadetke iz analize BLASTx. Na primer, najdaljše virusno sestavljeno zaporedje (zaporedje\_S2\_NODE85, 9.730 nt) je imelo glede na rezultate BLASTx najvišjo identiteto (28 %) z zaporedjem poliproteina, uvrščenega kot *Picornaviridae* sp. (URGI4946.1, 2622 aa), iz raziskave kopenskih RNA viromov na Kitajskem (CHEN et al. 2022). Največje število dolgih virusnih sestavljenih zaporedij, ki smo jih klasificirali znotraj sveta *Riboviria*, smo odkrili v vzorcu T3 (odkrili smo 15 takšnih virusnih zaporedij).

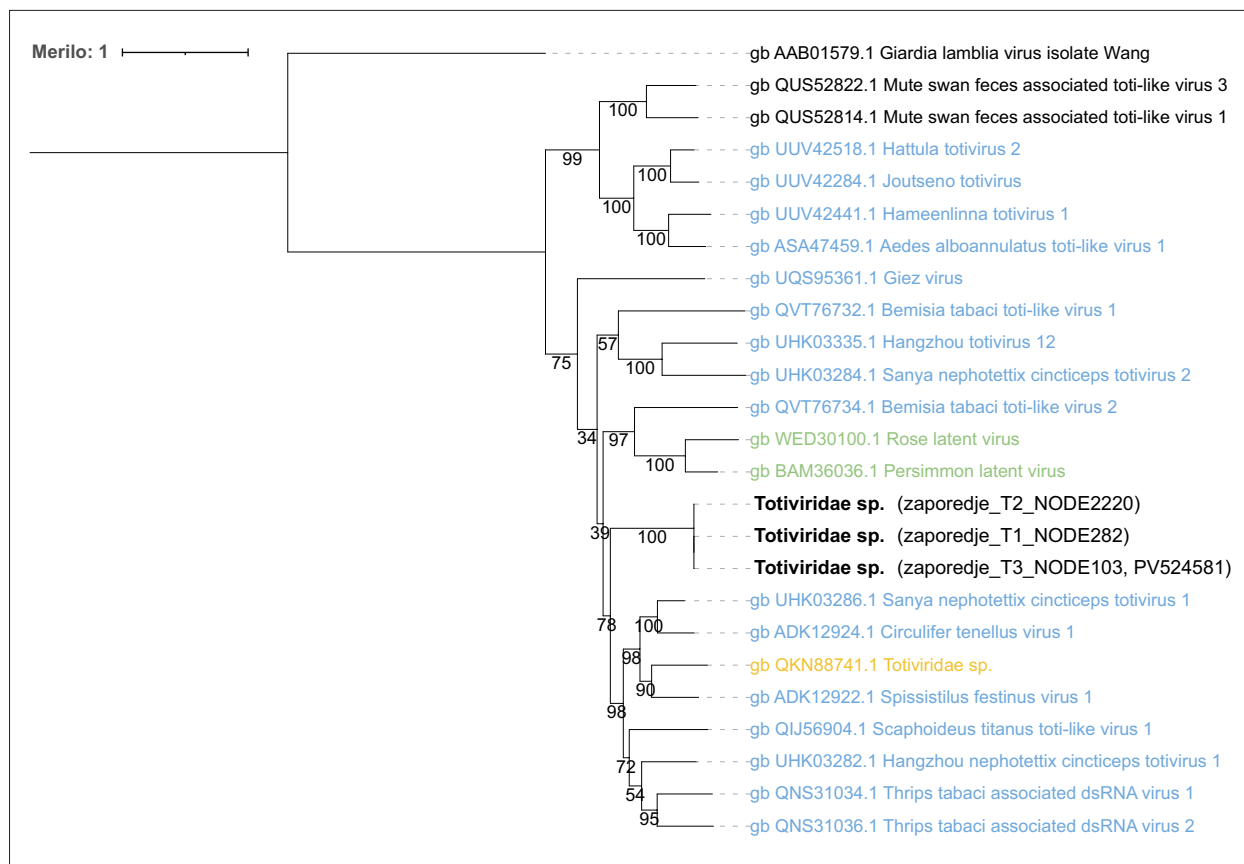
Nekaj sestavljenih zaporedij iz analiziranih vzorcev (zaporedje\_T1\_NODE249, zaporedje\_T3\_NODE81, zaporedje\_T3\_NODE208, zaporedje\_S1\_NODE6362 in zaporedje\_S2\_NODE1026) je imelo najvišjo identiteto z zaporedji, ki so jih Shi et al. (2016) pridobili pri preučevanju nevretenčarskih RNA viromov. To ne pomeni, da omenjena sestavljena zaporedja zagotovo pripadajo virusom nevretenčarjev, saj je določanje gostiteljev na podlagi metagenomskih študij težavno. Da bi dobili vpogled v sorodnost odkritih virusnih zaporedij z že znanimi virusi ter dodatno informacijo o možnih gostiteljskih organizmih, smo s filogenetskimi analizami analizirali dve skupini virusnih zaporedij, ki smo jih zaznali v različnih preučevanih vzorcih. V vzorcih Triglavskega ledenika smo odkrili skupino toti-podobnih virusnih zaporedij, v vzorcih ledenika pod Skuto pa picorna-podobna virusna zaporedja.

## Toti-podobna virusna zaporedja

Predstavniki virusne družine *Totiviridae* imajo dsRNA genome (dolge 4,6 - 7,0 kbp), ki vsebujejo dva bralna okvirja. Virusi te družine, ki jih uvrščamo v pet različnih rodov, so bili prvotno povezani z latentnimi okužbami gliv ali protistov (KING et al. 2011). Nedavno pa je bilo odkritih veliko toti-podobnih virusov iz vzorcev nevretenčarjev (npr. v vinskih mušicah, komarjih, mravljah in rakah). Nekateri novo opisani toti-podobni virusi imajo dodatne gene, ki so lahko posledica evolucijske prilagoditve na mehanizme za okuževanje in širjenje v omenjenih gostiteljih (SANDLUND et al. 2021). Predlaganih je bilo več novih rodov; *Artivirus* (pri členonožcih) (ZHAI et al. 2010), *Tricladivirus* (pri ploskih črvih) (BURROWS et al. 2020) in *Pistolvirus* (pri ribah) (SANDLUND et al. 2021), vendar se večina živalskih toti-podobnih virusov filogenetsko ne uvršča znotraj predlaganih rodov.

V analizi smo v vseh treh vzorcih Triglavskega ledenika zaznali toti-podobna sestavljena zaporedja in sicer naslednje: zaporedje\_T1\_NODE282 (4.073 nt), zaporedje\_T2\_NODE2220 (4.143 nt) in zaporedje\_T3\_NODE103, 7.306 nt). Ta tri sestavljena zaporedja so si bila na prekrivajočem delu nukleotidnega zaporedja podobne več kot 99,5 %. Analiza BLASTx je kot najboljši zadetek z identiteto 42,63 % podala RdRp zaporedje Hangzhou nephotettix cincticeps totivirusa 1, najdeno v riževi zeleni ščitkariki (*Nephotettix cincticeps*). Najdaljše toti-podobno zaporedje (zaporedje\_T3\_NODE103, 7.306, GenBank accesion: PV524581) vsebuje dva bralna okvirja in po dolžini ustreza celotni dolžini genoma.

V filogenetski analizi so se odkrita toti-podobna virusna zaporedja gručila s toti-podobnimi virusi, ki so glede na obstoječo literaturo povezani z žuželkami



Slika 5: Filogenetsko drevo zgrajeno po metodi največjega verjetja za toti-podobna virusna zaporedja najdena v vzorcih Triglavskega ledenika. Osnova je poravnava virusnih sestavljenih zaporedij, ki so bila z analizo BLASTx najbolj podobne »Hangzhou *nephotettix cincticeps* totivirus 1« (UHK03282.1) ter drugih najbolj sorodnih zaporedij. Izbrana virusna zaporedja vsebujejo zaporedja klasificirana kot od RNA odvisna polimeraza (RdRp). Za koreninjenje drevesa smo uporabili zunanjo skupino (virusno zaporedje »*Giardia lamblia* virus isolate Wang«). Virusna zaporedja pridobljena iz vzorcev Triglavskega ledenika so označena odebeljeno. Številke ob vejah predstavljajo statistično podporo skupin, pridobljeno z metodo zanka; dolžine vej pa predstavljajo povprečno število aminokislinskih zamenjav na mesto. Legenda predstavlja povezavo posameznih virusnih zaporedij z izvirnim materialom.

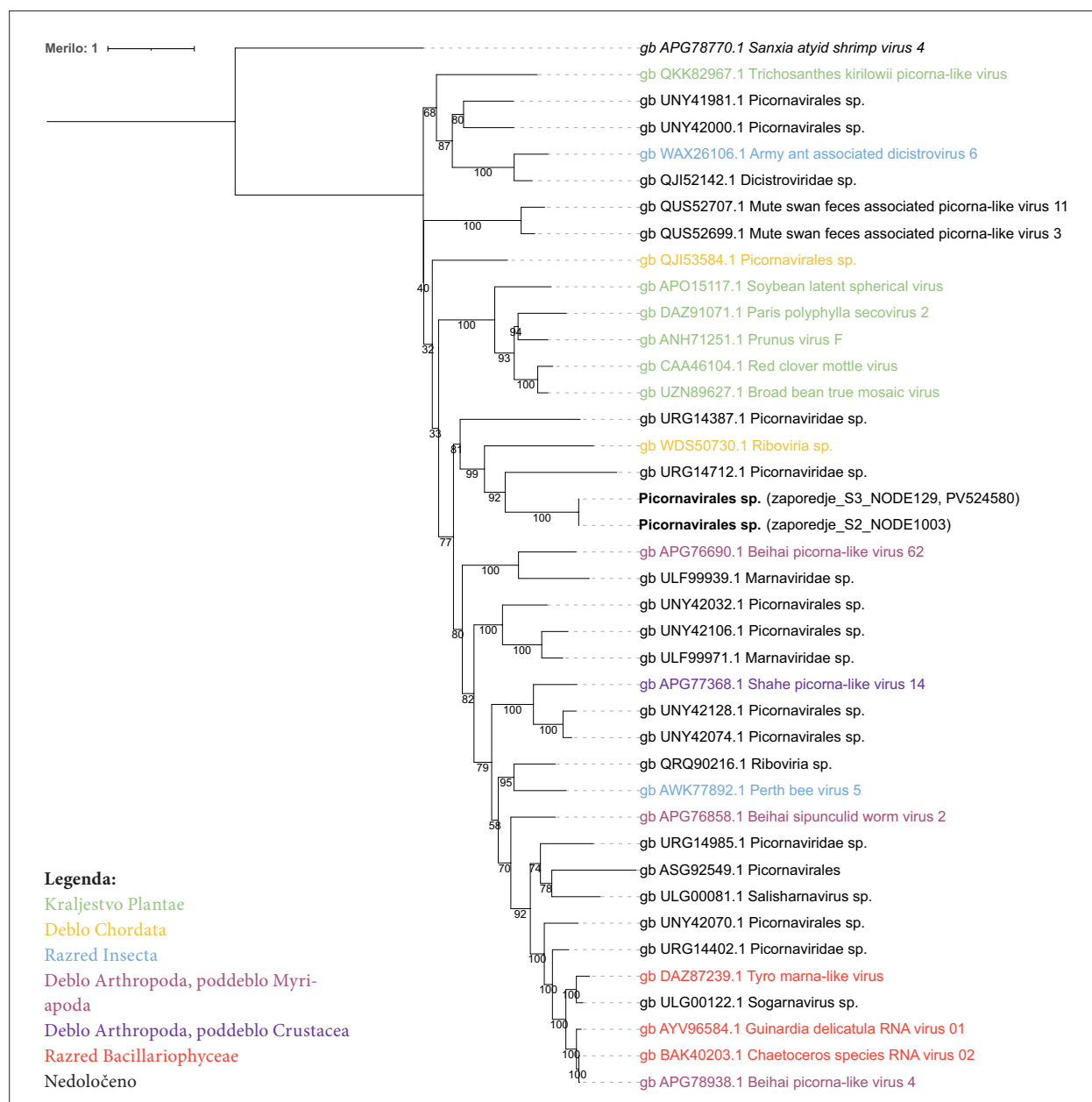
Figure 5: Maximum likelihood phylogenetic tree created for toti-like viral sequences found in samples from Triglav Glacier. The tree is based on an alignment of viral contigs that showed the highest similarity to "Hangzhou *Nephotettix cincticeps* totivirus 1" (UHK03282.1) in the BLASTx analysis, as well as other closely related sequences. The selected viral sequences include those classified as encoding RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). The tree was rooted using an outgroup sequence ("*Giardia lamblia* virus isolate Wang"). Viral sequences obtained from Triglav Glacier samples are marked in bold. Numbers on branches represent bootstrap support values, and branch lengths indicate the average number of amino acid substitutions per site. The legend shows the association between individual viral sequences and their source material.

(Slika 5). *Scaphoideus titanus* toti-like virus 1 so našli v fitoplazemskem vektorju *Scaphoideus titanus* (OTTATI et al. 2020), *Thrips tabaci* associated dsRNA virus 1 so našli v tobakovem resarju (CHIAPELLO et al. 2021) in *Spissistilus festinus* virus 1 ter *Circulifer tenellus* virus 1 v gostiteljih iz rodu stenice (SPEAR et al. 2010). Zaporedja zaznana v vzorcih Triglavskega ledenika in pa genomi omenjenih znanih virusov kodirajo protein bogat z pro-

linom in alaninom (eng. proline-alanine rich protein, PARp) ter RdRp.

### Picorna-podobna virusna zaporedja

Predstavniki virusnih družin znotraj redu *Picornavirales* so majhni virusi ikozaedrične oblike s ssRNA geno-



Slika 6: Filogenetsko drevo zgrajeno po metodi največjega verjetja za picorna-podobna virusna zaporedja najdena v vzorcih ledenika pod Skuto. Osnova je poravnava virusnih sestavljenih zaporedij, ki so bile z analizo BLASTx najbolj podobne zaporedju uverščenem kot Picornaviridae sp. (URG14712.1). Izbrana virusna zaporedja vsebujejo zaporedja klasificirana kot RdRp. Za koreninjenje drevesa smo uporabili zunanjo skupino (virusno zaporedje »Sanxia atyid shrimp virus 4«). Virusna zaporedja izolirana iz vzorcev ledenika pod Skuto so označena odebeljeno. Številke ob vejah predstavljajo statistično podporo skupin, pridobljeno z metodo zankanja; dolžine vej pa predstavljajo povprečno število aminokislinskih zamenjav na mesto. Legenda predstavlja povezavo posameznih virusnih zaporedij z gostiteljskimi organizmi oziroma izvornim materialom.

Figure 6: Maximum likelihood phylogenetic tree constructed for picorna-like viral sequences identified in samples from the glacier below Mount Skuta. The tree is based on an alignment of viral contigs that showed the highest similarity in the BLASTx analysis to a sequence named Picornaviridae sp. (URG14712.1). The selected viral sequences include those classified as encoding RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). The tree was rooted using an outgroup sequence ("Sanxia atyid shrimp virus 4"). Viral sequences isolated from the Skuta Glacier samples are indicated in bold. Numbers next to the branches represent statistical support values obtained through bootstrapping, while branch lengths indicate the average number of amino acid substitutions per site. The legend links individual viral sequences to their host organisms or source material.

mi. Okužujejo zelo različne gostitelje vključno z vretenčarji (družina *Picornaviridae*), višjimi rastlinami (družina *Secoviridae*), nevretenčarji (družini *Dicistroviridae* in *Flaviridae*) ter protisti (družina *Marnaviridae*) (KING et al. 2011). Kljub različnim gostiteljem in številnim razlikam v strukturi genoma imajo vsi predstavniki redu *Picornavirales* in mnogi še neklasificirani picorna-podobni virusi skupni nabor filogenetsko sorodnih proteinov (ZELL et al. 2022).

V analizi smo v dveh vzorcih ledenika pod Skuto zaznali picorna-podobna virusna sestavljena zaporedja in sicer: zaporedje\_S2\_NODE1003 (2.686 nt) in zaporedje\_S3\_NODE129 (8.375 nt), ki sta si bili na prekrivajočem delu nukleotidnega zaporedja podobni več kot 99,8 %. Analiza BLASTx je kot najboljši zadetek z identiteto 29,74 % (zaporedje\_S2\_NODE1003) in 27,38 % (zaporedje\_S3\_NODE129) podala zaporedje RdRp uvrščeno kot *Picornaviridae* sp. (URG14712.1, 1841 aa), ki izvira iz metagenoma sedimenta (CHEN et al. 2022). Na podlagi dolžine genomov znanih picorna-podobnih virusov sklepamo, da eno izmed sestavljenih zaporedij

(zaporedje\_S3\_NODE129, 8.375 nts, GenBank accesson: PV524580) predstavljala celoten virusni genom.

V filogenetski analizi sta bili picorna-podobni zaporedji iz vzorcev ledenika pod Skuto najbolj sorodni z zaporedji, ki so jih odkrili v treh metagenomskih študijah: študiji kopenskih RNA viromov na Kitajskem (CHEN et al. 2022), študiji picorna-podobnih virusov v nemški reki Havel (ZELL et al. 2022) in v študiji virusov pri pticah iz divjine in živalskega vrta na Kitajskem (DAI et al. 2023) (Slika 6). V filogenetsko analizo picorna-podobnih zaporedij smo vključili številna virusna zaporedja, ki so bila pridobljena iz metagenomskih študij okoljskih vzorcev. Pri teh raziskavah gostitelji virusov pogosto niso znani oziroma obstaja določena mera negotovosti glede določitve resničnega gostitelja – na primer, ali so živali, pri katerih so viruse zaznali, res njihovi gostitelji, ali pa so ti virusi povezani z mikrobiomom teh živali. To poudarja potrebo po nadaljnjih raziskavah, ki bi razjasnile povezavo novo odkritih virusov z njihovimi gostitelji in ekološko vlogo picorna-podobnih virusov v različnih okoljih.

## ZAKLJUČKI

V okviru raziskave smo iz vzorcev Triglavskega ledenika in ledenika pod Skuto po koncentriranju vzorcev uspešno izolirali nukleinske kisline, jih pomnožili in analizirali z uporabo netarčnega sekvenciranja na platformi Illumina. Kljub pričakovano nizkemu številu odčitkov, ki jih je bilo mogoče zanesljivo klasificirati kot virusna zaporedja, so vzorci slovenskih ledenikov razkrili prisotnost nukleinskih kislin, pripadajočih različnim virusnim svetovom in družinam. Ta raznolikost nakazuje, da ledeniški habitati, čeprav izrazito neprijazni za večino življenja, gostijo kompleksne virusne skupnosti. Čeprav je bil eksperimentalni pristop osredotočen na zaznavanje RNA virusov, so rezultati pokazali, da so bili v vzorcih najpogosteje prisotni odčitki, pripadajoči DNA bakteriofagom iz sveta *Duplodnaviria*, kar lahko kaže na prevladujočo mikrobo sestavo ledeniških ekosistemov. V manjšem obsegu so bili prisotni tudi RNA virusi iz sveta *Riboviria*, kot tudi predstavniki svetov *Monodnaviria* (ssDNA virusi) in *Varidnaviria*. Z nadaljnjo analizo daljših sestavljenih RNA virusnih zaporedij smo ugotovili, da imajo pridobljena zapo-

redja nizko podobnost s sekvencami znanih virusov (24 - 87 %), kar potrjuje domnevo o visoki neraziskanosti virusov v ledeniških okoljih ter kaže na prisotnost številnih do sedaj neznanih virusnih vrst. Z uporabo filogenetskih analiz smo podrobneje raziskali dve skupini virusnih zaporedij: toti-podobne RNA viruse, ki smo jih zaznali v vzorcih Triglavskega ledenika, ter picorna-podobne RNA viruse, ki so bili prisotni v vzorcih ledenika pod Skuto.

Ta raziskava predstavlja prvi vpogled v virom slovenskih ledenikov in s tem pomembno razširja obzorje razumevanja virusne raznolikosti v ledeniških ekosistemih. Glede na hitro krčenje ledenikov zaradi podnebnih sprememb, pridobljeni podatki predstavljajo dragocen prispevek k razumevanju biotske raznovrstnosti v teh habitatih. Nadaljnje raziskave virusov v ledenikih bi lahko osvetlile njihove interakcije z mikrobnimi gostitelji, njihov pomen v evlucijskem kontekstu ter ekološko vlogo ledeniških virusov, vključno z vplivom na strukturo in dinamiko mikrobnih skupnosti v ledenikih in kroženje snovi, kar je še posebej za RNA viruse slabo raziskano.

## SUMMARY

We successfully isolated nucleic acids from samples collected from the Triglav Glacier and the glacier beneath

Skuta, following sample concentration. The nucleic acids were amplified and analyzed using shotgun sequencing

on the Illumina platform. In total, the six glacier samples and two negative controls yielded 34.3 gigabases of sequencing data, with read counts per sample ranging from 19 to 34 million and an average read length of 143 nucleotides. Using the DIAMOND and MEGAN tools, we identified between 36,000 and 162,000 viral reads per sample, representing 0.12 % to 0.49 % of the total reads. Despite the expectedly low number of reliably classifiable viral sequences, the samples from Slovenian glaciers revealed the presence of nucleic acids belonging to various viral realms and families. This diversity indicates that glacier habitats—although extremely inhospitable to most life—harbor complex viral communities. Although our experimental approach focused on the detection of RNA viruses, the most frequently detected reads belonged to DNA bacteriophages from the realm *Duplodnaviria*, likely reflecting the dominant microbial composition of glacier ecosystems. To a lesser extent, RNA viruses from the realm *Riboviria*, as well as representatives of *Monodnaviria* (ssDNA viruses) and *Varidnaviria*, were also present. Further analysis of longer assembled RNA viral contigs using BLASTx revealed that the obtained sequences had low similarity to known viruses. Amino acid sequence identities compared to the

closest known references ranged from 24 % to 87 %, supporting the hypothesis of a largely unexplored virosphere in glacial environments and indicating the presence of numerous previously unknown viral species. Using phylogenetic analyses, we further investigated two groups of viral sequences: toti-like RNA viruses detected in the Triglav Glacier samples and picorna-like RNA viruses found in the Skuta Glacier samples.

This research provides the first insight into the virome of Slovenian glaciers and significantly expands our understanding of viral diversity in glacial ecosystems. In addition to documenting the presence of numerous potentially novel viruses, it highlights the methodological challenges of studying viral communities in low-biomass environments. Given the rapid retreat of glaciers due to climate change, the data offers a valuable contribution to understanding biodiversity in these habitats. Further research on viruses in glaciers could shed light on their interactions with microbial hosts, their significance in an evolutionary context, and the ecological roles of glacial viruses — including their impact on the structure and dynamics of microbial communities in glaciers and on nutrient cycling — which remain particularly poorly explored for RNA viruses.

## ZAHVALA

Delo je financirala Agencija RS za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost (ARIS), v okviru raziskovalnega programa št. P4-0407.

|                                                |                                      |                                          | Rezultati BLASTx                                                             |
|------------------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| Identifikacijske oznake sestavljenih zaporedij | Dolžina sestavljenega zaporedja [nt] | Število odčitkov, ki pokrivajo zaporedje | Znanstveno ime                                                               |
| zaporedje_T1_NODE221                           | 4.703                                | 5826                                     | hipotetični protein 1 [ssRNA positive-strand virus sp.]                      |
| zaporedje_T1_NODE282                           | 4.073                                | 1276                                     | RdRp [Hangzhou nephotettix cinctineps totivirus 1]                           |
| zaporedje_T1_NODE256                           | 4.278                                | 325                                      | nestrukturni protein 1b [Stellavirales sp.]                                  |
| zaporedje_T1_NODE62                            | 9.138                                | 3085                                     | domnevni poliprotein [Picornavirales]                                        |
| zaporedje_T1_NODE249                           | 4.376                                | 4357                                     | hipotetični protein 3 [Hubei sobemo-like virus 2]                            |
| zaporedje_T2_NODE1923                          | 4.484                                | 268                                      | RdRp [Enontekio yuevirus]                                                    |
| zaporedje_T2_NODE2220                          | 4.143                                | 2793                                     | RdRp [Hangzhou nephotettix cincticeps totivirus 1]                           |
| zaporedje_T2_NODE4122                          | 3.007                                | 390                                      | protein bogat z prolinom in alaninom [Scaphoideus titanus toti-like virus 1] |
| zaporedje_T2_NODE4073                          | 3.024                                | 260                                      | protein A RdRp [Nodaviridae sp.]                                             |
| zaporedje_T2_NODE1229                          | 5.578                                | 1528                                     | hipotetični protein [Nelson Astrovirus-like 1]                               |
| zaporedje_T2_NODE470                           | 8.978                                | 2798                                     | domnevni poliprotein [Picornavirales sp.]                                    |
| zaporedje_T2_NODE572                           | 8.229                                | 4771                                     | kapsularni protein [Picornaviridae sp.]                                      |
| zaporedje_T2_NODE2032                          | 4.342                                | 1680                                     | hipotetični protein [Tombusviridae sp.]                                      |
| zaporedje_T2_NODE448                           | 9.111                                | 6863                                     | ORF1 [Ngewotan negevirus]                                                    |
| zaporedje_T3_NODE103                           | 7.306                                | 6331                                     | RdRp [Hangzhou nephotettix cincticeps totivirus 1]                           |
| zaporedje_T3_NODE203                           | 5.087                                | 445                                      | nestrukturni poliprotein [Hepelivirales sp.]                                 |
| zaporedje_T3_NODE84                            | 8.200                                | 856                                      | poliprotein [Hypera postica associated iflavirus 1]                          |
| zaporedje_T3_NODE86                            | 8.149                                | 2135                                     | nestrukturni poliprotein [Arabidopsis halleri dicistro-like virus 1]         |
| zaporedje_T3_NODE392                           | 3.353                                | 1111                                     | RdRp [Leviviridae sp.]                                                       |
| zaporedje_T3_NODE214                           | 4.854                                | 998                                      | poliprotein 2ab [Solemoviridae sp.]                                          |
| zaporedje_T3_NODE448                           | 3.115                                | 418                                      | domnevni poliprotein [Picornaviridae sp.]                                    |
| zaporedje_T3_NODE193                           | 5.192                                | 594                                      | RdRp [Riboviria sp.]                                                         |
| zaporedje_T3_NODE234                           | 4.600                                | 984                                      | domnevna RdRp [Narnaviridae sp.]                                             |
| zaporedje_T3_NODE81                            | 8.346                                | 615                                      | hipotetični protein [Beihai picorna-like virus 57]                           |
| zaporedje_T3_NODE208                           | 4.974                                | 1323                                     | poliprotein [Beihai zhaovirus-like virus 1]                                  |
| zaporedje_T3_NODE68                            | 9.262                                | 326                                      | ORF 1 [Ngewotan negevirus]                                                   |
| zaporedje_T3_NODE218                           | 4.752                                | 4385                                     | hipotetični protein [Narnaviridae sp.]                                       |
| zaporedje_T3_NODE293                           | 4.050                                | 1651                                     | domnevna RdRp [Tombusviridae sp.]                                            |
| zaporedje_S1_NODE14414                         | 1.201                                | 5294                                     | hipotetični protein [Hubei alphaflexivirus]                                  |
| zaporedje_S1_NODE16976                         | 1.121                                | 154                                      | domnevna RdRp [Partitiviridae sp.]                                           |
| zaporedje_S1_NODE21322                         | 1.018                                | 53                                       | plaščni protein [Erysiphe necator associated totivirus 5]                    |
| zaporedje_S1_NODE8994                          | 1.482                                | 124                                      | RdRp [Asopus mito-like virus]                                                |
| zaporedje_S1_NODE2809                          | 2.579                                | 232                                      | RdRp [Riboviria sp.]                                                         |
| zaporedje_S1_NODE7723                          | 1.596                                | 602                                      | hipotetični protein [Beihai picorna-like virus 97]                           |
| zaporedje_S1_NODE6362                          | 1.755                                | 309                                      | hipotetični protein [Changjiang crawfish virus 4]                            |
| zaporedje_S2_NODE1003                          | 2.686                                | 98                                       | RdRp [Picornaviridae sp.]                                                    |
| zaporedje_S2_NODE85                            | 9.730                                | 102                                      | poliprotein [Picornaviridae sp.]                                             |
| zaporedje_S2_NODE1751                          | 2.086                                | 16932                                    | RdRp A [Nodaviridae sp.]                                                     |
| zaporedje_S2_NODE2437                          | 1.813                                | 62                                       | RdRp [Flumine sobemo-like virus 7]                                           |
| zaporedje_S2_NODE7277                          | 1.094                                | 84                                       | domnevna RdRp [Sanya botourmia-like virus 12]                                |
| zaporedje_S2_NODE1026                          | 2.657                                | 27                                       | hipotetični protein 1 [Beihai picorna-like virus 64]                         |
| zaporedje_S2_NODE1180                          | 2.488                                | 252                                      | hipotetični protein [Riboviria sp.]                                          |
| zaporedje_S2_NODE2878                          | 1.670                                | 200                                      | hipotetični protein 2 [Sichuan sediment noda-like virus 6]                   |
| zaporedje_S3_NODE9717                          | 1.383                                | 233                                      | RdRp [Bolbocoleon piliferum mito-like virus]                                 |
| zaporedje_S3_NODE4353                          | 2.105                                | 51                                       | RdRp [Asopus mito-like virus]                                                |
| zaporedje_S3_NODE129                           | 8.375                                | 315                                      | RdRp [Picornaviridae sp.]                                                    |
| zaporedje_S3_NODE11337                         | 1.261                                | 6963                                     | hipotetični protein [Pseudoglobivirus]                                       |

\* število prekrivajočih se aminokislin/dolžina aminokislinskega zaporedja najbližjega zadetka (odstotek identitete)

\* number of matching amino acids/number of total amino acids of the closest protein hit (percentage of amino acid identity)

|  | E-vrednost                | Identiteta*    | Številka NCBI vnosa |
|--|---------------------------|----------------|---------------------|
|  | 1,00 x 10 <sup>-83</sup>  | 178/497 (36%)  | QVG74697.1          |
|  | 2,00 x 10 <sup>-169</sup> | 180/499 (36%)  | UHK03282.1          |
|  | 3,00 x 10 <sup>-15</sup>  | 83/310 (27%)   | WAY16543.1          |
|  | 0                         | 496/1222 (41%) | ULF99687.1          |
|  | 2,00 x 10 <sup>-15</sup>  | 85/278 (31%)   | APG75904.1          |
|  | 0                         | 371/1045 (36%) | UYE93960.1          |
|  | 3,00 x 10 <sup>-169</sup> | 321/753 (43%)  | UHK03282.1          |
|  | 6,00 x 10 <sup>-66</sup>  | 203/717 (28%)  | QIJ56905.1          |
|  | 4,00 x 10 <sup>-67</sup>  | 245/844 (29%)  | QGL06818.1          |
|  | 0                         | 469/1401 (33%) | QZZ63399.1          |
|  | 0                         | 496/1222 (41%) | ULF99687.1          |
|  | 3,00 x 10 <sup>-47</sup>  | 189/706 (27%)  | URG14713.1          |
|  | 6,00 x 10 <sup>-30</sup>  | 122/377 (32%)  | UHS72369.1          |
|  | 2,00 x 10 <sup>-106</sup> | 318/1046 (30%) | QIH12214.1          |
|  | 9,00 x 10 <sup>-163</sup> | 321/753 (43%)  | UHK03282.1          |
|  | 3,00 x 10 <sup>-169</sup> | 369/1138 (32%) | WAY16518.1          |
|  | 0                         | 841/2651 (32%) | QUS52852.1          |
|  | 0                         | 597/1549 (39%) | DAZ89854.1          |
|  | 0                         | 320/559 (57%)  | URG15442.1          |
|  | 8,00 x 10 <sup>-59</sup>  | 147/404 (36%)  | QXV86403.1          |
|  | 7,00 x 10 <sup>-90</sup>  | 165/309 (53%)  | ULF99687.1          |
|  | 5,00 x 10 <sup>-74</sup>  | 176/484 (36%)  | QDH88311.1          |
|  | 2,00 x 10 <sup>-29</sup>  | 176/639 (28%)  | UJQ92819.1          |
|  | 0                         | 861/2396 (36%) | APG76773.1          |
|  | 1,00 x 10 <sup>-24</sup>  | 111/356 (31%)  | APG78145.1          |
|  | 2,00 x 10 <sup>-106</sup> | 318/1046 (30%) | QIH12214.1          |
|  | 3,00 x 10 <sup>-38</sup>  | 121/347 (35%)  | UJQ92733.1          |
|  | 1,00 x 10 <sup>-53</sup>  | 135/368 (37%)  | USC30226.1          |
|  | 4,00 x 10 <sup>-126</sup> | 183/358 (51%)  | QYF50141.1          |
|  | 2,00 x 10 <sup>-19</sup>  | 51/138 (37%)   | USE08318.1          |
|  | 3,00 x 10 <sup>-127</sup> | 178/262 (68%)  | QJW70334.1          |
|  | 3,00 x 10 <sup>-71</sup>  | 163/443 (37%)  | DAZ87262.1          |
|  | 1,00 x 10 <sup>-65</sup>  | 122/141 (87%)  | QRQ90237.1          |
|  | 9,00 x 10 <sup>-46</sup>  | 119/412 (29%)  | APG78902.1          |
|  | 1,00 x 10 <sup>-25</sup>  | 114/482 (24%)  | APG77911.1          |
|  | 4,00 x 10 <sup>-52</sup>  | 163/548 (30%)  | URG14712.1          |
|  | 2,00 x 10 <sup>-169</sup> | 430/1529 (28%) | URG14946.1          |
|  | 5,00 x 10 <sup>-53</sup>  | 159/511 (31%)  | QGL06818.1          |
|  | 7,00 x 10 <sup>-32</sup>  | 120/379 (32%)  | UQB76119.1          |
|  | 1,00 x 10 <sup>-46</sup>  | 120/360 (33%)  | UUW21031.1          |
|  | 3,00 x 10 <sup>-21</sup>  | 73/287 (25%)   | APG76815.1          |
|  | 0                         | 300/693 (43%)  | QRQ90169.1          |
|  | 2,00 x 10 <sup>-21</sup>  | 65/225 (29%)   | QYF49936.1          |
|  | 1,00 x 10 <sup>-113</sup> | 196/439 (45%)  | CAH2951190.1        |
|  | 5,00 x 10 <sup>-84</sup>  | 185/534 (35%)  | DAZ87262.1          |
|  | 2,00 x 10 <sup>-89</sup>  | 351/1282 (27%) | URG14712.1          |
|  | 5,00 x 10 <sup>-30</sup>  | 89/348 (26%)   | DAZ87741.1          |

← Priloga A: izbranih daljših virusnih sestavljenih zaporedij iz sveta Riboviria iz vzorcev slovenskih ledenikov  
Appendix A: of selected longer viral contigs from the realm Riboviria from Slovenian glacier samples

↓ Priloga B: Virusne družine zaznane v vzorcih slovenskih ledenikov na podlagi analize sestavljenih zaporedij. Predstavljena so števila zaporedij klasificiranih v virusne družine iz sveta Riboviria. Identifikacijske oznake vzorcev so razložene v Preglednici 1.

Appendix B: Viral families detected in Slovenian glacier samples based on analysis of contig sequences. The numbers of contigs classified into viral families from the realm Riboviria are presented. Sample identification codes are explained in Table 1.

| Virusne družine iz sveta Riboviria | T1 | T2 | T3 | S1 | S2 | S3 |
|------------------------------------|----|----|----|----|----|----|
| Birnaviridae                       | 1  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| Chrysoviridae                      | 0  | 0  | 0  | 1  | 0  | 0  |
| Totiviridae                        | 1  | 0  | 0  | 1  | 1  | 1  |
| Cystoviridae                       | 0  | 1  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| Endornaviridae                     | 0  | 2  | 1  | 3  | 1  | 2  |
| Virgaviridae                       | 1  | 0  | 2  | 0  | 0  | 0  |
| Nodaviridae                        | 0  | 1  | 0  | 0  | 1  | 0  |
| Luteoviridae                       | 0  | 0  | 0  | 0  | 1  | 0  |
| Tombusviridae                      | 0  | 1  | 2  | 0  | 0  | 0  |
| Leviviridae                        | 2  | 4  | 4  | 2  | 0  | 2  |
| Narnaviridae                       | 2  | 4  | 1  | 0  | 9  | 0  |
| Mitoviridae                        | 0  | 0  | 0  | 3  | 1  | 3  |
| Botourmiaviridae                   | 0  | 0  | 0  | 0  | 2  | 0  |
| Chuviridae                         | 0  | 1  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| Peribunyaviridae                   | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 1  |
| Partitiviridae                     | 2  | 0  | 3  | 4  | 5  | 1  |
| *Picobirnaviridae                  | 8  | 15 | 12 | 8  | 20 | 0  |
| Dicistroviridae                    | 1  | 1  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| Iflaviridae                        | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 1  |
| Marnaviridae                       | 0  | 0  | 0  | 0  | 1  | 0  |
| Picornaviridae                     | 2  | 2  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| Secoviridae                        | 0  | 0  | 0  | 0  | 1  | 0  |
| Barnaviridae                       | 1  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| Solemoviridae                      | 2  | 2  | 1  | 0  | 2  | 0  |
| Astroviridae                       | 0  | 2  | 1  | 0  | 0  | 0  |
| Retroviridae                       | 1  | 0  | 1  | 1  | 0  | 0  |

\* napaka pri klasifikaciji

\* classification error

LITERATURA  
REFERENCES

- ADRIAENSSENS, E M, KRAMER, R, VAN GOETHEM, M W, MAKHALANYANE, T P, HOGG, I, & COWAN, D A 2017: *Environmental drivers of viral community composition in Antarctic soils identified by viromics*. Microbiome, 5(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0301-7>
- ANESIO, A M, & LAYBOURN-PARRY, J 2012: *Glaciers and ice sheets as a biome*. Trends in Ecology and Evolution, 27(4), 219–225. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.09.012>
- BACNIK, K, KUTNJAK, D, PECMAN, A, MEHLE, N, TUSEK ZNIDARIC, M, GUTIERREZ AGUIRRE, I, & RAVNIKAR, M 2020: *Viromics and infectivity analysis reveal the release of infective plant viruses from wastewater into the environment*. Water Research, 177, 115628. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115628>
- BANKEVICH, A, NURK, S, ANTIPOV, D, GUREVICH, A A, DVORKIN, M, KULIKOV, A S, LESIN, V M, NIKOLENKO, S I, PHAM, S, PRJIBELSKI, A D, PYSHKIN, A V, SIROTKIN, A V, VYAHHI, N, TESLER, G, ALEKSEYEV, M A, & PEVZNER, P A 2012: *SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing*. Journal of Computational Biology, 19(5), 455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- BELLAS, C M, & ANESIO, A M 2013: *High diversity and potential origins of T4-type bacteriophages on the surface of Arctic glaciers*. Extremophiles, 17(5), 861–870. <https://doi.org/10.1007/s00792-013-0569-x>
- BENN, D, & EVANS, D J A 2014: *Glaciers and Glaciation*, Second Edition, 1–802. <https://doi.org/10.4324/9780203785010>
- JARČIČ, M. 2021: *Osamitev in identifikacija psihrofilnih in psihrotolerantnih bakterij in gliv iz Triglavskega ledenika in ledenika pod Skuto*. Biotehniška fakulteta. Univerza v Ljubljani. <https://dk.um.si/IzpisGradiva.php?id=78707>
- BUCHFINK, B., XIE, C., & HUSON, D. H. 2015: *Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND*. Nature Methods, 12(1). <https://doi.org/10.1038/nmeth.3176>
- BURROWS, J. T. A., DEPIERREUX, D., NIBERT, M. L., & PEARSON, B. J. 2020: *A Novel Taxon of Monosegmented Double-Stranded RNA Viruses Endemic to Triclad Flatworms*. Journal of Virology, 94(22). <https://doi.org/10.1128/JVI.00623-20>
- CAPELLA-GUTIÉRREZ, S., SILLA-MARTÍNEZ, J. M., & GABALDÓN, T. 2009: *trimAl: A tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses*. Bioinformatics, 25(15), 1972–1973. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp348>
- CHARON, J., MARCELINO, V. R., WETHERBEE, R., VERBRUGGEN, H., & HOLMES, E. C. 2020: *Meta-transcriptomic detection of diverse and divergent RNA viruses in green and chlorarachniophyte algae*. Viruses, 1–54. <https://doi.org/10.3390/v12101180>
- CHEN, Y. M., SADIQ, S., TIAN, J. H., CHEN, X., LIN, X. D., SHEN, J. J., CHEN, H., HAO, Z. Y., WILLE, M., ZHOU, Z. C., WU, J., LI, F., WANG, H. W., YANG, W. D, XU, Q. Y., WANG, W., GAO, W. H., HOLMES, E. C., & ZHANG, Y. Z. 2022: *RNA viromes from terrestrial sites across China expand environmental viral diversity*. Nature Microbiology, 7(8), 1312–1323. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01180-2>
- CHIAPELLO, M., BOSCO, L., CIUFFO, M., OTTATI, S., SALEM, N., ROSA, C., TAVELLA, L., & TURINA, M. 2021: *Complexity and Local Specificity of the Virome Associated with Tospovirus-Transmitting Thrips Species*. Journal of Virology, 95(21), e00597-21. <https://doi.org/10.1128/JVI.00597-21>
- DAI, Z., WANG, H., WU, H., ZHANG, Q., JI, L., WANG, X., SHEN, Q., YANG, S., MA, X., SHAN, T., & ZHANG, W. 2023: *Parvovirus dark matter in the cloaca of wild birds*. GigaScience, 12, 1–10. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giad001>
- DE CÁRCER, D. A., LÓPEZ-BUENO, A., ALONSO-LOBO, J. M., QUESADA, A., & ALCAMÍ, A. (2016). *Metagenomic analysis of lacustrine viral diversity along a latitudinal transect of the Antarctic Peninsula*. FEMS Microbiology Ecology, 92(6), 1–10. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw074>
- DE CÁRCER, D. A., LÓPEZ-BUENO, A., PEARCE, D. A., & ALCAMÍ, A. 2015: *Biodiversity and distribution of polar freshwater DNA viruses*. Science Advances, 1(5). <https://doi.org/10.1126/sciadv.1400127>
- DEBEER, C. M., SHARP, M., & SCHUSTER-WALLACE, C. 2020: *Glaciers and Ice Sheets*. Encyclopedia of the World's Biomes: Volumes 1-5, 1-5, V4-182-V4-194. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.12441-8>
- DUDA, R. L., & TESCHKE, C. M. 2019: *The amazing HK97 fold: versatile results of modest differences*. Current Opinion in Virology, 36, 9–16. <https://doi.org/10.1016/J.COVIRO.2019.02.001>
- EDWARDS, A., PACHEBAT, J. A., SWAIN, M., HEGARTY, M., HODSON, A. J., IRVINE-FYNN, T. D. L., RASSNER, S. M. E., & SATTLER, B. 2013: *A metagenomic snapshot of taxonomic and functional diversity in an alpine glacier cryoconite ecosystem*. Environmental Research Letters, 8(3). <https://doi.org/10.1088/1748-9326/8/3/035003>

- FERNANDEZ-CASSI, X., TIMONEDA, N., MARTINEZ-PUCHOL, S., RUSINOL, M., RODRIGUEZ-MANZANO, J., FIGUEROLA, N., BOFILL-MAS, S., ABRIL, J. F., & GIRONES, R. 2018: *Metagenomics for the study of viruses in urban sewage as a tool for public health surveillance*. Science of the Total Environment, 618(8), 870–880. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.249>
- GUTIÉRREZ-AGUIRRE, I., KUTNJAK, D., RAČKI, N., RUPAR, M., & RAVNIKAR, M. 2018: *Monolith Chromatography as Sample Preparation Step in Virome Studies of Water Samples*. In V. PANTALEO & M. CHIUMENTI (Eds.), *Viral metagenomics : methods and protocols, (Methods in molecular biology)* (pp. 63–75). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7683-6\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7683-6_6)
- HILLMAN, B. I., & CAI, G. 2013: *The Family Narnaviridae. Simplest of RNA Viruses*. In *Advances in Virus Research* (1st ed., Vol. 86). Copyright &copy; 2013, Elsevier Inc. All Rights Reserved. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394315-6.00006-4>
- HODSON, A., ANESIO, A. M., TRANTER, M., FOUNTAIN, A., OSBORN, M., PRISCU, J., LAYBOURN-PARRY, J., & SATTLER, B. 2008: GLACIAL ECOSYSTEMS. *Ecological Monographs*, 78(1), 41–67. <https://doi.org/10.1890/07-0187.1>
- HUSON, D. H., BEIER, S., FLADE, I., GÓRSKA, A., & EL-HADIDI, M. 2016: *MEGAN Community edition - Interactive exploration and analysis of larges-scale microbiome sequencing data*. Plos Computational Biology, 12(6), 1–12. <https://doi.org/DOI:10.1371/journal.pcbi.1004957>
- KATOH, K., & STANDLEY, D. M. 2013: *MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability*. Molecular Biology and Evolution, 30(4), 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- KAZLAUSKAS, D., KOONIN, E. V., & KRUPOVIC, M. 2019: *Multiple origins of prokaryotic and eukaryotic single-stranded DNA viruses from bacterial and archaeal plasmids*. Nature Communications, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11433-0>
- KING, A. M. Q., ADAMS, M. J., CARSTENS, E. B., & LEFKOWITZ, E. J. 2011: *Virus taxonomy: Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses*. In *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier. <http://www.sciencedirect.com:5070/book/9780123846846/virus-taxonomy>
- KRUPOVIC, M., PRANGISHVILI, D., HENDRIX, R. W., & BAMFORD, D. H. 2011: *Genomics of Bacterial and Archaeal Viruses: Dynamics within the Prokaryotic Virosphere*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 75(4), 610–635. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00011-11>
- KUHN, J. H., GORBALENYA, A., KRUPOVIC, M., SIDELL, S., & VARSANI, A. 2017: *Establishing a single taxon that comprises RNA viruses at the basal rank of virus taxonomy*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.34193.94562>
- LAMBRECHT, A., & KUHN, M. 2007: *Glacier changes in the Austrian Alps during the last three decades, derived from the new Austrian glacier inventory*. Annals of Glaciology, 46, 177–184. <https://doi.org/10.3189/172756407782871341>
- LEFKOWITZ, E. J., DEMPSEY, D. M., HENDRICKSON, R. C., ORTON, R. J., SIDDELL, S. G., & SMITH, D. B. 2018: *Virus taxonomy : the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses ( ICTV )*. Nucleic Acids Research, 46, 708–717. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx932>
- LETUNIC, I., & BORK, P. 2021: *Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation*. Nucleic Acids Research, 49(W1), W293–W296. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB301>
- LIU, Y., JIAO, N., XU ZHONG, K., ZANG, L., ZHANG, R., XIAO, X., SHI, Y., ZHANG, Z., TAO, Y., BAI, L., GAO, B., YANG, Y., HUANG, X., JI, M., LIU, J., LIU, P., & YAO, T. 2023: *Diversity and function of mountain and polar supraglacial DNA viruses*. Science Bulletin, 68(20), 2418–2433. <https://doi.org/10.1016/J.SCIB.2023.09.007>
- LIU, Y., ZHANG, Z., JIAO, N., ZHU, Y., ZHANG, R., DOMINGUEZ-HUERTA, G., WANG, H., FENG, M., WEN, R., JI, M., ZHENG, Q., LIU, P., & YAO, T. 2024: *Diversity and ecological roles of RNA viral communities in the cryosphere of the Tibetan Plateau*. BioRxiv, 2024.08.30.610425. <https://doi.org/10.1101/2024.08.30.610425>
- LÓPEZ-BUENO, A., RASTROJO, A., PEIRÓ, R., ARENAS, M., & ALCAMÍ, A. 2015: *Ecological connectivity shapes quasiespecies structure of RNA viruses in an Antarctic lake*. Molecular Ecology, 24(19), 4812–4825. <https://doi.org/10.1111/MEC.13321>
- LÓPEZ-BUENO, A., TAMAMES, J., VELÁZQUEZ, D., MOYA, A., QUESADA, A., & ALCAMÍ, A. 2009: *High diversity of the viral community from an Antarctic lake*. Science, 326(5954), 858–861. <https://doi.org/10.1126/science.1179287>
- LU, J., YANG, S., ZHANG, X., TANG, X., ZHANG, J., WANG, X., WANG, H., SHEN, Q., & ZHANG, W. 2022: *Metagenomic analysis of viral community in the Yangtze River expands known eukaryotic and prokaryotic virus diversity in freshwater*. Virologica Sinica, 37(1), 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.virs.2022.01.003>
- NGUYEN, L. T., SCHMIDT, H. A., VON HAESELER, A., & MINH, B. Q. 2015: *IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies*. Molecular Biology and Evolution, 32(1), 268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>

- OTTATI, S., CHIAPELLO, M., GALETTO, L., BOSCO, D., MARZACHÌ, C., & ABBÀ, S. 2020: *New viral sequences identified in the flavescence dorée phytoplasma vector scaphoideus titanus*. *Viruses*, 12(3), 1–20. <https://doi.org/10.3390/v12030287>
- PAVŠEK., M. 2007: *Vpogled v Ledenik pod Skuto kot pokazatelj podnebnih sprememb v slovenskem delu Alp*. Dela 28, 207–219)
- PRADO, T., BRANDÃO, M. L., FUMIAN, T. M., FREITAS, L., CHAME, M., LEOMIL, L., MAGALHÃES, M. G. P., DEGRAVE, W. M. S., LEITE, J. P. G., & MIAGOSTOVICH, M. P. 2022: *Virome analysis in lakes of the South Shetland Islands, Antarctica*. *Science of the Total Environment*, 852(March), 158537. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158537>
- RAPER, S. C. B., & BRAITHWAITE, R. J. 2009: *Glacier volume response time and its links to climate and topography based on a conceptual model of glacier hypsometry*. *Cryosphere*, 3(2), 183–194. <https://doi.org/10.5194/TC-3-183-2009>
- RASSNER, S. M. E. 2017: Viruses in Glacial Environments. *Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology: Second Edition*, 111–131. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-57057-0\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-57057-0_6)
- RASTROJO, A., & ALCAMÍ, A. 2017: *Aquatic viral metagenomics: Lights and shadows*. *Virus Research*, 239, 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.11.021>
- ROSE, R., CONSTANTINIDES, B., TAPINOS, A., ROBERTSON, D. L., & PROSPERI, M. 2016: *Challenges in the analysis of viral metagenomes*. *Virus Evolution*, 2(2), 1–11. <https://doi.org/10.1093/ve/vew022>
- SANDLUND, L., MOR, S. K., SINGH, V. K., PADHI, S. K., PHELPS, N. B. D., NYLUND, S., & MIKALSEN, A. B. 2021: *Comparative molecular characterization of novel and known piscine toti-like viruses*. *Viruses*, 13(6), 1–20. <https://doi.org/10.3390/v13061063>
- SHI, M., LIN, X. D., TIAN, J. H., CHEN, L. J., CHEN, X., LI, C. X., QIN, X. C., LI, J., CAO, J. P., EDEN, J. S., BUCHMANN, J., WANG, W., XU, J., HOLMES, E. C., & ZHANG, Y. Z. 2016: *Redefining the invertebrate RNA virosphere*. *Nature*, 540(7634), 539–543. <https://doi.org/10.1038/nature20167>
- SPEAR, A., SISTERTON, M. S., YOKOMI, R., & STENGER, D. C. 2010: *Plant-feeding insects harbor double-stranded RNA viruses encoding a novel proline-alanine rich protein and a polymerase distantly related to that of fungal viruses*. *Virology*, 404(2), 304–311. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.05.015>
- TAMURA, K., STECHER, G., & KUMAR, S. 2021: MEGA11: *Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11*. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSAB120>
- VAINIO, E. J., CHIBA, S., GHABRIAL, S. A., MAISS, E., ROOSSINCK, M., SABANADZOVIC, S., SUZUKI, N., XIE, J., & NIBERT, M. 2018: ICTV virus taxonomy profile: Partitiviridae. *Journal of General Virology*, 99(1), 17–18. <https://doi.org/10.1099/JGV.0.000985/CITE/REFWORKS>
- WANG, D., URISMAN, A., LIU, Y., SPRINGER, M., KSIAZEK, T. G., ERDMAN, D. D., MARDIS, E. R., HICKENBOTHAM, M., MAGRINI, V., ELDRED, J., LATREILLE, J. P., WILSON, R. K., GANEM, D., & DERISI, J. L. 2003: *Viral discovery and sequence recovery using DNA microarrays*. *PLoS Biology*, 1(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0000002>
- WOO, A. C., GAIA, M., GUGLIELMINI, J., DA CUNHA, V., & FORTERRE, P. 2021: *Phylogeny of the Varidnaviria Morphogenesis Module: Congruence and Incongruence With the Tree of Life and Viral Taxonomy*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 704052. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.704052/BIBTEX>
- ZELL, R., GROTH, M., SELINKA, L., & SELINKA, H. C. 2022: *Picornavirus-like viruses of the Havel river, Germany*. *Frontiers in Microbiology*, 13(April). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.865287>
- ZHAI, Y., ATTOUL, H., JAAFAR, F. M., WANG, H. Q., CAO, Y. X., FAN, S. P., SUN, Y. X., LIU, L. D., MERTENS, P. P. C., MENG, W. S., WANG, D., & LIANG, G. 2010: *Isolation and full-length sequence analysis of Armigeres subalbatus totivirus, the first totivirus isolate from mosquitoes representing a proposed novel genus (Artivirus) of the family Totiviridae*. *Journal of General Virology*, 91(11), 2836–2845. <https://doi.org/10.1099/VIR.0.024794-0/CITE/REFWORKS>
- ZHAO, M., XU, L., BOWERS, H., & SCHOTT, E. J. 2022: *Characterization of Two Novel Toti-Like Viruses Co-infecting the Atlantic Blue Crab, Callinectes sapidus, in Its Northern Range of the United States*. *Frontiers in Microbiology*, 13, 855750. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.855750/BIBTEX>

# OBSEG OPRAVLJENIH DEL IN STROŠKOV OBNOVE GOZDOV S SAJENJEM IN SETVIJO TER UKREPOV VARSTVA PRED POŠKODBAMI PO DIVJADI V OBDOBJU 2007–2020

## THE EXTENT OF LABOUR AND COSTS OF FOREST RESTORATION WITH PLANTING, SOWING, AND PROTECTION MEASURES AGAINST GAME DAMAGES IN SLOVENIA IN THE PERIOD 2007-2020

Gregor BOŽIČ,<sup>1</sup> Marijana VIDRIH MINIČ,<sup>2</sup> Boris RANTAŠA,<sup>1</sup> Andrej BREZNIKAR<sup>2</sup>

<http://dx.doi.org/10.3986/fbg0117>

### IZVLEČEK

**Obseg opravljenih del in stroškov obnove gozdov s sajenjem in setvijo ter ukrepov varstva pred poškodbami po divjadi v obdobju 2007–2020**

V študiji smo analizirali obseg in stroške obnove gozdov s sajenjem in setvijo v Sloveniji za obdobje od 2007 do vključno 2020, ki jo je izvajal Zavod za gozdove Slovenije. V 14-letnem obdobju je ukrep sajenja potekal na 5.353 ha gozdnih površin, ukrep priprave tal za obnovo s sajenjem in setvijo na 3.489 ha površin, ukrep setve pa na 457 ha površin. Skupaj je bilo v Sloveniji obnovljene 0,5 % površine gospodarskih gozdov, kar v povprečju pomeni 0,04 % površine gospodarskih gozdov na leto. Pred divjadjo je bilo zaščitenih 61 % gozdnih površin, obnovljenih s sajenjem (približno 3.300 hektarov gozda). V tem obdobju je bilo za sadike porabljenih 9.457.562 EUR, od tega 66 % za listavce in 34 % za iglavce. V okviru obnove gozdov s sajenjem je bilo posajenih 6.176.099 sadik listavcev (51 %) in 5.913.388 sadik iglavcev (49 %), skupaj 12.089.487 dreves. V obdobju od leta 2007 do 2020 je bilo na celotnem območju Slovenije za vse ukrepe obnove gozdov s sajenjem in setvijo porabljenih 33.595.188 EUR, in sicer največ za sajenje (53 %) in varstvo pred divjadjo (42 %), za pripravo tal (4 %) in setev (1 %). V proučevanem obdobju je povprečna nabavna cena sadike klasične vzgoje (sadika z golo korenino) pri listavcih znašala 1,19 EUR, pri iglavcih pa 0,52 EUR, medtem ko je povprečna vrednost kontejnerske sadike listavcev znašala 1,96 EUR, kontejnerske sadike iglavcev pa 1,67 EUR. Primerjava med stroški obnove na površino, ki nastanejo pri obnovi s sajenjem, in stroški, ki nastanejo pri obnovi s setvijo za 14 gozdnogospodarskih območij skupaj v proučevanem ob-

### ABSTRACT

**The extent of labour and costs of forest restoration with planting, sowing, and protection measures against game damages in Slovenia in the period 2007-2020**

We analysed the scope and costs of forest restoration with planting and sowing in Slovenia for the period 2007 - 2020, which was carried out by the Slovenian Forest Service (SFS). In the 14-year period, forest restoration by planting seedlings was carried out on 5,353 ha of forest areas, the soil preparation for restoration with planting and sowing measure on 3,489 ha, and the sowing measure on 457 ha. In total, 0.5% of the area of managed forests was restored in Slovenia, which on average means 0.04% of the area of managed forests per year. 61% of the forest areas restored with planting (approximately 3,300 hectares of forest) were protected against game damage. During this period, €9,457,562 was spent on seedlings, of which 66% for broadleaves and 34% for conifers. Within the scope of forest restoration with planting, 6,176,099 broadleaf seedlings (51%) and 5,913,388 conifer seedlings (49%) were planted, for a total of 12,089,487 trees. In the period from 2007 to 2020, €33,595,188 was spent on artificial forest restoration measures across the entire territory of Slovenia, with the largest portion going to planting (53%) and protection against game damage (42%), followed by soil preparation (4%) and sowing (1%). In the period under review, the average purchase price (value) of a classic bare-root seedling was €1.19 for broadleaves and €0.52 for conifers, while the average value of a container seedling was €1.96 for broadleaves and €1.67 for conifers. A comparison between the per-hectare restoration costs incurred with planting and the costs incurred with sowing for 14 forest management regi-

<sup>1</sup> Gozdarski inštitut Slovenije, Večna pot 2, 1000 Ljubljana, gregor.bozic@gozdis.si

<sup>2</sup> Zavod za gozdove Slovenije, Večna pot 2, 1000 Ljubljana, andrej.breznikar@zgs.si

dobju, pokaže, da je strošek na hektar pri ukrepu sajenje bistveno večji (6.187 EUR / ha) od stroška na hektar pri ukrepu setev (1.036 EUR / ha).

*Ključne besede:* obnova gozda, gozdna površina, strošek, ukrep, sadika, sajenje, setev, varstvo pred divjadjo, ujma, Zavod za gozdove Slovenije

ons in the studied period shows that the cost per hectare for the planting measure is significantly higher (€6,187/ha) than the cost per hectare for the sowing measure (€1,036/ha).

*Key words:* forest restoration, forest area, measure, cost, seedling, planting, sowing, protection against game damage, natural disaster, Slovenia Forest Service

## 1 UVOD

Razvoj zelenih lastnosti dreves je odvisen od provenien- ce, rastišča in rastnega prostora ter s tem povezanih goz- dno gojitvenih ukrepov v razvoju gozdnega sestoja. Ob- nova gozda s sajenjem in setvijo je gojitveni ukrep, ki se izvaja predvsem na površinah, kjer naravna obnova ni mogoča ali ni dovolj učinkovita, zlasti pri velikopovršinskih sanacijah gozdov, poškodovanih zaradi naravnih ujm, ali na površinah, kjer naravna obnova ni v ce- loti uspela, ko sta zaradi različnih vzrokov onemogoče- na nasemenitev in vznik rastišču prilagojenim dreve- snim vrstam (GRECS 1996), pa tudi pri premenah spre- menjenih gozdov za izboljšanje stanja gozdnih habitatov in pri izboljšanju varovalnih in zaščitenih gozdov. Omo- goča hitro ogozditve, uporabo kakovostnih sadik in učinkovito doseganje zelene vrstne sestave (DIACI *et al.* 2017).

Za obnovo gozdov s sajenjem in setvijo so potrebna velika začetna vlaganja, ki obsegajo uporabo evolucijsko primerne in rastišču ustreznega, kakovostnega in ge- netsko pestrega gozdnega reprodukcijskega materiala (v nadaljevanju: GRM), pripravo tal, izvedbo sajenja in/ali setve, označitev in zaščito sadik pred objedanjem divja- di (količki, tulci, premazi vršičkov, kemična ali zvočna odganjala, ograde). Pri večjem izpadu posajenih sadik v prvih letih rasti nasadov, ki so posledica presaditvenega šoka, pozeb, suše in poškodb, je potrebno dopolnilno sajenje, pa tudi pri dopolnjevanju naravnega mladja slabe kakovosti in neustrezne vrstne sestave. V vseh na- vedenih primerih so stroški obnove in nege večji v pri- merjavi z naravno obnovo sestojev.

Uspešna obnova gozdov je pogoj za trajnost vseh funkcij gozdov. Le gozdovi z rastišču in podnebnim spremembam prilagojeno zgradbo in drevesno sestavo lahko v polni meri opravljajo svojo večnamensko vlogo in zagotavljajo proizvodne, socialne in ekološke funkcije (PERKO 2019). Zaradi dolge življenjske dobe in repro- duktivne biologije gozdnega drevja lahko odločitve v času obnove gozdov, ki jih sprejememo danes, kasneje »popravimo« le ob znatnih finančnih in delovnih vlož- kih. Neuspešna ali neprimerna obnova, npr. obnova z vrstno ali provenienčno rastišču neustreznim GRM, lahko privede do velikih stroškov, pa tudi do porušitve gozdnih sestojev in sprememb v njihovi dolgoročni sta-

bilnosti in rasti. Zato je naravna obnova v slovenskem načinu gospodarjenja z gozdom t. i. »Slovenski gozdar- ski šoli« (KRAIGHER *et al.* 2019) prva izbira. Obseg ob- nove in nege gozda je pomemben kazalnik intenzivnosti gospodarjenja z gozdovi, hkrati pa kaže, kako se družba v praksi zaveda pomena gozdov in njihove obnove ter na splošno kaže tudi na odnos družbe do gozdov (KRAJČIČ 1999).

Desetletno obdobje, od 2014 do 2024, v katerem so gozdove v Sloveniji prizadele najboljše naravne ujme v zgodovini in povzročile veliko gmotno škodo z dolgoročnim vplivom na stanje prizadetih gozdnih eko- sistemov, je z vidika obnove gozdov še zlasti kritično. Obdobje, ki se je začelo s katastrofalnim žledolomom leta 2014 (31. januar do 10. februar), zajema tudi obsežnejše vetrolome v letih 2017, 2018 in 2023 ter po- javljanje lokalno močnejših vetrov v letu 2024, ki so povzročili še dodatno razpršenost poškodovanih goz- dov (ZGS 2019, ZGS 2025). Takšne razmere so ustvarile idealne razmere za množično namnožitev podlubnikov, ki so v letih 2014 do 2019 ter naslednjih dodatno poslabšali stanje poškodovanih sestojev (ZGS 2017, DE GROOT *et al.* 2018, KERMAVNAR, KUTNAR & PINTAR 2023, ZGS 2023). Zato je v takih izrednih okoliščinah za zagotovitev ohranjanja funkcij gozda nujno prilagodit- veno upravljanje z gozdovi (NAGEL, FICKO & ROŽENBER- GAR 2019). Posledice ujm in delovanja podlubnikov so tako obsežne, da je postalo očitno, da naravna obnova sama ne bo zadostovala za doseg zelenih ciljev tra- jnostnega gospodarjenja z gozdovi v sprejemljivem časovnem obdobju (WESTERGREN, BOŽIČ & KRAIGHER 2017). To poleg strokovnega usmerjanja obnove gozdov s sajenjem in setvijo vključuje tudi izbiro primernih drevesnih vrst in njihovih provenienc za obnovo de- gradiranih rastišč ter zagotavljanje rastišču ustreznih in zdravih sadik iz gozdnih drevesnic.

V preteklosti smo s sonaravnim gospodarjenjem po načelih trajnosti v stabilnih razmerah okolja obnovo gozda razumeli predvsem kot gozdnogojitveni ukrep, s katerim vzpostavimo možnosti za čim uspešnejšo na- ravno sukcesijo gozda na določenem rastišču. V sodob- nem interdisciplinarnem gozdarstvu pa se vloga obnove gozdov spreminja.

Spreminjajoče se okoljske razmere, motnje in vedno večje zahteve po gozdnih ekosistemskih storitvah terja-jo, da gozdarji sedanja gozdna zemljišča obnovijo z novimi gozdnimi generacijami, ki bodo imele ekološko celovitost, raznolikost, visoko sposobnost prilagajanja in sposobnost zagotavljanja bistvenih ekosistemskih storitev (KOVAČ *et al.* 2024). Zato poleg naravne obnove, ki ostaja temeljni način obnove gozdov v Sloveniji, postajajo aktivni gozdnogojitveni ukrepi, kot je obnova po ujmah ogolelih površin s sajenjem in setvijo, tudi ključni dejavnik pri prilagajanju gozdov na hitre podnebne spremembe ter pri ohranjanju biotske raznovrstnosti. Sajenje ima bistveno dopolnilno ali nadomestno vlogo naravne obnove gozdov predvsem na območjih, kjer naravni procesi ne morejo zagotoviti uspešne in pravočasne obnove gozda (RANTAŠA & KRAIGHER 2023).

Pravna podlaga za izvedbo večine del s sajenjem in setvijo v slovenskih gozdovih je v Zakonu o gozdovih (*Zakon o gozdovih* 1993) in Pravilniku o financiranju in sofinanciranju vlaganj v gozdove (*Pravilnik o financiranju in sofinanciranju vlaganj v gozdove* 2004). Načrtova-

nje in usmerjanje ukrepov obnove gozdov sta, kot določajo predpisi, v pristojnosti ZGS, ki na podlagi vsakoletnega Programa vlaganj v gozdove usmerja delo lastnikov gozda. Ukrepe obnove gozdov delimo na sajenje, setev, varstvo pred divjadjo in pripravo tal (Božič *et al.* 2021). Splošni termin obnova gozdov sicer vključuje tudi dela za spodbujanje naravne obnove in pripravo tal zanj, vendar se v našem prispevku osredotočamo izključno na ukrepe, ki vključujejo aktivno sajenje in setev kot ključno orodje za hitro obnovo degradiranih območij.

Za učinkovito usmerjanje obnove gozdov, ki zagotavlja njihovo prilagoditveno sposobnost na okoljske spremembe, je potrebna kritična analiza dosedanjih praks in na osnovi rezultatov širših raziskav podati smernice za racionalizacijo obnove s potrebnimi prilagoditvami. Cilj te raziskave je bil analizirati obseg, dinamiko in stroške umetne obnove gozdov (s sajenjem in setvijo) v Sloveniji, ki jo je izvajal Zavod za gozdove Slovenije (ZGS). Raziskava je bila opravljena v letu 2020 v okviru projekta CRP V4-1819.

## 2 MATERIAL IN METODE

Analizirali smo 14-letno obdobje od leta 2007 do 2020, saj za zgodnejša leta niso bili na voljo celostni digitalni podatki, potrebni za raziskavo. Obdobje analize vključuje čas sedmih let pred katastrofalnim žledom v letu 2014 in sedmih let po njem. Tako smo želeli osvetliti vpliv naravnih ujm in finančne prioritete pri upravljanju gozdov.

Podatke za analizo obsega opravljenih del, finančno analizo stroškov obnove gozdov s sajenjem in setvijo ter ukrepov varstva obnovljenih površin pred divjadjo za obdobje od leta 2007 do leta 2020 smo pridobili iz uradnih evidenc ZGS, in sicer iz informacijskega sistema za evidenco gojitvenih in varstvenih del ter izplačila subvencij za vlaganja v gozdove (xGj), v nadaljevanju evidence ZGS. Stroški opravljenih ukrepov obsegajo stroške del, ki so jih opravili lastniki gozdov sami (priprava tal za

sajenje oz. setev, sajenje oz. setev, ukrepi varstva pred divjadjo), stroške vseh materialov za izvedbo del (sadike, seme, količki za obeleževanje sadik, materiali za varstvo pred divjadjo) ter stroške dela ZGS. Stroški dela ZGS vključujejo stroške dela ZGS in administrativne ter materialne stroške, nastale pri opravilih: svetovanje lastnikom gozdov, izdajanje odločb za izvedbo del, zagotavljanje materialov za ukrepe, ki so (so) financirni iz proračuna Republike Slovenije in iz sredstev Programa razvoja podeželja, usmerjanje izvedbe del na terenu ter prevzem opravljenih del. Primerjave ukrepov obnove gozdov prikazujemo skupaj in ločeno po letih. Analizirali smo tudi intenzivnost in stroške obnove gozdov s sajenjem s prikazom po gozdnogospodarskih območjih (v nadaljevanju GGO) in preverjali, v katerih GGO in v katerih letih je bil obseg posajenih površin največji oz. najmanjši.

## 3 REZULTATI

Rezultate študije navajamo po segmentih, in sicer z: i) obsegom obnove s sajenjem in setvijo (ha) ter številom in vrednostjo posajenih sadik; ii) obsegom izvedenih ukrepov varstva pred divjadjo in stroškov ukrepov varstva. Izvedene ukrepe obnove s sajenjem, setvijo in varstva pred divjadjo nadalje navajamo primerjalno s

prikazom po letih in deležih glede na skupni letni obseg sajenja ter intenzivnostjo obnove gozdov po gozdnogospodarskih območjih (v nadaljevanju GGO) ter z analizo stroškov obnove gozdov s sajenjem glede na površino, po GGO in glede na vrsto ukrepov po GGO.

### 3.1 Obseg obnove gozdov s sajenjem in setvijo po opravljenih ukrepih in postavkah

Obnova s sajenjem in setvijo je bila v 14-letnem obdobju narejena na 5.353 ha gozdnih površin, od tega je bilo dopolnilno sajenje na 607,39 ha, redno sajenje na 2.170,87 ha in sajenje po ujmah na 2.575,03 ha površin, ukrep priprave tal na 3.489 ha površin, ukrep setve pa na 457 ha površin. Ukrep varstvo pred divjadjo je bil v obsegu 90.345 dnin (Preglednica 1 in 4).

V obdobju od leta 2007 do 2020 je bilo na celotnem območju Slovenije, ki je razdeljena na 14 GGO, za vse ukrepe obnove gozdov s sajenjem in setvijo porabljenih 33,6 milijona EUR.

Sajenje sadik je najpogosteje uporabljena metoda obnove gozdov s sajenjem in setvijo v Sloveniji. Primerjava obsega kaže, da je bilo s sajenjem obnovljenih 5.353 ha, medtem ko je bilo s setvijo obnovljenih le 457 ha. Obseg sajenja je bil torej več kot desetkrat večji od obsega setve.

V stroških prevladujeta dva ključna ukrepa, in sicer ukrep sajenja in ukrep varstvo pred divjadjo. Oba, sajenje<sup>1</sup> (17,9 mio. EUR) in varstvo pred divjadjo (14,0 mio.

EUR), skupaj predstavljata 95 % vseh stroškov v obravnavanem obdobju, kar jasno kaže, da sta obnova s sadikami in kasnejše varstvo takih površin pred poškodbami divjadi osrednji in finančno najpomembnejši dejavnosti pri obnovi gozdov s sajenjem in setvijo, ki jo usmerja ZGS. Preostala ukrepa, priprava tal (1,2 mio. EUR) in setev<sup>2</sup> (0,5 mio. EUR), imata v primerjavi s prvima dvema zanemarljiv finančni in velikostni delež.

Stroškovna struktura med ključnima ukrepoma je različna. Pri sajenju je največji strošek material (sadike), ki z 9,8 milijona EUR zajema kar 55 % vseh stroškov sajenja. Stroški dela (izvajalci in ZGS skupaj) so bili bistveno manjši. Cena in tip gozdnih sadik zelo vplivata na stroške obnove s sajenjem. Pri varstvu pred divjadjo je bila situacija obratna: prevladovali so stroški dela (delo izvajalcev in ZGS<sup>3</sup> skupaj), ki so z 10,5 milijona EUR predstavljali kar 75 % vseh stroškov ukrepa varstva. Strošek materiala (ograje, premazi itn.) je bil bistveno manjši (3,5 mio. EUR). Rezultati potrjujejo, da je varstvo pred divjadjo delovno zelo intenziven ukrep.

Stroški materiala za sajenje in setev so največji delež stroškov (30 %), porabljenih za obnovo gozdov s sajenjem in setvijo, sledijo stroški dela za zaščito pred div-

Preglednica 1: Osnovni podatki po ukrepih – skupaj za obdobje od 2007 do 2020

Table 1: Summary data by measures: Soil preparation, Planting, Sowing and protection against game damage for period 2007-2020

| Ukrep                 | Obseg ukrepov | Vrednost del (EUR) | Vrednost materiala (EUR) | Strošek dela ZGS (EUR) | Skupaj stroški (EUR) |
|-----------------------|---------------|--------------------|--------------------------|------------------------|----------------------|
| Priprava tal          | 3.489 ha      | 872.270            | -                        | 339.682                | 1.211.952            |
| Sajenje               | 5.353 ha      | 5.353.290          | 9.830.104                | 2.759.780              | 17.943.174           |
| Setev                 | 457 ha        | 169.890            | 222.320                  | 80.928                 | 473.138              |
| Varstvo pred divjadjo | 90.345 dnin   | 7.046.939          | 3.493.238                | 3.426.747              | 13.966.923           |
| <b>Skupaj</b>         |               | <b>13.442.389</b>  | <b>13.545.661</b>        | <b>6.607.137</b>       | <b>33.595.188</b>    |

Preglednica 2: Prikaz vrednosti stroškov obnove gozdov s sajenjem in setvijo po postavkah

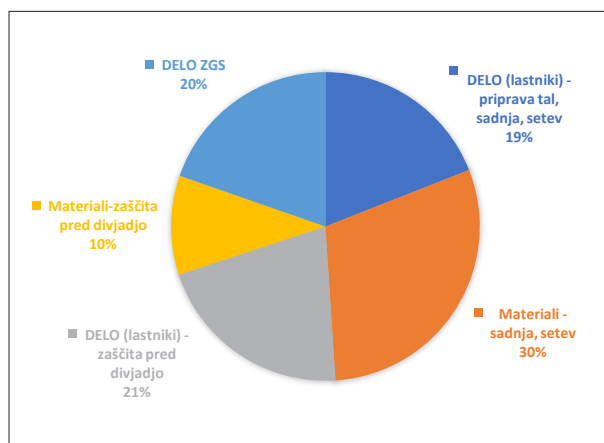
Table 2: Cost values for forest restoration with planting and sowing listed by types: Labour (forest owners) – soil preparation, planting, sowing, Materials – planting, sowing, Labour (forest owners) – protection against game damage, Materials – protection against game damage, Labour of Slovenia Forest Service (SFS) and in total (EUR)

| Postavka                                       | Vrednost (EUR)    |
|------------------------------------------------|-------------------|
| Delo (lastniki) – priprava tal, sajenje, setev | 6.395.450         |
| Materiali – sajenje, setev                     | 10.052.424        |
| Delo (lastniki) – zaščita pred divjadjo        | 7.046.939         |
| Materiali – zaščita pred divjadjo              | 3.493.238         |
| Delo ZGS                                       | 6.607.137         |
| <b>Skupaj</b>                                  | <b>33.595.188</b> |

<sup>1</sup> Ukrep sajenje zajema dopolnilno sajenje, redno sajenje in sajenje po ujmah skupaj.

<sup>2</sup> Ukrep setev zajema redno setev in setev po ujmah.

<sup>3</sup> Strošek dela ZGS vključuje stroške dela in materialne ter administrativne stroške.



Slika 1: Deleži stroškov obnove gozdov s sajenjem in setvijo v obdobju od 2007 do 2020 s prikazom po vrstah stroškov

Figure 1: Shares of costs for forest restoration with planting and sowing in the period from 2007 to 2020 by cost type: Labour (forest owners) – soil preparation, planting, sowing (deep blue), Materials – planting, sowing (orange), Labour (forest owners) – protection against game animals (grey), Materials – protection against game damages (yellow), Labour of the Slovenia Forest Service (SFS) (light blue)

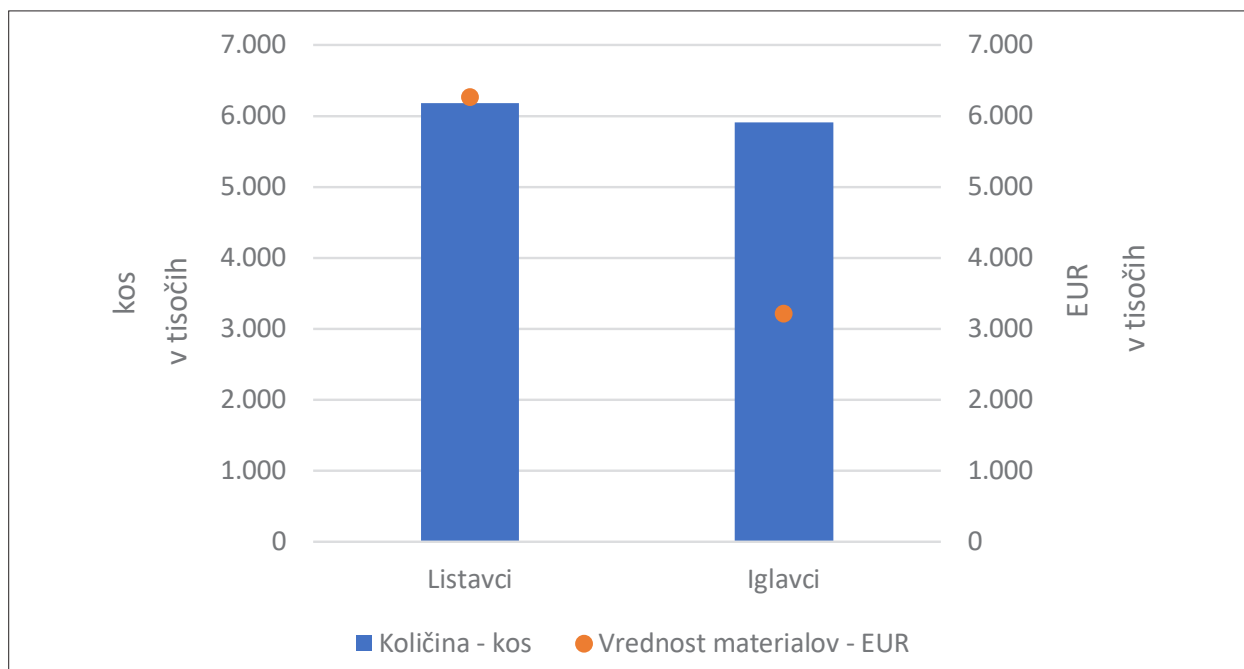
jadjo (21 %), stroški dela ZGS (20 %), stroški dela pri pripravi tal (19 %), za stroške materiala za zaščito pred divjadjo pa je delež stroškov najmanjši (10 %).

V skupni finančni bilanci ukrepov obnove gozdov s sajenjem in setvijo je pomemben delež strošek zunanjih izvajalcev in materiala. Gledano v celoti, sta bila v 14-letnem obdobju največja posamična stroška dela zunanjih izvajalcev (13,4 mio. EUR ali 40 % vseh stroškov) in material (13,5 mio. EUR ali 40 % vseh stroškov). Interni strošek dela ZGS je bil preostalih 20 % (6,6 mio. EUR).

### 3.2 Število in vrednost posajenih sadik v obdobju od 2007 do 2020

V okviru obnove gozdov s sajenjem je bilo v analiziranem 14-letnem obdobju posajenih 6.176.099 sadik listavcev in 5.913.388 sadik iglavcev, skupaj 12.089.487 dreves. Za sadike je bilo v obdobju od 2007 do 2020 porabljenih 9.457.562 EUR, od tega za listavce 66 %, za iglavce pa 34 %<sup>4</sup> (Slika 2).

Čeprav je bilo v 14-letnem obdobju posajeno skoraj enako število sadik listavcev (51 %) in iglavcev (49 %), so



Slika 2: Primerjava števila posajenih sadik in njihove vrednosti v 14-letnem obdobju

Figure 2: Comparison of the number and value of planted seedlings shown separately by broadleaves and conifers in the 14-year period; Quantity – unit (blue), Cost of materials – EUR (orange dot)

<sup>4</sup> Strošek dela na hektar je enak ne glede, ali sadimo iglavce ali listavce.

sadik listavcev obsegale dve tretjini (66 %) vseh stroškov materiala. Strateška usmeritev v sajenje listavcev (zaradi podnebnih sprememb, večje stabilnosti sestojev ipd.) prinaša tudi nesorazmerno večje finančne obremenitve v primerjavi s sajenjem iglavcev zaradi občutno višje cene sadik listavcev.

V povprečju je bila klasična sadika listavca (sadika z golo korenino) 2,3-krat dražja od sadike iglavca (1,19 EUR proti 0,52 EUR). Analiza kaže, da so kontejnerske sadike v povprečju skoraj dvakrat (1,9-krat) dražje od klasičnih sadik z golo korenino. Razlika je največja pri iglavcih, kjer je kontejnerska sadika kar 3,2-krat dražja od klasične. Pri listavcih je razlika manjša (1,6-krat).

Rezultati kažejo, da na strošek obnove gozdov s sajenjem ključno vplivajo trije dejavniki: i) izbira drevesne vrste: sajenje listavcev namesto iglavcev v povprečju več

kot podvoji strošek sadik; ii) izbira tipa sadike: uporaba kontejnerskih sadik namesto klasičnih strošek skoraj podvoji, pri iglavcih ga celo potroji; iii) varstvo pred divjadjo: strošek zaščite novo osnovanega mladja lahko doseže ali celo preseže strošek samega sajenja.

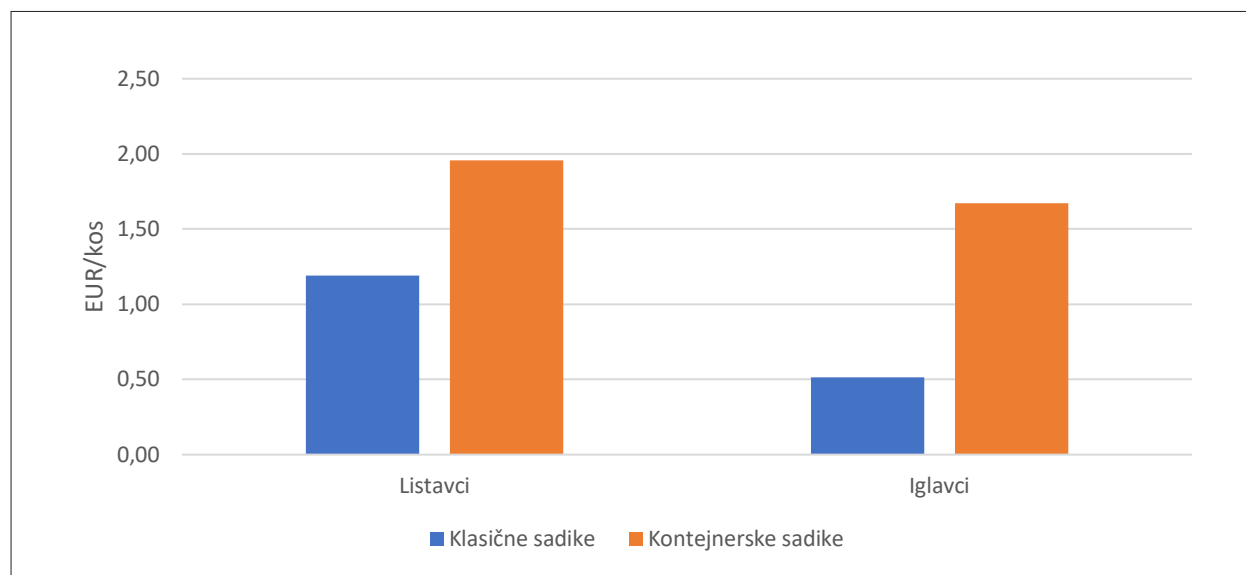
### 3.3 Obseg setve v obdobju od 2007 do 2020

Ukrep obnove gozdov s setvijo je v obdobju od leta 2007 do 2020 na celotnem območju Slovenije potekal na bistveno manjši površini kot obnova s sajenjem.<sup>5</sup> Redna obnova s setvijo je bila na 31,4 ha površin (7 %), ukrep setev po ujmah pa na 425,24 ha površin (93 %). Ukrep setev po ujmah je skoraj v celoti potekal v letih od 2007 do 2015 (411,84 ha od skupno 425,24 ha), podobno velja

Preglednica 3: Povprečna vrednost sadike v evrih po skupinah drevesnih vrst in vrsti sadik

Table 3: Average value of seedlings in € presented by species group (broadleaves / coniferous) and seedling type (classical bare root / containerized)

| Sadik         | Klasične sadike (z golo korenino) | Kontejnerske sadike | Skupaj      |
|---------------|-----------------------------------|---------------------|-------------|
| Listavci      | 1,19                              | 1,96                | 1,19        |
| Iglavci       | 0,52                              | 1,67                | 0,53        |
| <b>Skupaj</b> | <b>0,94</b>                       | <b>1,77</b>         | <b>0,94</b> |



Slika 3: Primerjava povprečne vrednosti cene sadike listavcev in iglavcev za klasične sadike z golo korenino in kontejnerske sadike  
Figure 3: Comparison of the average seedling price of broadleaves (left) and coniferous (right) seedlings for classical bare root (blue) and containerized seedlings (orange) in EUR per unit

<sup>5</sup> Vzrok za manjši obseg površin, obnovljenih s setvijo, je dejstvo, da je ukrep obnove s setvijo učinkovit le na določenih gozdnih površinah in da ni bil financiran iz Programa razvoja podeželja 2014–2020, ukrep obnove s sajenjem pa ne.

za ukrep redna setev (21,16 ha od skupno 31,4 ha).

Rezultati nakazujejo na tri med seboj povezane ugotovitve, ki jasno opredeljujejo vlogo in pomen setve v slovenskem gozdarstvu v obravnavanem obdobju. Glavno in najpomembnejše spoznanje je, da obnova gozdov s setvijo ni redni gozdnogojitveni ukrep, ampak intervenčni pristop pri obnovi ogroženih površin po naravnih ujmah. Podatek, da je bilo kar 93 % vseh površin obnovljenih s setvijo po ujmah, jasno kaže, da ta metoda ni v rabi za redno, načrtovano pomlajevanje gozdov, temveč skoraj izključno kot intervenčni ukrep na poškodovanih območjih. Redna setev je s samo 7 % deležem zanemarljiva.

Ukrep obnove gozdov s setvijo je bil največkrat uporabljen v letih pred katastrofalnim žledolom. Velika večina vseh aktivnosti (tako setev po ujmah kot redna setev) je bila opravljena med letoma 2007 in 2015. Po tem letu se je uporaba te metode drastično zmanjšala. Časovna koncentracija nakazuje, da so bili za uporabo setve ključni dogodki ali razmere v tistem obdobju in da se kasneje praksa ni nadaljevala v enakem obsegu. Razlogi za majhen obseg in zmanjševanje po letu 2015 so lahko večplastni. Setev je učinkovita le na specifičnih rastiščih, kar jo že v osnovi omejuje kot univerzalno metodo in je zato tudi mogoče, da je bil uspeh setve manjši od pričakovanega. Drugi razlog je finančne narave, ki

izvira iz ključne informacije, da ukrep ni bil financiran iz Programa razvoja podeželja (PRP) 2014–2020. To neposredno tudi pojasni dejstvo, da je po letu 2014 uporaba ukrepa setev skoraj popolnoma prenehala – ko ni bilo več na voljo sredstev PRP oz. so bila sredstva preusmerjena za sajenje, ki je bilo financirano, in je zato ukrep s setvijo postal finančno nepriljubljen.

### 3.4 Dinamika obnove gozdnih površin glede na vrsto obnove s sajenjem

V obdobju od leta 2007 do 2020 je bilo na celotnem območju Slovenije s sajenjem obnovljenih 5.353,29 ha gozdnih površin (Preglednica 1, Preglednica 4), pri čemer je bilo v analiziranem 14-letnem obdobju največ (48 %) površin obnovljenih po ujmah (ukrep sajenje po ujmah), 41 % z rednim sajenjem (ukrep redno sajenje) ter 11 % površine z dopolnilnim sajenjem (ukrep dopolnilno sajenje) Preglednica 6. Če obdobje razdelimo na obdobje pred katastrofalnim žledolomom in po njem, spoznamo, da je bilo v sedemletnem obdobju pred letom 2014 z ukrepom sajenje obnovljenih 47 % gozdnih površin, v enakem sedemletnem obdobju od leta 2014, ki so ga zaznamovale predvsem velikopovršinske ujme in gradacije podlubnikov, pa 53 %.

Preglednica 4: Obseg obnovljenih gozdnih površin glede na vrsto obnove s sajenjem, s prikazom po letih pred katastrofalnim žledolomom (2007–2013) in po njem (2014–2020) ter skupaj

Table 4: Area of forests restored with planting, by type of restoration (Enrichment planting, Regular planting, Planting after natural disaster) and by year, presented in hectares (ha), with average annual values (ha/year) shown for the periods 2007–2013 and 2014–2020 and Total

| Leta                  | Dopolnilno sajenje (ha) | Povprečje (ha/leto) | Redno sajenje (ha) | Povprečje (ha/leto) | Sajenje - ujme (ha) | Povprečje (ha/leto) | Sajenje skupaj (ha) | Povprečje (ha/leto) |
|-----------------------|-------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 2007                  | 40,21                   |                     | 281,98             |                     | 131,35              |                     | 453,54              |                     |
| 2008                  | 50,23                   |                     | 252,34             |                     | 115,24              |                     | 417,81              |                     |
| 2009                  | 54,89                   |                     | 196,90             |                     | 141,64              |                     | 393,43              |                     |
| 2010                  | 42,09                   |                     | 171,41             |                     | 153,01              |                     | 366,51              |                     |
| 2011                  | 55,53                   |                     | 214,13             |                     | 87,99               |                     | 357,65              |                     |
| 2012                  | 63,22                   |                     | 177,52             |                     | 27,84               |                     | 268,58              |                     |
| 2013                  | 49,12                   |                     | 159,42             |                     | 30,95               |                     | 239,49              |                     |
| <b>Skupaj 2007/13</b> | <b>355,29</b>           | <b>50,76</b>        | <b>1453,70</b>     | <b>207,67</b>       | <b>688,02</b>       | <b>98,29</b>        | <b>2497,01</b>      | <b>356,72</b>       |
| 2014                  | 21,27                   |                     | 66,88              |                     | 142,30              |                     | 230,45              |                     |
| 2015                  | 27,14                   |                     | 125,55             |                     | 99,81               |                     | 252,50              |                     |
| 2016                  | 40,07                   |                     | 102,46             |                     | 179,95              |                     | 322,48              |                     |
| 2017                  | 31,35                   |                     | 68,08              |                     | 228,25              |                     | 327,68              |                     |
| 2018                  | 38,14                   |                     | 131,07             |                     | 286,00              |                     | 455,21              |                     |
| 2019                  | 37,43                   |                     | 113,84             |                     | 416,98              |                     | 568,25              |                     |
| 2020                  | 56,70                   |                     | 109,29             |                     | 533,72              |                     | 699,71              |                     |
| <b>Skupaj 2014/20</b> | <b>252,10</b>           | <b>36,01</b>        | <b>717,17</b>      | <b>102,45</b>       | <b>1887,01</b>      | <b>269,57</b>       | <b>2856,28</b>      | <b>408,04</b>       |
| <b>Skupaj</b>         | <b>607,39</b>           |                     | <b>2.170,87</b>    |                     | <b>2.575,03</b>     |                     | <b>5.353,29</b>     |                     |

Kljub temu pa rezultati kažejo, da je katastrofalni žledolom z leta 2014 povzročil popoln preobrat v vlogi in namenu obnove gozdov s sajenjem in setvijo v Sloveniji. Pred ujmo (2007–2013) je bila obnova gozdov s sajenjem pretežno reden gozdnogojitveni ukrep. Kar 58 % vseh površin je bilo obnovljenih z rednim sajenjem, medtem ko je sanacija posledic ujm predstavljala 28 %. Po ujmah (2014–2020) se je vloga obrnila: sajenje je postalo orodje za obnovo po ujmah poškodovanih gozdnih površin. Delež sajenja po ujmah je poskočil na 66 %, medtem ko se je delež rednega sajenja zmanjšal na samo 25 %. Po katastrofalnem žledolomu sta se povečala skupni obseg del in prerazporeditev virov. Povprečna letna obnovljena površina s sajenjem se je iz 357 ha/leto (pred letom 2014) povečala na 408 ha/leto (po letu 2014). Povečanje je bilo doseženo z drastično prerazporeditvijo virov in prioritet, in sicer: obseg rednega sajenja se je prepolovil (iz 208 ha/leto na 102 ha/leto), medtem ko se je obseg sajenja po ujmah skoraj potrojil (povečal za 2,7-krat: iz 98 ha/leto na 270 ha/leto), kar nakazuje tudi na sposobnost prilagajanja gozdarskega sektorja v primeru izjemnih dogodkov za sanacijo in urgentno obnovo gozdov.

Podrobnejši pregled Preglednice 4 razkrije tudi, da se obseg sajenja po ujmah ni skokovito povečal takoj v letu 2014, ampak se je trend zelo večal proti koncu obdobja. Največji obseg sanacije s sajenjem je bil dosežen v letih 2018, 2019 in 2020, ko je letni obseg zelo presegel povprečje prejšnjih let. Leta 2020 je bila s 534 ha dosežena največja vrednost. Rezultati nakazujejo tudi na postopnost obnove degradiranih gozdnih površin, kar je verjetno posledica časa, potrebnega za pripravo površin (sečnja in spravilo poškodovanega lesa), vzgojo ustre-

znih sadik v gozdnih drevesnicah in zagotovitev financiranja.

Pri ukrepu dopolnilno sajenje je bilo med proučevanima obdobjema v povprečju več površine na leto zasajene v obdobju pred letom 2014, z izjemo v letu 2020, ko se je vrednost spet povečala. Ukrepa priprava tal ne prikazujemo posebej, saj je sestavni del ukrepa sajenje.

### 3.5 Obseg ukrepov varstva pred divjadjo v obdobju od 2007 do 2020 in analiza stroškov

V okviru izvajanja ukrepov varstva pred divjadjo je bilo v navedenem obdobju porabljenih 90.345,38 dnin (Preglednica 1). Ukrepi so v največjem obsegu potekali leta 2007 (10.007,88 dnin) in leta 2020 (11.631,63 dnin). To potrjuje, da gre za izjemno delovno intenzivno dejavnost. Za varstvo pred divjadjo je bilo v obdobju od 2007 do 2020 porabljenih skupaj 10,5 milijona EUR brez stroškov dela ZGS (Preglednica 5). V celotnem 14-letnem obdobju so stroški dela izvajalcev obsegali dve tretjini (67 %) vseh izdatkov, stroški materiala pa 33 %.

V proučevanem obdobju so bili največji povprečni stroški na hektar pri ukrepih zaščite s tulci (5.843 EUR na hektar) in zaščite z ograjo (5.187 EUR na hektar), sledi ukrep zaščite s količenjem (4.357 EUR na hektar), najmanjša povprečna vrednost na hektar pa je pri ukrepu premazi in škropiva (1.041 EUR). Največ stroškov dela je nastalo pri ukrepu zaščite z ograjo (39 %), največ stroškov materiala pa pri ukrepu zaščite s tulci (47 %). Pri zaščiti z ograjo je ključni strošek delo (2,8 mio. EUR), ki je kar 77 % vrednosti tega ukrepa. Pri zaščiti s tulci pa je daleč največji strošek material (1,6 mio. EUR), ki

Preglednica 5: Stroški varstva pred divjadjo s prikazom po kategorijah za ciljno obdobje

Table 5: Costs of protection against game damage by category (Coating, Sprays, Tube protection, Fence protection, Staking, Other works), shown as average and total values of implemented measures for the study period

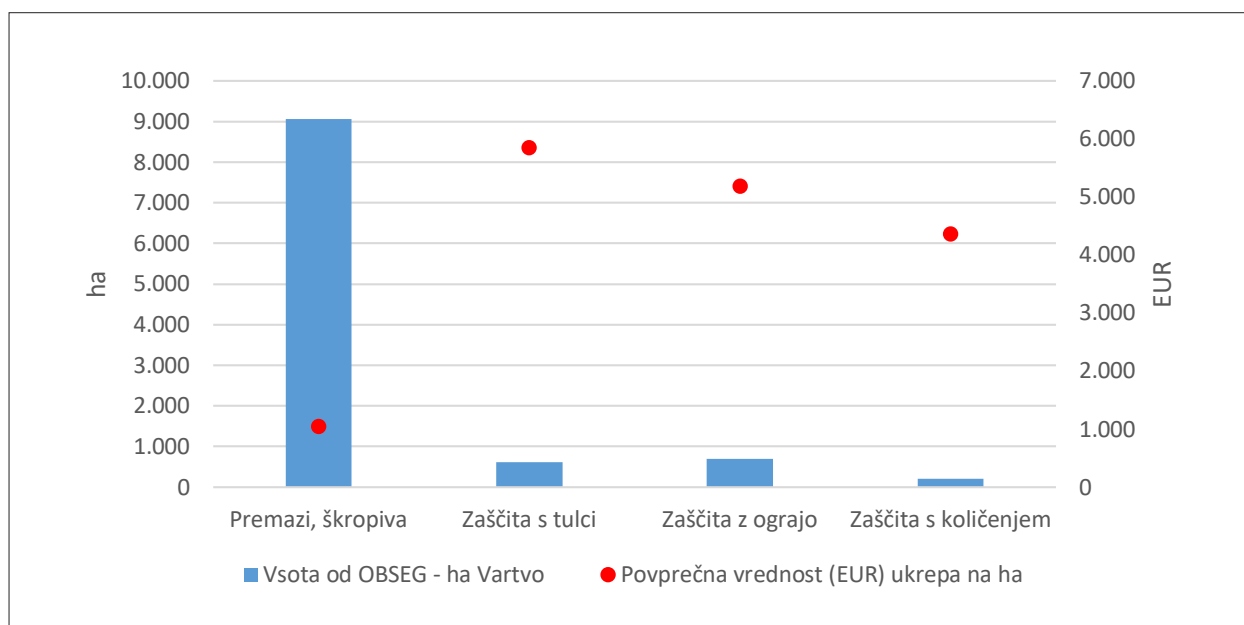
|                      | Skupni obseg varstvenih del (ha) | Povprečna vrednost ukrepa / ha (EUR) | Skupna vrednost del (EUR) | Skupna vrednost materialov (EUR) |
|----------------------|----------------------------------|--------------------------------------|---------------------------|----------------------------------|
| Premazi, škropiva    | 9.061 (1812,18)*                 | 1.041                                | 1.134.783                 | 752.056                          |
| Zaščita s tulci      | 618                              | 5.843                                | 1.967.755                 | 1.641.478                        |
| Zaščita z ograjo     | 694                              | 5.187                                | 2.762.585                 | 837.076                          |
| Zaščita s količenjem | 209                              | 4.357                                | 690.242                   | 222.371                          |
| Ostala dela          |                                  |                                      | 491.576                   | 40.257                           |
| <b>Skupaj</b>        | <b>10.582 (3.333)**</b>          |                                      | <b>7.046.939</b>          | <b>3.493.238</b>                 |

Opomba\*: Zaščita s premazi in škropivi se izvaja vsako leto, vsaj 5 let. Podatek obseg varstva (ha) je izračunan kot  $1812,18 \text{ ha} * 5 = 9061 \text{ ha}$ .

Remark\*: Protection with coatings and sprays is performed every year for at least 5 years. The data for the scope of protection (ha) is calculated as  $1812.18 \text{ ha} * 5 = 9061 \text{ ha}$ .

Opomba\*\*: V obdobju od 2007 do 2020 smo pred divjadjo zaščitili 3.333 hektarov gozda.

Remark\*\*: In the period from 2007 to 2020, 3,333 hectares of forest were protected against game damage.



Slika 4: Obseg ukrepov varstva pred divjadjo in povprečni stroški ukrepa na hektar

Figure 4: Extent of protection measures against game damage by category (Coating & Sprays, Tubes, Fence, Staking), shown as blue columns, with average costs per hectare for each measure (EUR/ha) indicated by red dots

predstavlja 47 % vseh stroškov materiala za varstvo. Tu je ključna cena samih tulcev.

Strategije zaščite novo osnovanega mladja pred poškodbami po divjadi temeljijo na kompromisu med ceno na enoto in obsegom uporabe. Zaščita sadik z uporabo premazov in škropiv je najcenejša metoda na enoto površine (le 1.041 EUR/ha), zaščita s tulci in ograjami je s stroški od 5.000 do 6.000 EUR/ha petkrat dražja od premazov, zato je v uporabi v manjšem obsegu. Zaščita s premazi in škropivi namreč poteka vsako leto na isti površini vsaj pet let. Zato je tudi obseg premazov in škropiv na hektar bistveno večji od vseh preostalih ukrepov za varstvo pred divjadjo (na hektar – zaščita s tulci, zaščita z ograjo, zaščita s količenjem), Slika 4.

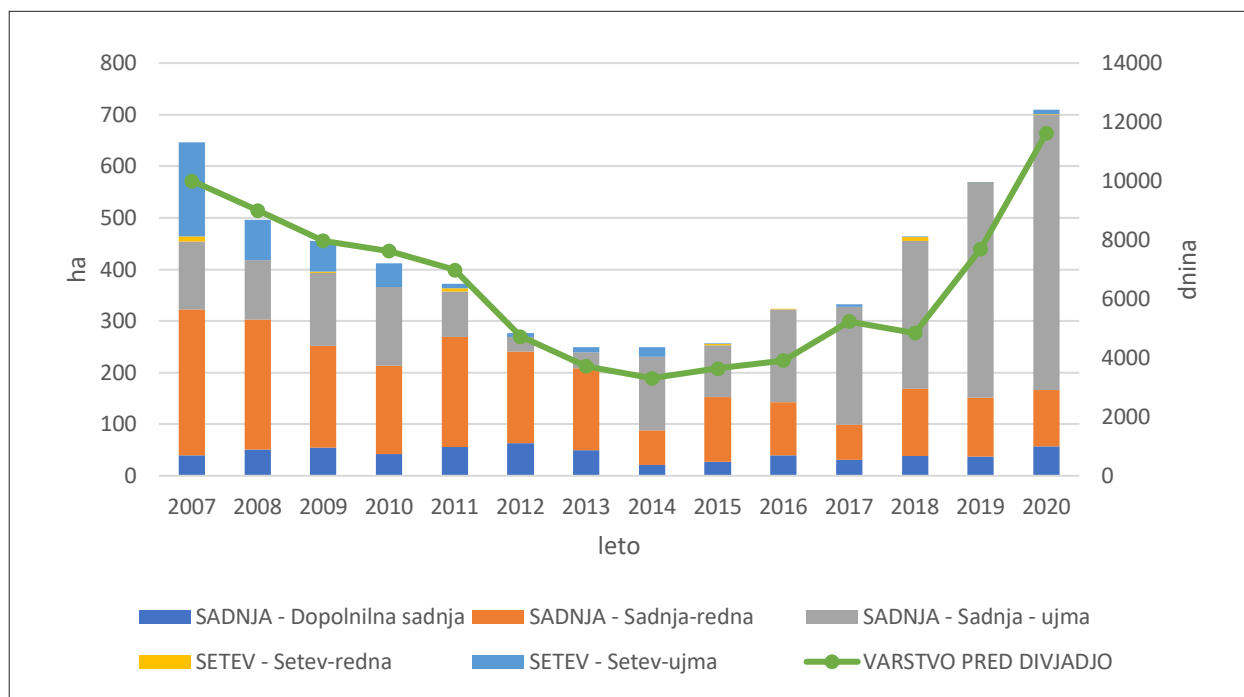
### 3.6 Primerjava ukrepov obnove s sajenjem, setvijo in varstva pred divjadjo po ujmah in letih

Slika 5 prikazuje obseg ukrepov sajenja in setve (v ha) ter varstva pred divjadjo (v dninah) po letih, ki zajema velikopovršinsko obnovo požarišč s setvijo v Kraškem GGO v letih 2007 in 2010, obnovo poškodovanih gozdov zaradi podlubnikov in vetroloma v letih 2006 in 2008 (obnova tega gozda je potekala v letih od 2007 do 2013) ter obnovo poškodovanih gozdov zaradi žleda, podlubnikov in vetroloma leta 2017 in leta 2018. Ukrepa »pripra-

va tal« ne prikazujemo posebej, saj je sestavni del ukrepov obnove s sajenjem. Izraziti vrhovi ukrepov sovpadajo z obdobji po večjih ujmah. Ukrepi setev po ujmah dosega največje vrednosti v letih 2007 in 2010, kar je neposredna posledica sanacije požarišč na Krasu in ni del redne prakse.

Prelomno leto, ki je korenito spremenilo prioritete gozdarstva, je bilo leto 2014. Pred letom 2014 je prevladovalo redno sajenje, po letu 2014 pa sajenje po ujmah postane prevladujoče, redno sajenje se zelo zmanjša. To nadalje nakazuje, da so bili viri (finančni, človeški in organizacijski) prerazporejeni iz rednega dela v nujno odpravljanje posledic naravnih ujm. Po letu 2014 je ukrep sajenje po ujmah postal dominantna oblika obnove gozdov s sajenjem, kar jasno nakazuje na preusmeritev vseh resursov v sanacijo posledic žledoloma in podlubnikov. Ker se ukrepi obnove gozdov s setvijo semena uporabljajo le na določenih površinah in niso financirani iz Programa razvoja podeželja 2014–2020, je obseg obnove gozdov s setvijo po naravnih ujmah precej manjši.

Rezultati nakazujejo neposredno povezavo med obsegom sajenja in potrebo po varstvu pred divjadjo. Ukrepi varstva pred divjadjo je na začetku analiziranega obdobja sovpadal z obsežno setvijo in sajenjem v letu 2007, medtem ko je najvišjo vrednost dosegel v letu 2020, ki je sledilo rekordnemu obsegu sajenja po ujmah v letih 2018–2020. Več kot je posajenih mladih dreves,



Slika 5: Prikaz obsega izvedenih ukrepov obnove s sajenjem in setvijo v hektarih (primarna os) in ukrepov varstva pred divjadjo v dneh (sekundarna os) po letih

Figure 5: Scope of forest restoration measures with planting and sowing by year: Enrichment planting (dark blue), Regular planting (orange), Planting after natural disasters (grey), Sowing – regular (yellow), and Sowing after natural disasters (light blue), shown in hectares (primary axis). Protection measures against game damage are shown as a green line in person-days (secondary axis)

večji je obseg dela, potrebnega za njihovo zaščito. Na Sliki 5 je prikazano, kako investiciji v sajenje sledi nujna investicija v varstvo pred divjadjo.

### 3.7 Primerjava obsega ukrepov obnove s sajenjem s prikazom po letih in deležih glede na skupni letni obseg sajenja

Ta sklop analize podatkov, ki se osredotoča na deleže in ne na absolutne številke, omogoča ugotovitev o spremembi strategije in prioriteta za obnovo gozdov s sajenjem v Sloveniji. Delež rednega sajenja se v skupnem letnem obsegu sajenja od leta 2014 manjša. V letih 2007, 2008, 2012 in 2013 je znašal več kot 60 % celotne obnove s sajenjem, v letu 2020 pa le še 16 %. Delež obsega obnove s sajenjem po ujmah se je v skupnem letnem obsegu sajenja prvič bistveno povečal leta 2014, ko je slovenske gozdove prizadel katastrofalni žledolom. Delež sajenja po ujmah se je tisto leto povečal iz 13 %, kolikor je znašal leta 2013, na 62 % v letu 2014. V letu 2015 se je delež sajenja po ujmah zmanjšal na 40 %, v letu 2016 se je povečal na 56 %, leta 2017, ko je po slovenskih gozdovih pu-

stošil vetrolom, pa se je obseg sajenja po ujmah ponovno povzpел skoraj na 70 % celotnega letnega obsega sajenja. V letu 2020 je delež sajenja po ujmah znašal 76 % celotnega letnega obsega sajenja. Delež dopolnilnega sajenja v skupnem letnem obsegu sajenja je bil največji v letih 2012 in 2013 (24 % oz. 21 %), v letih 2007, 2014, od let 2017 do 2020 pa je bil manjši od 10 % skupnega letnega obsega sajenja (Preglednica 6).

Tudi celoten prikaz ukrepov sajenja v skupnem obsegu obnove s sajenjem po letih (Slika 6) potrjuje prelomnost v letu 2014 z jasnim preobratom iz obnove z rednim sajenjem v večjo vlogo sanacijske obnove s sajenjem v Sloveniji. Redno sajenje je do vključno leta 2013 predstavljalo dve tretjini vsega sajenja, medtem ko je bilo sajenje po ujmah stranskega pomena (13 %). Velika sprememba je nastala v letu 2014, ko se je njuno razmerje v enem letu tako spremenilo, da je postalo skoraj obratno sorazmerno. Sajenje po ujmah je doseglo 62 %, medtem ko se je redno sajenje zmanjšalo na 29 %. Preobrat ni bil začasen. Podatki jasno kažejo, da je prevlada sajenja po ujmah postala nova realnost in se je sčasoma le še krepila. Delež sajenja po ujmah se je po letu 2014 vztrajno večal in dosegel vrhunec leta 2020, ko je predstavljal

že več kot tri četrtine vsega letnega sajenja. To dokazuje, da se sistem obnove gozdov s sajenjem in setvijo ni vrnil v prvotno stanje, ampak se je prilagodil na stalno krizno upravljanje, kjer sanacija posledic ujm določa večino dejavnosti. To nadalje postavlja vprašanje o dolgoročni zmogljivosti slovenskega gozdarstva za izvajanje rednih gozdnogojitvenih del (ukrepa redno in dopolnilno sajenje) pri obnovi gozdov.

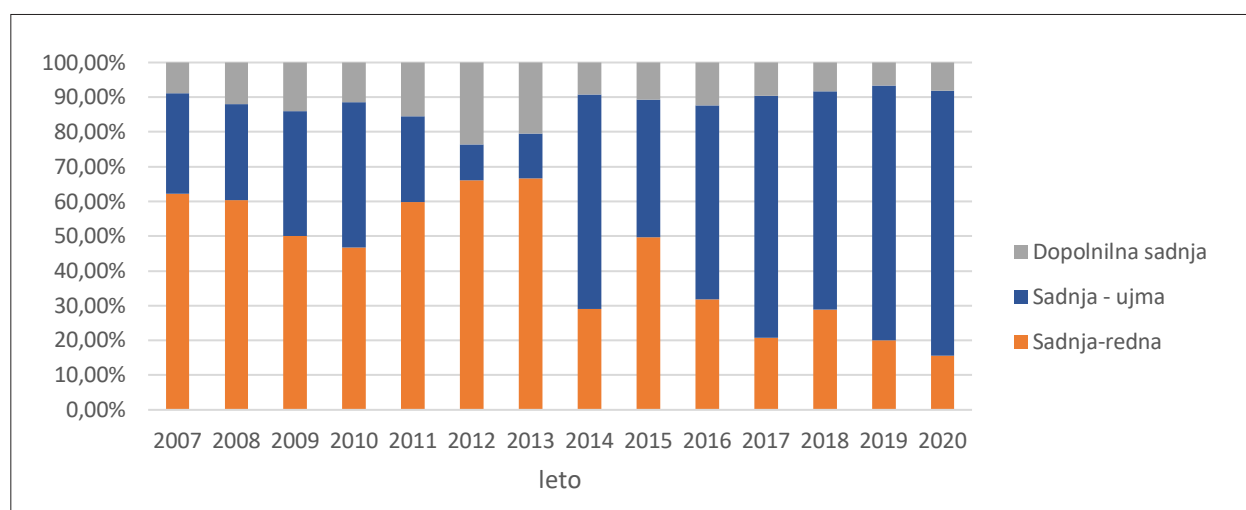
### 3.8 Analiza intenzivnosti obnove gozdov s sajenjem za obdobje od 2007 do 2020 s prikazom po gozdnogospodarskih območjih

Obnova gozdov s sajenjem in/ali setvijo je specifičen ukrep, za katerega se odločimo predvsem na ogolelih površinah. V Sloveniji je bilo v obdobju 2007–2020 s sajenjem skupaj obnovljene 0,50 % površine gospodarskih

Preglednica 6: Prikaz izvedenih ukrepov sajenja v skupnem letnem obsegu sajenja v deležih in po letih

Table 6: Overview of planting measures (Regular planting, Planting after natural disasters, Enrichment planting), shown as percentages within the total scope of restoration with planting by volume and by year

| Leto / ukrep     | Redno sajenje (%) | Sajenje – ujma (%) | Dopolnilno sajenje (%) | Skupaj (%) |
|------------------|-------------------|--------------------|------------------------|------------|
| 2007             | 62                | 29                 | 9                      | 100        |
| 2008             | 60                | 28                 | 12                     | 100        |
| 2009             | 50                | 36                 | 14                     | 100        |
| 2010             | 47                | 42                 | 11                     | 100        |
| 2011             | 60                | 25                 | 16                     | 100        |
| 2012             | 66                | 10                 | 24                     | 100        |
| 2013             | 67                | 13                 | 21                     | 100        |
| 2014             | 29                | 62                 | 9                      | 100        |
| 2015             | 50                | 40                 | 11                     | 100        |
| 2016             | 32                | 56                 | 12                     | 100        |
| 2017             | 21                | 70                 | 10                     | 100        |
| 2018             | 29                | 63                 | 8                      | 100        |
| 2019             | 20                | 73                 | 7                      | 100        |
| 2020             | 16                | 76                 | 8                      | 100        |
| <b>Povprečje</b> | <b>41</b>         | <b>48</b>          | <b>11</b>              | <b>100</b> |



Slika 6: Celoten prikaz ukrepov sajenja v skupnem obsegu obnove s sajenjem po letih v odstotkih

Figure 6: Cumulative planting measures as a share of total restoration with planting, by year, shown as percentages for Regular planting (orange), Planting after natural disasters (blue), and Enrichment planting (gray)

gozdov, kar v povprečju pomeni 0,04 % površine gospodarskih gozdov na leto.

Preglednica 8 prikazuje realizacijo intenzivnosti obnove s sajenjem v GGO na 1.000 ha gospodarskih

gozdov v posameznem GGO. Realizacijo intenzivnosti obnove smo izračunali po formuli: obnova s sajenjem v posameznem GGO (ha) /dejanska površina gospodarskih gozdov v tem GGO (ha) x 1000 ha.

*Preglednica 7: Površina obnove po vrstah sajenja in gospodarskih gozdov s prikazom po GGO in deležem obnove s sajenjem glede na površino gospodarskih gozdov v posameznem GGO*

*Table 7: Area of forest restoration with planting by types (Enrichment planting, Regular planting, Planting after natural disasters, Total), the area of managed forests by forest management regions (GGO) and the share of reforestation with planting per area of managed forests in forest management regions*

| Gozdnogospodarsko območje (GGO) | Dopolnilno sajenje (ha) | Sajenje - redno (ha) | Sajenje - ujma (ha) | Skupaj (ha)     | Površina gospodarskih gozdov (ha) | Delež obnove s sajenjem glede na površino gospodarskih gozdov (%) |
|---------------------------------|-------------------------|----------------------|---------------------|-----------------|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| Tolmin                          | 15,34                   | 146,93               | 111,12              | 273,39          | 121.790,40                        | 0,22                                                              |
| Bled                            | 19,2                    | 33,37                | 182,07              | 234,64          | 44.776,48                         | 0,52                                                              |
| Kranj                           | 27,85                   | 174,12               | 189,99              | 391,96          | 64.216,66                         | 0,61                                                              |
| Ljubljana                       | 33,13                   | 107,52               | 378,09              | 518,74          | 132.982,86                        | 0,39                                                              |
| Postojna                        | 42,57                   | 233,29               | 376,94              | 652,8           | 76.183,67                         | 0,86                                                              |
| Kočevje                         | 9,8                     | 101,98               | 356,75              | 468,53          | 88.018,73                         | 0,53                                                              |
| Novo mesto                      | 15,14                   | 92,3                 | 68,15               | 175,59          | 96.094,22                         | 0,18                                                              |
| Brežice                         | 33,12                   | 79,55                | 101,2               | 213,87          | 68.078,39                         | 0,31                                                              |
| Celje                           | 14,37                   | 127,47               | 45,94               | 187,78          | 71.405,76                         | 0,26                                                              |
| Nazarje                         | 14,62                   | 149,18               | 120,51              | 284,31          | 41.980,94                         | 0,68                                                              |
| Slovenj Gradec                  | 27,79                   | 201,04               | 112,64              | 341,47          | 57.425,16                         | 0,59                                                              |
| Maribor                         | 141,63                  | 249,36               | 255,03              | 646,02          | 92.331,92                         | 0,70                                                              |
| Murska Sobota                   | 210,56                  | 363,91               | 211,19              | 785,66          | 36.548,75                         | 2,15                                                              |
| Kraško                          | 2,27                    | 110,85               | 65,41               | 178,53          | 87.073,70                         | 0,21                                                              |
| <b>Skupaj</b>                   | <b>607,39</b>           | <b>2.170,87</b>      | <b>2.575,03</b>     | <b>5.353,29</b> | <b>1.078.907,64</b>               | <b>0,50</b>                                                       |

*Preglednica 8: Realizirana intenzivnost obnove gozdov s sajenjem glede na površino gospodarskih gozdov s prikazom po posameznih GGO in skupaj za obdobje 2007 – 2020*

*Table 8: Achieved intensity of forest restoration with planting relative to the area of managed forests, by forests management region and total for the period 2007–2020*

| Gozdnogospodarsko območje (GGO) | Dopolnilno sajenje (ha) | Sajenje - redno (ha) | Sajenje - ujma (ha) | Skupaj (ha) |
|---------------------------------|-------------------------|----------------------|---------------------|-------------|
| Tolmin                          | 0,13                    | 1,21                 | 0,91                | 2,24        |
| Bled                            | 0,43                    | 0,75                 | 4,07                | 5,24        |
| Kranj                           | 0,43                    | 2,71                 | 2,96                | 6,10        |
| Ljubljana                       | 0,25                    | 0,81                 | 2,84                | 3,90        |
| Postojna                        | 0,56                    | 3,06                 | 4,95                | 8,57        |
| Kočevje                         | 0,11                    | 1,16                 | 4,05                | 5,32        |
| Novo mesto                      | 0,16                    | 0,96                 | 0,71                | 1,83        |
| Brežice                         | 0,49                    | 1,17                 | 1,49                | 3,14        |
| Celje                           | 0,20                    | 1,79                 | 0,64                | 2,63        |
| Nazarje                         | 0,35                    | 3,55                 | 2,87                | 6,77        |
| Slovenj Gradec                  | 0,48                    | 3,50                 | 1,96                | 5,95        |
| Maribor                         | 1,53                    | 2,70                 | 2,76                | 7,00        |
| Murska Sobota                   | 5,76                    | 9,96                 | 5,78                | 21,50       |
| Kraško                          | 0,03                    | 1,27                 | 0,75                | 2,05        |

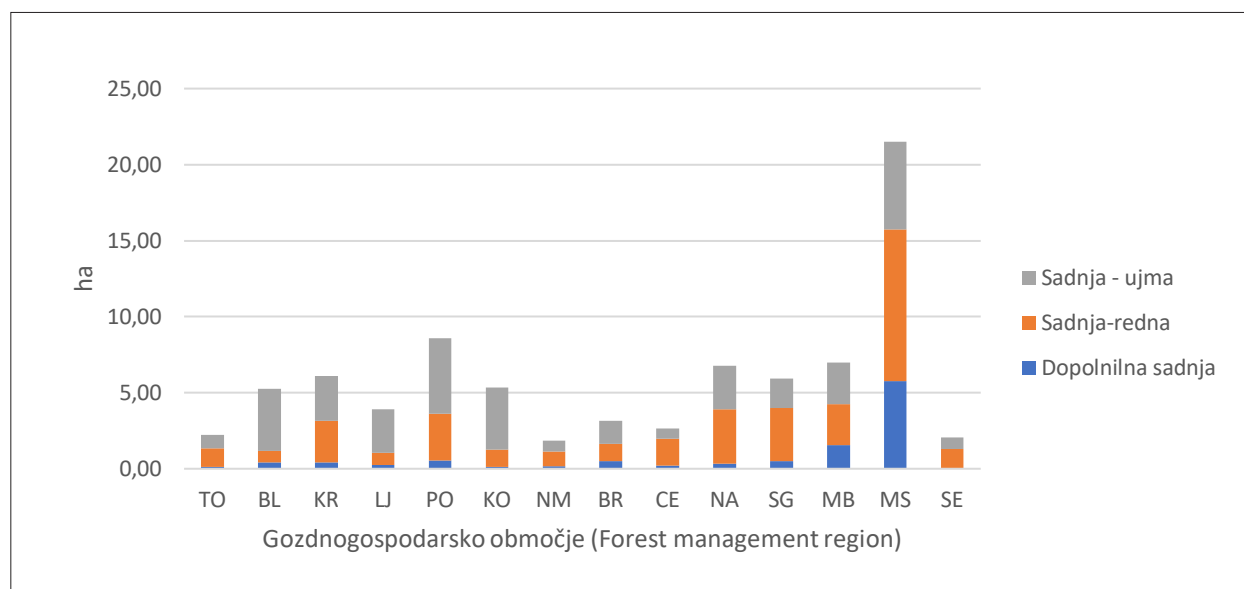
V GGO Murska Sobota je najmanjša površina gozpodarskih gozdov. Je tudi izjema, ki pomembno odstopa od vseh GGO v Sloveniji. GGO Murska Sobota ni le na prvem mestu po posajenih površinah, ampak tudi po intenzivnosti sajenja pomembno odstopa od vseh preostalih območij v Sloveniji. Skupna intenzivnost sajenja v GGO Murska Sobota (21,5 ha/1000 ha) je 2,5-krat večja od drugega najintenzivnejšega območja (Postojna z 8,6 ha/1000 ha) in več kot 11-krat večja od območja z najmanjšo intenzivnostjo (Novo mesto z 1,8 ha/1000 ha). Odstopanja se kažejo v vseh kategorijah sajenja. Intenzivnost ukrepa redno sajenje je skoraj 3-krat večja od naslednjega GGO. Intenzivnost dopolnilnega sajenja pa skoraj 4-krat večja od naslednjega GGO.

V Prekmurju je obnova gozdov s sajenjem očitno osrednji in bistveno pomembnejši gozdnogojitveni ukrep kot kjerkoli drugje v državi. Razlogi so v specifičnih rastiščnih razmerah (nižinski poplavni gozdovi), drevesni sestavi, večji prisotnosti drevesnih vrst s kratkimi obhodnjami (topol, vrba), prisotnosti tujerodnih invazivnih vrst, ki onemogočajo naravni vzrok, večjimi podnebnimi ekstremi, propadanje sestojev črne jelše in jesenov zaradi bolezni ter morda tudi zaradi večje odvisnosti od obnove gozdov s sajenjem.

Intenzivnost obnove po vrstah obnove s sajenjem po GGO na 1000 ha gozpodarskih gozdov v posameznih GGO prikazuje Slika 7.

Podatki kažejo, da v Sloveniji ni enotnega modela, saj se praksa zelo prilagaja lokalnim potrebam. V GGO so različne strateške usmeritve, ki jih določajo predvsem naravne ujme. V proučevanem obdobju lahko Slovenijo glede na strateške usmeritve razdelimo na tri večje skupine GGO, in sicer: skupino GGO, kjer je intenzivnost sajenja po ujmah daleč največja in zelo presega intenzivnost rednega sajenja (Postojna, Kočevje in Bled); skupino GGO, kjer je intenzivnost rednega sajenja večja od sajenja po ujmah (Nazarje, Slovenj Gradec in Celje), in skupino, ki izstopa po zelo majhni intenzivnosti vseh vrst sajenja (Novo mesto, Tolmin in Kraško območje), kar pa ne pomeni nujno tudi manj intenzivnega gospodarjenja, ampak verjetno bolj kaže na gozdove, kjer je naravna obnova uspešnejša ali pa obnova gozdov s sajenjem ni tako pogosto potrebna.

Za razumevanje rezultatov sta ključni Preglednica 8 in Slika 7. Primerjava absolutnih površin obnove gozdov s sajenjem po GGO je lahko zavajajoča. GGO Ljubljana ima na primer veliko absolutno površino sajenja po ujmah, a ker je območje samo zelo veliko, je »intenziv-



Slika 7: Intenzivnosti obnove gozdov z vrstami sajenja glede na površino 1000 ha gozpodarskih gozdov v posameznih GGO s prikazom po gozdnogospodarskih območjih

TO - Tolmin, BL - Bled, KR - Kranj, LJ - Ljubljana, PO - Postojna, KO - Kočevje, NM - Novo mesto, BR - Brežice, CE - Celje, NA - Nazarje, SG - Slovenj Gradec, MB - Maribor, MS - Murska Sobota, SE - Kraško

Figure 7: Intensity of forest restoration by planting types per 1000 ha of managed forests by forest management regions (TO - Tolmin, BL - Bled, KR - Kranj, LJ - Ljubljana, PO - Postojna, KO - Kočevje, NM - Novo mesto, BR - Brežice, CE - Celje, NA - Nazarje, SG - Slovenj Gradec, MB - Maribor, MS - Murska Sobota, SE - Karst; Planting - natural disaster (grey), Planting - regular (orange), Planting - enrichment planting (blue)

nost« takega sajenja relativno povprečna. Šele preračun na 1000 ha gozda (intenzivnost) razkrije pravo sliko in omogoči objektivno primerjavo med regijami. Taka metrika pokaže, kako pomemben je ukrep sajenja znotraj posameznega GGO ne glede na njegovo velikost.

### 3.9 Analiza stroškov obnove gozdov s sajenjem glede na površino po gozdnogospodarskih območjih

Strošek na hektar pri ukrepu sajenja upošteva obnovo s sajenjem na 5.353 ha in skupne stroške (vrednost del, vrednost materiala in strošek dela ZGS) v 14-letnem obdobju 2007–2020. Strošek na hektar pri ukrepu setev upošteva setev na 457 ha in skupne stroške v obravnavanem obdobju (Preglednici 1 in 9).

Odločitev za obnovo s sajenjem ali/in setvijo je kapitalno pomembna in strateška. Primerjava med stroški obnove na površino, ki nastanejo pri ukrepu sajenje, in stroški, ki nastanejo pri ukrepu setev, za 14 GGO skupaj pokaže, da je strošek na hektar pri ukrepu sajenje skoraj šestkrat večji (6.187 EUR/ha) od stroška na hektar pri ukrepu setev (1.036 EUR/ha). V Sloveniji so velike regionalne razlike. Stroški sajenja na hektar so po GGO v razponu od 1 : 1,8. Stroški so največji v GGO Slovenj Gradec (8.563 EUR/ha) in Celje (8.540 EUR/ha), najmanjši pa v GGO Tolmin (4.707 EUR/ha) in Novo mesto (4.987 EUR/ha). To pomeni, da je obnova enega hektarja

gozda s sajenjem v nekaterih regijah skoraj dvakrat dražja kot v drugih.

Dober vpogled v stanje, zakaj so nekatere regije v državi dražje od drugih, omogoča Preglednica 8. Stroški obnove s sajenjem s pripravo tal v referenčnem obdobju 2007–2020 zajemajo približno dve tretjini vseh stroškov v GGO Postojna, GGO Murska Sobota, GGO Tolmin, GGO Kraško in GGO Ljubljana. Približno polovico stroškov sajenja, vključno s pripravo tal, zajemajo stroški v GGO Maribor, GGO Kranj in GGO Nazarje, najmanj pa v GGO Celje, GGO Brežice in GGO Slovenj Gradec, kjer prevladujejo stroški varstva pred divjadjo.

Vzroki za razlike stroškov obnove gozdov s sajenjem v GGO niso enotni. V GGO Celje in Brežice so stroški na hektar veliki predvsem zaradi velikih stroškov dela. V GGO Celje skupni strošek dela znaša kar 5.745 EUR/ha, kar je več kot celotni strošek sajenja v najcenejših regijah. V GGO Slovenj Gradec, ki je najdražja regija, so veliki tako stroški dela kot za material, vendar pa glede na stroške materiala izstopa najbolj v Sloveniji (3.457 EUR/ha). GGO Tolmin in Postojna sta primera regij z majhnimi stroški na hektar, kjer so vse tri komponente stroškov (delo ZGS, delo izvajalcev, material) pod slovenskim povprečjem. V Sloveniji strošek obnove gozda s sajenjem ni enotna postavka, temveč je mozaik, sestavljen tudi iz lokalnih dejavnikov. Razumevanje razlik je bistveno za smotno porabo javnih in zasebnih sredstev ter za realistično načrtovanje obsega obnove v prihodnosti.

Preglednica 9: Stroški obnove gozdov s sajenjem na hektar sadnje po GGO v obdobju 2007 – 2020

Table 9: Costs of forest restoration with planting per hectare by forest management regions (GGO) and shares in period 2007–2020

| 2007-2020                        |                    | Stroški / ha      |                    |                          |                                    |
|----------------------------------|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------------|------------------------------------|
| Gozdno gospodarsko območje (GGO) | Obseg sajenja (ha) | Strošek ZGS (EUR) | Vrednost del (EUR) | Vrednost materiala (EUR) | Skupni stroški na ha sajenja (EUR) |
| Tolmin                           | 273,39             | 990,95            | 1.816,34           | 1.900,04                 | 4.707,33                           |
| Bled                             | 234,64             | 1.173,62          | 2.349,91           | 2.438,39                 | 5.961,92                           |
| Kranj                            | 391,96             | 1.470,03          | 2.367,77           | 2.478,53                 | 6.316,33                           |
| Ljubljana                        | 518,74             | 1.115,80          | 2.159,30           | 2.636,15                 | 5.911,25                           |
| Postojna                         | 652,8              | 976,75            | 2.092,46           | 2.359,03                 | 5.428,23                           |
| Kočevje                          | 468,53             | 1.164,99          | 2.619,52           | 1.850,50                 | 5.635,01                           |
| Novo mesto                       | 175,59             | 1.031,82          | 2.046,61           | 1.908,31                 | 4.986,74                           |
| Brežice                          | 213,87             | 1.626,43          | 3.488,83           | 2.327,38                 | 7.442,65                           |
| Celje                            | 187,78             | 1.825,43          | 3.919,19           | 2.795,56                 | 8.540,18                           |
| Nazarje                          | 284,31             | 1.351,68          | 2.399,34           | 2.187,29                 | 5.938,31                           |
| Slovenj Gradec                   | 341,47             | 1.668,89          | 3.437,52           | 3.456,66                 | 8.563,07                           |
| Maribor                          | 646,02             | 1.403,22          | 3.006,83           | 2.699,60                 | 7.109,65                           |
| Murska Sobota                    | 785,66             | 913,40            | 1.870,29           | 2.834,67                 | 5.618,36                           |
| Kraško                           | 178,53             | 1.071,82          | 2.653,70           | 1.986,84                 | 5.712,36                           |
| Skupaj                           | 5.353,29           | 1.219,10          | 2.479,32           | 2.488,81                 | 6.187,23                           |
| Delež                            |                    | 20%               | 40%                | 40%                      | 100%                               |

## 4 RAZPRAVA

Gozdovi opravljajo paleto funkcij gozda, njihovo trajno zagotavljanje pa je tesno povezano z ohranitvijo njihovega naravnega potenciala. Uspešna obnova gozdov je ključni pogoj za zagotavljanje trajnosti vseh funkcij gozdov. Slovensko gozdarstvo pri gospodarjenju z gozdovi sledi načelom sonaravnega usmerjanja razvoja gozdov, kar zagotavlja tudi veliko genetsko pestrost populacij gozdnega drevja, s tem pa ohranja odpornost proti različnim okoljskim stresorjem, kot so bolezni, škodljivi organizmi in podnebne spremembe. Prevladujoč delež naravne obnove prispeva k večji biotski in genetski pestrosti mladega gozda, hkrati pa zmanjšuje finančne stroške in ekološki odtis, povezan z intenzivno vzgojo sadik v drevesnicah, transportom, sajenjem in zaščito sadik. Pristop sonaravnega gospodarjenja z gozdovi je proaktiven in znanstveno podprt, kar omogoča zagotavljanje dolgoročnega zdravja in vitalnosti slovenskih gozdov. Čeprav je naravna obnova ekonomsko pogosto najugodnejša metoda za vzpostavitev novih generacij gozdov (CHUDY *et al.* 2022) se v praksi vse pogostejše srečujemo s situacijami, ko je treba naravno obnovo dopolniti s sajenjem ali/in setvijo. To še posebno velja za obnovo ogolelih površin po naravnih nesrečah, kot so obsežni žledolomi, snegolomi, vetrolomi, gozdni požari in napadi podlubnikov ter drugih škodljivih organizmov in pojavi novih bolezni. V takšnih primerih so nujni aktivni gozdnogojitveni ukrepi za ohranitev vseh ključnih gozdnih funkcij, ki vključujejo tudi strokovno usmerjanje obnove gozdov s sajenjem in setvijo, izbiro primerenih drevesnih vrst ter njihovih provenienc, pa tudi zagotavljanje in uporabo kakovostnega, zdravega in genetsko pestrega GRM iz gozdnih drevesnic. Obnova gozdov po obsežnih naravnih nesrečah je zato zahteven in dolgotrajen proces, ki ga moramo izvajati načrtno, z natančno določenimi prednostnimi nalogami in jasnimi cilji (ORAŽEM 2017). Proaktivna obnova gozdov, ki terja stalno spremljanje in prilagajanje strategij, da bi zagotovili trajnostni razvoj gozdnega ekosistema, je v praksi pogosto težavna, dolgotrajna, draga in proračunsko omejena (CROUZEILLES *et al.* 2016). Pri načrtovanju in izvajanju ukrepov je treba upoštevati tudi stroške obnove gozdov s sajenjem in setvijo, kar ne vključuje zgolj nabavne cene sadik, temveč tudi stroške vseh dejavnosti, potrebnih za zagotavljanje uspešne rasti in razvoja posajenih rastlin v na novo osnovanih sestojih, kar je obsežen in finančno zahteven postopek.

Za zagotavljanje uspešnosti obnove s sajenjem in setvijo so potrebni nujni ukrepi, ki zajemajo: ustrezno pripravo tal, zagotavljanje rastišča dolgoročno ustreznega GRM, skrbno setev in sajenje zdravega, genetsko prilagojena semena oz. morfološko in fiziološko zelo kakovostne

sadik, redno obžetev, nego z odstranjevanjem konkurenčne vegetacije ter zaščito sadik pred poškodbami. Slednje obsega tako zaščito mladih sadik pred divjadjo (npr. z uporabo zaščitnih ograj, količkov ali odvracal) kot tudi obeleževanje sadik s količki, kar zmanjšuje poškodbe sadik pri obžetvi ali negovalnih ukrepih. Čeprav je preživetje sadik v prvih letih po obnovi gozdov s sajenjem in setvijo pomemben pokazatelj, je to na podlagi izkušenj iz Združenih držav Amerike le prvi pokazatelj potencialne uspešnosti obnove. Končno uspešnost je namreč mogoče določiti le na podlagi vnaprej določenih ciljev obnove, ki vključujejo doseganje želenega deleža izbranega sadilnega materiala, ki v sestoji doseže prevladujoči oziroma dominantni sloj (DEY *et al.* 2008).

V Sloveniji je bilo s sajenjem in setvijo od leta 2007 do vključno leta 2020 obnovljenih 5.810 ha gozdnih površin. Delež sajenja po ujmah se je bistveno povečal po letu 2014, ko je Slovenijo prizadel žledolom, in še bolj leta 2017 po vetrolomu in posledično napadi podlubnikov. Leta 2020 je sajenje po ujmah predstavljalo že 76 % celotnega letnega obsega sajenja. Posledično zmanjševanje deleža rednega sajenja v skupnem letnem obsegu sajenja od leta 2014 naprej nakazuje na premik težišča ZGS k sanaciji poškodovanih območij. To pa nakazuje potrebno pripravo nove strategije obnove za hitro sanacijo in ohranjanje gozdnih ekosistemov s proaktivnim in učinkovitim odzivanjem ZGS na obsežne poškodbe gozdov, vključno z analizo tveganj, in na drugi strani strategije za ohranitev potrebne dinamike redne obnove, ki zagotavlja optimalen razvoj gozdnih sestojev in s tem izkoriščanje proizvodnega potenciala gozdov.

V proučevanem 14-letnem obdobju je bilo v Sloveniji vloženi 33,6 milijona EUR finančnih sredstev. Od skupnega vložka je bilo 95 % stroškov porabljenih za sajenje in varstvo pred divjadjo. Nadalje to pomeni, da je treba za aktivno upravljanje z gozdovi, ki vključuje hitro in usmerjeno obnovo s sajenjem, vključno z zaščito mladih sadik pred poškodbami, ki jih povzroča divjad, zagotoviti dovolj finančnih virov. Za vsako posajeno površino, zlasti na območjih z veliko populacijo divjadi, je potrebno takojšnje in večletno varstvo pred divjadjo, da bi zagotovili preživetje mladja. Velik delež stroškov za zaščito sadik potrjuje ugotovitev, da je divjad pomemben dejavnik, ki vpliva na uspešnost obnove gozdov v Sloveniji (VESELIČ 2017). Za pripravo tal in setev je bistveno manjši delež skupnih stroškov. Pri varstvu pred divjadjo polovico sredstev zajemajo stroški izvajalcev del, kar poudarja delovno intenzivnost ukrepov, kot so postavljanje ograj ali individualna zaščita. Povečanje obsega ukrepov varstva pred divjadjo, ki so jih v najve-

čjem obsegu izvajali v letih 2007 in 2020, sovпада z obdobjema intenzivnejšega sajenja, kar potrjuje nujnost sočasnega izvajanja obeh ukrepov za zagotavljanje uspešnosti obnove, saj je za preprečevanje škode na mladju večino posajenih sadik potrebna zaščita.

Podrobnejša analiza stroškov znotraj posameznih ukrepov razkriva, da so pri sajenju največji delež stroški materiala (sadic). V 14-letnem obdobju je bilo posajenih dvanajst milijonov sadik, pri čemer je bilo listavcev nekaj več kot polovico posajenih sadik in je bilo kar 66 % stroškov za sadike. Razlika v stroških je posledica višje povprečne cene sadik listavcev v primerjavi z iglavci. Prav tako so kontejnerske sadike bistveno dražje od klasičnih, kar dodatno vpliva na stroške obnove. Izbira drevesne vrste in vzgojne oblike sadik so tudi ključni dejavniki pri načrtovanju stroškovno učinkovite obnove.

Veliki stroški pri obnovi gozdov s sajenjem in setvijo ter strateški kompromisi so v Sloveniji postali nova stvarnost, ki jo določajo trije ključni dejavniki: neločljiva povezava med sajenjem in varstvom novo osnovanega mladja pred divjadjo, cenovna dinamika sadilnega materiala ter zahtevni mehanizmi financiranja v zasebnih in javnih gozdovih za hitro ukrepanje na nacionalni ravni.

Povezanost sajenja in varstva bistveno poveča skupne stroške obnove na hektar, zaradi česar sta potrebna skrbna ekonomska presoja in strateško načrtovanje, saj obseg sajenja neposredno določa obseg delovno in kapitalsko intenzivnih varstvenih ukrepov. Ključni dejavnik, ki določa stroške sajenja, je izbira drevesnih vrst. V kontekstu podnebnih sprememb strokovne smernice narekujejo povečanje deleža listavcev in ustvarjanje mešanih sestojev, ki so odpornejši proti prihodnjim motnjam. Vendar pri tem ekološki imperativ trči ob ekonomsko stvarnost. Analiza stroškov gozdnih sadik jasno kaže, da so sadike listavcev v povprečju bistveno dražje od sadik iglavcev. Cenovna razlika bi lahko ustvarila t. i. „ekonomski paradoks odpornosti“. V razmerah, kjer je treba v kratkem času in z omejenimi sredstvi obnoviti velike površine degradiranih gozdov, bo velik ekonomski pritisk za izbiro cenejših sadik. To lahko vodi k odločitvam, ki bodo neposrednem nasprotju z dolgoročnim strateškim ciljem ustvarjanja podnebno odpornih gozdov.

Na področju varstva pred divjadjo obstaja dvojna strategija, ki odraža ekonomski kompromis med stroški in učinkovitostjo. Za splošno zmanjšanje tveganja poškodb mladja zaradi divjadi na velikih površinah je množično v uporabi cenejša zaščita s premazi, medtem ko so kapitalsko intenzivnejši ukrepi, kot so zaščite sadik s tulci in ograjami, primernejši za ciljne, najpomembnejše površine z najvrednejšimi sadikami.

Rezultati analize stroškov so pokazali, da je sajenje sadik skoraj šestkrat dražja od setve, kar nadalje posta-

vlja vprašanje, kako optimizirati prihodnje strategije obnove gozdov. Čeprav se trenutno setev uporablja na manjših površinah, bi bila lahko glede na njeno ekonomičnost, ustrezne ekološke razmere rastišča in razpoložljivost gozdnega semena učinkovitejša alternativa na določenih območjih. Pri setvi je ključno zagotoviti veliko genetsko variabilnost semena in izkoristiti prednosti lokalnih ras GRM. Da bi ohranili domorodne in krajevnim razmeram prilagojene populacije, praviloma ne mešamo semen iz različnih provenienčnih območij. Izjema so ogrožene in redko posamično zastopane drevesne vrste, kjer je za povečanje genetske variabilnosti priporočljivo mešanje semena (Božič & Župančič 1996). Podobno je pri naravnem pomlajevanju, kjer je za zagotavljanje genetske pestrosti populacije priporočljivo izkoristiti obrod več let, kar je povezano z daljšimi pomladitvenimi dobami. V naravi je zadostna heterozigotnost, ki nastane pri križanju med osebki, ki so si glede genetskih zasnov med seboj dovolj različni, zagotovljena s pretokom genov, npr. z izmenjavo peloda ne samo med bližnjimi osebki, temveč tudi med populacijami, ki rastejo razmeroma daleč ena od druge. Pomembni so prilagoditveni aleli, ki so v populaciji zastopani s tako pogostnostjo, ki zagotavlja preživetje populacije, čeprav so samo nosilci enega teh alelov preživetveno sposobni (HATTEMER, BERGMAN & ZIEHE 1993). Take genetske lastnosti populacije lahko v spremenjenih ekoloških razmerah postanejo ključne za uspevanje. Da bi jih ohranjali pri nabiranju semena, je nujno pridobivati seme v odobrenih gozdnih semenskih objektih na čim več drevesih in na dovolj veliki površini.

Rezultati naše študije kažejo, da je uspešna obnova gozda v Sloveniji celovit in finančno zahteven postopek, ki terja stalno spremljanje in prilagajanje strategij. Odvisna je od trdnega zakonodajnega okvira in finančnih virov, skrbnega načrtovanja, učinkovite izvedbe in sodobnih raziskav, ki omogočajo premoščanje vrzeli med akademsko teorijo in prakso pri usmerjanju ukrepov v skladu z najnovejšimi znanstvenimi spoznanji. Praksa na terenu je izjemno heterogena, določajo pa jo predvsem lokalne rastiščne razmere in obseg škode po naravnih ujmah. Strategije obnove temeljijo na regionalnih posebnostih. To spoznanje v Sloveniji poudarja potrebo po optimizaciji prihodnjih strategij obnove gozdov s sajenjem in/ali setvijo z iskanjem stroškovno učinkovitejših metod ob primerljivi uspešnosti obnove. Prepoznavanje regionalnih razlik, razumevanje ekonomskih kompromisov in zavedanje o dolgoročnih posledicah kratkoročnih odločitev so nujni za oblikovanje prožnih in učinkovitih politik obnove gozdov v prihodnosti.

Predstavljena študija temelji na podatkih na nacionalni ravni in ne razlikuje med lastniškimi strukturami gozdov. V zasebnih gozdovih je obseg sajenja in varstva

pred divjadjo odvisen od sredstev vlaganj (okoli 65 % od skupno izvedene obnove s sajenjem oz. setvijo). Pomembna usmeritev za prihodnje raziskave so ločene

analize ukrepov obnove gozdov s sajenjem in setvijo po sektorjih lastništva za primerjavo stroškov z razpoložljivimi sredstvi za vlaganja v gozdove.

## 5 ZAKLJUČKI

Obdobje med letoma 2007 in 2020 je zaznamovala prelomnica za slovensko gozdarstvo, za katero je značilen temeljit prehod od redne obnove gozdov s sajenjem in setvijo k pretežno krizno usmerjenemu odzivanju obnove gozdov po ujmah. Predstavljeni rezultati zagotavljajo s podatki podprto osnovo za prihodnje strateško načrtovanje in poudarjajo ranljivost gozdarskega sistema v dobi stopnjujočih se učinkov podnebnih sprememb.

Rezultati raziskave jasno kažejo na obsežnost in večplastnost procesa obnove gozdov s sajenjem in setvijo v Sloveniji. V prihodnje bo uspešnost obnove gozdov odvisna od odzivnosti na naravne ujme, ki zaradi podnebnih sprememb postajajo vse pogostejše in intenzivnejše. Take razmere terjajo hitro prilagajanje in ukrepanje tako ZGS kot tudi gozdnih drevesnic.

Analiza je izpostavila obnovo s sajenjem kot primarno metodo obnove s sajenjem in setvijo, kar posledično prinaša velike stroške, še posebno zaradi cen sadik in izdatkov za njihovo varstvo pred divjadjo. Prav tako so bile opažene regionalne razlike v obsegu in stroških obnove, kar nakazuje na nujnost prilagojenih in lokalno specifičnih strategij.

Za prihodnost obnove slovenskih gozdov v spremenjajočih se razmerah okolja bo imela pomembno vlogo nadaljnja optimizacija strategije obnove gozdov. Obli-

kovati je treba ciljne finančne spodbude, ki bodo nevtralizirale večje stroške sadik podnebno odpornejših drevesnih vrst in njihovih provenienc. To bi lahko vključevalo diferencirane stopnje sofinanciranja, ki bi izrazito uveljavljale sajenje listavcev in mešanih sestojev. Prihodnji finančni mehanizmi za obnovo gozdov bi morali biti zasnovani prožneje in tehnološko nevtralnno. Vključiti bi morali podporo za širši nabor gozdnogojitvenih orodij, vključno s setvijo, kjer je le-ta ekološko in ekonomsko upravičena.

Čeprav je krizno delovanje v času ujme neizogibno, je dolgoročni cilj zmanjšanje odvisnosti od njega. To terja večje naložbe v proaktivne in sistematične ukrepe za krepitev odpornosti gozdov, s čimer se zmanjša verjetnost prihodnjih obsežnih motenj in s tem povezanih velikih stroškov sanacije.

Zaradi vse pomembnejše javne vloge, ki jo imajo gozdovi pri prizadevanjih za blažitev podnebnih sprememb in zagotavljanju drugih ekosistemskih storitev, bi k optimizaciji sistemov obnove (s sajenjem in setvijo) lahko prispevali tudi z uvedbo fiskalnih spodbud, kot so nižje davčne stopnje. Le s takšnim celostno učinkovitim in proaktivnim pristopom bo mogoče zagotoviti učinkovito in trajnostno obnovo slovenskih gozdov, ki bodo kos izzivom prihodnosti.

## 7 SUMMARY

In this study, we comprehensively analysed the scope and costs of forest restoration with planting and sowing, and measures for protecting restored areas against game damage in Slovenia between 2007 and 2020. The data was obtained from the official records of the Slovenian Forest Service (SFS).

In the 14-year period, €33,595,188 was spent on artificial forest restoration. The main costs were for restoration with planting (53% or €17,943,174) and protection against game damage (42% or €13,966,923), while soil preparation (4%) and sowing (1%) contributed a smaller share. For planting, the largest cost was materials (seedlings) (55%), followed by contractors (30%) and SFS work (15%). For protection against game damage, more than half of the costs (50%) went to contractors, with the

remainder for materials (25%) and SFS work (25%). Overall, the costs of materials for planting and sowing represented the largest share (30%) of all restoration costs.

In the analyzed period, the SFS carried out planting on 5,353 hectares of forest area, most of which was after natural disasters (2,575.03 ha). Sowing was carried out on a significantly smaller area, only 457 hectares, predominantly after natural disasters (425.24 ha). 61% of the areas restored with planting (approximately 3,300 ha) were protected from wildlife. Regional differences were noted in the scope of planting, with the largest planted area in the Murska Sobota forest management region (785.66 ha) and the smallest in the Novo mesto forest management region (175.59 ha). In total, 0.50% of

the area of managed forests in Slovenia was restored with planting.

The analysis also revealed a significant impact of natural disasters on the scope of planting. After the sleet storm in 2014 and the windthrow in 2017, the share of planting after disasters increased significantly, representing as much as 76% of the total annual planting scope in 2020. Accordingly, the share of regular planting has been decreasing since 2014.

In the 14-year period, a total of 12,089,487 trees were planted, with a slightly higher number of broadleaves trees (51%) than conifers (49%). The average price of a classic bare-root broadleaves seedling was €1.19, and €0.52 for conifers. Container seedlings were significantly more expensive (€1.96 for broadleaves trees, €1.67 for conifers). The cost of forest restoration is mainly influenced by the type of tree seedling (broadleaves trees are twice as expensive), the type of seedling (container seedlings are twice as expensive), and the type of protection against game damage.

A comparison of per-hectare costs showed that planting is significantly more expensive (€6,187/ha) than sowing (€1,036/ha). Per-hectare planting costs ranged from €4,707 in the Tolmin forest management region to €8,563 in the Slovenj Gradec forest management region.

The research results clearly demonstrate the complexity and future challenges in forest restoration using planting and sowing in Slovenia. The success of future forest restoration will depend on our responsiveness to natural disasters, which are becoming more frequent and intense due to climate change. These conditions demand rapid adaptation and action from both the public services (SFS) and forest nurseries.

The analysis highlighted planting as the primary method of artificial restoration, which consequently en-

tails high costs, particularly due to seedling prices and expenses for their protection against game damage. Regional differences in the scope and costs of restoration were also observed, indicating the necessity for tailored and locally specific strategies.

For the future of Slovenian forest restoration under changing environmental conditions, the further optimization of the forest restoration strategy will play a crucial role. It is necessary to formulate targeted financial incentives that will offset the higher costs of seedlings of more climate-resilient tree species and their provenances. This could include differentiated co-financing rates that would strongly favor the planting of deciduous trees and mixed stands. Future financial mechanisms for forest restoration should be designed to be more flexible and technologically neutral. They should include support for a broader range of silvicultural tools, including sowing, where it is ecologically and economically justified.

Although crisis management during natural disasters is unavoidable, the long-term goal is to reduce dependence on it. This requires increased investment in proactive and systematic measures to enhance forest resilience, thereby reducing the likelihood of future large-scale disturbances and the associated high costs of remediation.

Due to the increasingly important public role that forests play in efforts to mitigate climate change and provide other ecosystem services, the implementation of fiscal incentives, such as reduced tax rates, could also contribute to the optimization of restoration systems (through planting and sowing). Only with such a comprehensively effective and proactive approach will it be possible to ensure the efficient and sustainable restoration of Slovenian forests, enabling them to meet the challenges of the future.

## ZAHVALA – ACKNOWLEDGEMENTS

Delo je financiralo Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano RS in Agencija RS za znanstvenoraziskoval-

no in inovacijsko dejavnost (ARIS) v okviru projektov CRP V4-1819 in CRP V4-2222 ter programa P4-0107.

## LITRATURA – REFERENCES

- BOŽIČ, G., MINIĆ VIDRIH, M., BREZNIKAR, A. & KRAIGHER, H. 2021: Analiza obnove gozdov s sadnjo in setvijo v Sloveniji: obseg sadnje in stroški obnove gozdov. Zaključno poročilo. CRP V4-1819. Gozdarski inštitut Slovenije, Ljubljana.
- BOŽIČ G. & ŽUPANČIČ, M. 1996. Naloge gozdne genetike. *Gozdarski vestnik*, 54(3): 182–183.
- CHUDY, R., CUBBAGE, F., SIRY, J. & CHUDY, J. 2022: The profitability of artificial and natural regeneration: A forest investment comparison of Poland and the U.S. South. *J. For. Bus. Res.* 1(1): 1–20.

- CROUZEILLES, R., CURRAN, M., FERREIRA, M. S., LINDENMAYER, D. B., GRELLE, C. E. V. & REY BENAYAS, J. M. 2016: A global meta-analysis on the ecological drivers of forest restoration success. *Nature Communications* 7. DOI:10.1038/ncomms11666
- DE GROOT, M., HAUPTMAN, T., JURC, M., & OGRIS, N. 2018: Upravljanje s populacijami smrekovih podlubnikov v območjih naravnih ujm. *Gozdarski vestnik*, 76(4):163–176.
- DEY, D. C., DOUGLASS, J., McNABB, K., MILLER, G., BALDWIN, V. & FOSTER, G. 2008: Artificial regeneration of major oak (*Quercus*) species in the Eastern United States – a review of the literature. *Forest Science* 54(1): 77–106. DOI: 10.1093/forestscience/54.1.77
- DIACI, J., FIDEJ, G., NAGEL, T. A., ROŽENBERGAR, D., ADAMIČ, T., BRUS, R., ŠINKO, M., KRČ, J., ČATER, M., KOLMANIČ, S., ARNIČ, D., VRABIČ, L., MENCINGER, V., PAVLIN, J., KOCJAN, D. & ISKRA, M. 2017: Presoja in optimizacija načrtovanja in izvajanja nege mladega gozda v Sloveniji. Ljubljana.
- GRECS, Z. 1996: Obnova gozdov s saditvijo – korak k višji kakovostni ravni gozdarske operativne stroke. *Zbornik gozdarstva in lesarstva* 51: 133–143.
- HATTEMER H. H., BERGMANN F. & ZIEHE, M. 1993: Einführung in die Genetik fuer Studierende der Forstwissenschaft: 492 str.
- KERMAVNAR, J., KUTNAR, L. & PINTAR, A. M. 2023: Ecological factors affecting the recent *Picea abies* decline in Slovenia: the importance of bedrock type and forest naturalness. *iForest - Biogeosciences and Forestry*, 16(2): 105–115.
- KOVAČ, M., BOŽIČ, G., FERREIRA, A., KUŠAR, G. & MALI, B. 2024. A five-step framework for creating forests for the future. *Forests* 15(6): 1-17. DOI: 10.3390/f15060912.
- KRAIGHER, H., KRAJNC, A., TORELLI, N. & ZUPANČIČ, M. 2017: Povzetek in zaključki znanstvenega srečanja GOZD in LES: Sistemski problemi obnove gozdov. *Gozdarski vestnik* 75(4): 224–225.
- KRAIGHER, H., BAJC, M., BOŽIČ, G., BRUS, R., JARNI, K. & WESTERGREN, M. 2019: Forests, Forestry and the Slovenian Forest Genetic Resources Programme. In: *Forests of Southeast Europe under a changing climate: Conservation of genetic resources. Advances in Global Change Research*. Springer International Publishing, Cham. DOI: 10.1007/978-3-319-95267-3
- KRAJČIČ, D. 1999: Obseg bioloških vlaganj v gozdove v Sloveniji. *Zbornik gozdarstva in lesarstva* 59: 33–54.
- NAGEL, T. A., FICKO, A. & ROŽENBERGAR, D. 2019. Forest management and research in a rapidly changing world: A case study from Slovenia. *Forestry: An International Journal of Forest Research*, 92(5): 531-541.
- ORAŽEM, D. 2017: Sanacija gozdov po katastrofah in Zavod za gozdove Slovenije. *Gozdarski vestnik*, 75(4):179-183.
- PERKO, F. 2019: Obnova, tudi s pomočjo sajenja, je pogoj za ohranjanje trajnosti vseh vlog slovenskih gozdov. *Gozdarski vestnik* 77(3): 30–134.
- Pravilnik o financiranju in sofinanciranju vlaganj v gozdove 2004: Ur. l. RS 2004-2311-0182.
- RANTAŠA, B. & KRAIGHER, H. 2023: Primerjalna študija o financiranju in dolgoročnem napovedovanju potreb po GRM med posameznimi evropskimi državami. <https://www.zdravgozd.si/dat/dogodki/234.pdf>.
- VESELIČ, Ž. 2017: Nezadovoljivo pomlajevanje zaradi preveč številne rastlinojede divjadi je največja grožnja ohranitve slovenskih gozdov. *Gozdarski vestnik*, 75(9): 383–397.
- WESTERGREN, M., BOŽIČ, G. & KRAIGHER, H. 2017: Trendi v gozdnem semenarstvu in drevesničarstvu v Sloveniji. *Gozdarski vestnik*, 75(4): 184–191.
- Zakon o gozdovih 1993: Ur. l. RS.
- Zavod za gozdove Slovenije 2017: Poročilo Zavoda za gozdove Slovenije o gozdovih za leto 2016. Ljubljana: ZGS.
- Zavod za gozdove Slovenije 2019: Načrt sanacije gozdov poškodovanih v žledolomu 30. 1.–10. 2. 2014 s spremembami in dopolnitvami v letu 2019. [https://www.zgs.si/assets/uploads/files/vsebine/2/3/9/nacrt\\_sanacije\\_zled\\_podlubniki\\_2014-2019.pdf](https://www.zgs.si/assets/uploads/files/vsebine/2/3/9/nacrt_sanacije_zled_podlubniki_2014-2019.pdf); Ljubljana: ZGS.
- Zavod za gozdove Slovenije 2023: Poročilo Zavoda za gozdove Slovenije o gozdovih za leto 2022. Ljubljana: ZGS.
- Zavod za gozdove Slovenije 2025: Poročilo Zavoda za gozdove Slovenije o gozdovih za leto 2024. Ljubljana: ZGS.



## NAVODILA AVTORJEM

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

### 1. ZNANSTVENA RAZPRAVA

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

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

Dolžina razprave, vključno s tabelami, grafikoni, slikami ipd., ne sme presegati 3 avtorskih pol oziroma 45 strani tipkopisa. Zaželeno so razprave v obsegu ene avtorske pole oziroma do dvajset strani tipkopisa.

Razpravo ocenjujeta vsaj dva recenzenta.

Razprava gre v tisk, ko jo na predlog urednika sprejme uredniški odbor

### 2. PREGLEDNI ČLANEK

Pregledni članek objavljamo po posvetu urednika z avtorjem. Na predlog urednika ga sprejme uredniški odbor. Članek naj praviloma obsega največ 3 avtorske pole oziroma do 45 tipkanih strani.

### 3. NOVOSTI

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

### 4. IZVIRNOST PRISPEVKA

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

### 5. JEZIK

Razprava ali članek sta lahko pisana v slovenščini ali angleščini.

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

### 6. POVZETEK

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

### 7. IZVLEČEK

Izvleček (praviloma dolg do 300 besed) mora podati jedrnat informacijo o namenu in zaključkih razprave ali članka. Napisan mora biti v slovenskem in angleškem jeziku.

### 8. KLJUČNE BESEDE

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

### 9. NASLOV RAZPRAVE ALI ČLANKA

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

### 10. NASLOV AVTORJA/AVTORJEV

Pod ključnimi besedami spodaj je naslov avtorja/avtorjev, in sicer akademski naslov (če obstaja, t.j. dr., ali mag.), ime, priimek, ustanova, mesto z oznako države in pošto številko, država, in elektronski poštni naslov.

### 11. UVOD

Uvod se mora nanašati le na vsebino razprave ali članka. Vsebovati mora cilje prispevka oziroma raziskave.

### 12. ZAKLJUČKI ALI SKLEPI

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

### 13. ZAHVALE

Priporočeno je v zahvali navesti vse pomočnike in financirje avtorjev in raziskave.

### 14. TABELE, TABLE, GRAFIKONI, SLIKE IPD.

Tabele, table, grafikoni, slike ipd. v razpravi ali članku naj bodo jasne, njihovo predlagano mesto mora biti nedvoumno označeno, njihovo število naj racionalno ustreza vsebini.

Spremno besedilo, podnapisi, napisi, naslov in legenda naj bodo napisani v slovenskem in angleškem jeziku.

Slike, ilustracije, grafikoni, tabele ipd. v **bitnem zapisu** naj v imenu datoteke vsebujejo naslov ali avtorja članka in zaporedno številko v članku (npr. I Kreft\_Figure 01). Priložene naj bodo tudi kot samostojne datoteke. V imenih datotek ne uporabljajte prepovedanih znakov kot so „./“. Za ločevanje besed v imenu datoteke poleg presledkov uporabljajte znaka - ali \_. Oddane naj bodo v \*.JPG zapisu z minimalno kompresi-

jo (maximum ali high - visoka kakovost). Ločljivost bitnih datotek naj bo **300 DPI/inch pri 1:1** želeni velikosti uporabe v publikaciji (širina obeh stolpcev v publikaciji je 165 mm, enega stolpca pa 79 mm). Če publikacija izide samo v digitalni obliki, je zadostna velikost bitnih datotek **72 DPI/inch pri 1:1** želeni velikosti uporabe v publikaciji. Barvnega okolja **RGB** na spreminjajte v **CMYK** barvno okolje, to bodo storili izvajalci.

Grafikoni, risbe, ilustracije ipd. v **vektorskem zapisu** naj bodo oddani v **\*.EPS, \*.SVG, \*.PDF** ali **\*.AI** formatu. Ločljivost pri vektorskem zapisu ni pomembna, saj je tako datoteko mogoče povečevati do neskončnosti brez izgube kvalitete.

Pri fitocenoloških tabelah se tam, kjer se posamezna rastlinska vrsta, sicer vpisana v tabelo, ne pojavlja, natisne pika.

## 15. LITERATURA IN VIRI

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

Literaturo uredimo po abecednem redu. Imena avtorjev pišemo v velikih tiskanih črkah:

### – Razprava ali članek:

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

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

UNUK T & T GREBENC 2017: Silver fir (*Abies alba* Mill.) ectomycorrhiza across its areal – a review approach / Ektomi-

korizni simbionti bele jelke (*Abies alba* Mill.) na naravnem območju razširjenosti – pregled. Folia Biol Geol 58: <https://doi.org/10.3986/fbg0025>

### – Knjiga:

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

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

### – Elaborat ali poročilo:

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

### – Atlasi, karte, načrti ipd.:

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

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

Za vire veljajo enaka pravila kot za literaturo. Pri elektronskih virih se vpiše datum dostopa.

Pri vseh navedbah literature dodamo doi oznako, če v originalu obstaja in sicer v obliki: <https://doi...> In ne v obliki DOI....

## 16. ZNANSTVENA (LATINSKA) IMENA TAKSONOV

Znanstvena (latinska) imena rodov, vrst in infraspecifičnih taksonov se pišejo v kurzivi. V fitocenoloških razpravah ali člankih se vsi sintaksoni pišejo v kurzivi.

## 17. FORMAT IN OBLIKA RAZPRAVE ALI ČLANKA

Članek naj bo oddan v formatu **\*.docx, \*.doc, \*.rtf, \*.txt**, ali **\*.odt** z medvrstičnim razmikom 1,15 na A4 (ISO 216) formatu. Uredniku je treba oddati izvirnik članka. Za boljšo informacijo izvajalcem lahko priložite še \*.PDF datoteko članka z umeščenimi slikami, grafi, tabelami, risbami ipd. na želena mesta v članku, ki jih bomo upoštevali, kolikor je mogoče. Tabele in slike v bitnem zapisu naj bodo posebej priložene besedilu. Materiale do skupne velikosti 20 MB posredujte uredniku na njegov elektronski naslov. Pred pošiljanjem lahko datoteke stisnete z brezplačnim programom ZIP, ki je del operacijskega sistema Windows. Če materiali kljub vsemu presegajo skupno velikost 20 MB, jih lahko pošljete preko katere od brezplačnih spletnih aplikacij (npr. WeTransfer).

## INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

*Folia biologica et geologica* is a scientific periodical of the Class IV: Natural sciences that publishes original scientific results and review articles referring mainly to life and earth sciences studies in the Slovenian ethnic region, as well as in Europe and worldwide, which are of importance or necessary for comparison to our researches.

### 1. ORIGINAL SCIENTIFIC PAPER

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

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

The original scientific paper should not be longer than 45 pages, including tables, graphs, figures and others. The preferred length of the manuscript is 20 pages.

The submitted texts are reviewed by two reviewers.

The reviewed manuscript shall be published when adopted upon the proposal of the editor in chief by the editorial board.

### 2. REVIEW ARTICLE

On consultation of the author with the editor in chief, the review article can be accepted for publication by the editorial board. Preferably, it should not be longer than 45 pages.

### 3. NEWS

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

### 4. NOVELTY OF THE CONTRIBUTION

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

### 5. LANGUAGE

The article may be written in Slovenian or in English language.

The author should provide the translation into Slovenian language and corresponding language editing, unless otherwise agreed by the editorial board.

### 6. SUMMARY

When the article is written in Slovenian, the summary should be in English. When they are in foreign language, the summary should be in Slovenian. It should be extensive enough, so that the contents are clear and understandable to domestic and foreign reader. It should give the information about the aims, methods, results, and conclusions of the article. It should not be longer than 10 to 20% of the article itself.

### 7. ABSTRACT

It should give concise information about the aims and conclusions of the article, preferably in up to 300 words. It must be written in English and Slovenian.

### 8. KEY WORDS

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

### 9. TITLE OF ARTICLE

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

### 10. ADDRESS OF AUTHOR/AUTHORS

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

### 11. INTRODUCTION

Its contents should refer to the purports of the article only. It should include the aims of the study presented.

### 12. CONCLUSIONS

Conclusions ought to include the synthesis of the aims resolved or indicate the problems of the research.

### 13. ACKNOWLEDGEMENTS

It is recommended to list all assistants and funders of the authors and research in the acknowledgements.

### 14. TABLES, GRAPHS, FIGURES, ETC.

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

The accompanying text, subtitles, captions, title and legend should be written in Slovenian and English.

Images, illustrations, charts, tables, etc. in bitmap format should contain the title or author of the article and the serial number in the article in the file name (e.g. I Kreft\_Figure 01). They should also be attached as separate files. Do not use prohibited characters such as ., / in file names. To separate words in the file name, use the character - or \_ in addition to spaces. They should be submitted in \*.JPG format with minimal compression (maximum or high - high quality). The resolution of

bitmap files should be **300 DPI/inch at 1:1** the desired size for use in the publication (the width of both columns in the publication is 165 mm, and one column is 79 mm). If the publication is published only in digital format, a sufficient bitmap file size of **72 DPI/inch at 1:1** the desired size for use in the publication is sufficient. **Do not change the RGB** color space to the **CMYK** color space, this will be done by the journal personnel.

Graphs, drawings, illustrations, etc. **in vector format** should be submitted in **\*.EPS, \*.SVG, \*.PDF or \*.AI** format. Resolution is not important in vector format, as the file can be enlarged to infinity without loss of quality.

In phytocenological tables, a dot is printed where an individual plant species, otherwise entered in the table, does not appear.

## 15. LITERATURE AND SOURCES

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

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

### – Article:

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

UNUK T & T GREBENC 2017: Silver fir (*Abies alba* Mill.) ectomycorrhiza across its areal – a review approach / Ekto-mikorizni simbionti bele jelke (*Abies alba* Mill.) na naravnem območju razširjenosti – pregled. Folia Biol Geol 58: <https://doi.org/10.3986/fbg0025>

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

### – Book:

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

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

### – Elaborate or report:

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

### – Atlases, maps, plans, etc.:

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

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

The same rules hold for sources. For electronic sources, the access date is entered.

For all literature references, we add the doi code, if it exists in the original, in the form: <https://doi...> and not in the form DOI....

## 16. LATIN NAMES OF TAXA

Latin names for genera, species, and infraspecific taxa are to be written in *italics*. All syntaxa written in phytocenological articles are to be in *italics*.

## 17. SIZE AND FORM OF THE ARTICLE

The article should be submitted in **\*.docx, \*.doc, \*.rtf, \*.txt, or \*.odt** format with 1.15 line spacing on A4 (ISO 216) format. The original article must be submitted to the editor. For better information for the editors, you can also attach a \*.PDF file of the article with images, graphs, tables, drawings, etc. placed in the desired places in the article, which will be taken into account as much as possible. Tables and images in bitmap format should be attached separately to the text. Materials up to a total size of 20 MB should be sent to the editor's email address. Before sending, you can compress the files with the free ZIP program, which is part of the Windows operating system. If the materials nevertheless exceed a total size of 20 MB, you can send them via one of the free online applications (e.g. WeTransfer).

FOLIA BIOLOGICA ET GEOLOGICA 66/2 - 2025  
Slovenska akademija znanosti in umetnosti v Ljubljani

Grafična priprava za tisk: Medija grafično oblikovanje, d.o.o.  
Tisk: Abo Grafika d.o.o.

Ljubljana  
2025

# FOLIA BIOLOGICA ET GEOLOGICA = Ex RAZPRAVE IV. RAZREDA SAZU

ISSN 1855-7996 · LETNIK / VOLUME 66 · ŠTEVILKA / NUMBER 2 · 2025

ISSN 1855-7996 | 25,00 €



9

771855

799005



## VSEBINA / CONTENTS

### RAZPRAVE / ESSAYS

*Tina Unuk Nahberger*

Plant growth promoting microorganisms: a promising tool for improving forest tree seedlings survival  
(a review)

Rastlinam koristni mikroorganizmi: obetavno orodje za izboljšanje preživetja gozdnih sadik  
(pregledni članek)

*Kristina Andrejc, Maša Jarčič, Ion Gutierrez-Aguirre, Denis Kutnjak, Katarina Bačnik*

Viromska analiza rna virusov v vzorcih Triglavskega ledenika in ledenika pod Skuto  
Viromics analysis of RNA viruses in samples from the Triglav and Skuta glacier

*Gregor Božič, Marijana Vidrih Minić, Boris Rantaša, Andrej Breznikar*

Obseg opravljenih del in stroškov obnove gozdov s sajenjem in setvijo ter ukrepov varstva  
pred poškodbami po divjadi v obdobju 2007–2020

The extent of labour and costs of forest restoration with planting, sowing, and protection measures  
against game damages in Slovenia in the period 2007-2020