

UNIVERZITET U BEOGRADU

ŠUMARSKI FAKULTET

Jelena S. Lazarević

**EKTOMIKORIZA ČETINARSKIH VRSTA
DRVEĆA U CRNOJ GORI SA POSEBNIM
OSVRTOM NA MIKORIZU MUNIKE –
PINUS HELDREICHII CHRIST.**

doktorska disertacija

Beograd, 2013.

UNIVERSITY IN BELGRADE

FACULTY OF FORESTRY

Jelena S. Lazarević

**ECTOMYCORRHIZA OF CONIFEROUS TREE
SPECIES IN MONTENEGRO WITH SPECIAL
ATTENTION TO MYCORRHIZA OF
PINUS HELDREICHII CHRIST.**

Doctoral Dissertation

Beograd, 2013.

Mentor:

Prof.Dr Nenad Keča, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu
Šumarski fakultet

Članovi komisije:

Dr Vesna Golubović - Čurguz, docent
Univerzitet u Beogradu
Šumarski fakultet

Dr Dragana Stojičić, docent
Univerzitet u Nišu
Prirodno-matematički fakultet, Departman za biologiju i ekologiju

Datum odbrane:

Rad na ovoj doktorskoj disertaciji odvijao se često pod otežanim uslovima i sa dosta neizvesnosti. Međutim, tokom tog vremena imala sam veliku pomoć porodice, prijatelja i kolega. Svima njima se iskreno zahvaljujem.

Pre svega, zahvaljujem se Dr Nenadu Keči, koji je rukovodio izradom ove doktorske disertacije i koji je svojim sugestijama, savetima i stručnim mišljenjem doprineo njenom kvalitetu.

Zahvaljujem se kolegama sa Biotehničkog fakulteta u Podgorici, koji su mi omogućili da u svom radu koristim njihove laboratorije i opremu.

Zahvaljujem se Dr Rimvysu Vasaitisu koji mi je omogućio pristup laboratoriji Odseka za šumsku mikologiju i fitopatologiju Fakulteta za prirodne resurse i poljoprivredne nauke u Upsali (Švedska), gdje su realizovane aktivnosti na molekularnoj identifikaciji gljiva iz biljnog materijala.

Na svakodnevnoj podršci i pomoći u rešavanju problema zahvaljujem se Olgici i Branislavu Perić, kao i Ani Topalović.

EKTOMIKORIZA ČETINARSKIH VRSTA DRVEĆA U CRNOJ GORI
SA POSEBNIM OSVRTOM NA MIKORIZU MUNIKE
- *PINUS HELDREICHII* CHRIST.

Izvod

Mikoriza predstavlja zajednicu između grupe gljiva koje žive u zemljištu i korena viših biljaka. Mikoriza se javlja u svim terestričnim ekosistemima i ima važnu ulogu u usvajanju hranljivih materija. Osim toga, biljke sa mikorizom su otpornije na bolesti i sušu. Ektomikoriza je tip mikorizne simbioze karakterističan za drveće iz familija *Betulaceae*, *Pinaceae*, *Fagaceae* i *Salicaceae*, koje predstavlja ekološki i ekonomski najznačajnije drvenaste vrste, dominantne u borealnim, mediteranskim šumama i šumama umerenog pojasa.

Analiza diverziteta i rasprostranjenja ektomikorize je značajna za razumevanje njene ekološke uloge. Na osnovu objavljenih podataka, dosadašnjim istraživanjima je u Crnoj Gori zabeleženo 48 rodova ektomikoriznih gljiva: 12 rodova Ascomycota (50 taksona) i 38 rodova Basidiomycota (267 taksona), što predstavlja oko trećinu makromiceta zabeleženih u Crnoj Gori.

Munika (*Pinus heldreichii* Christ.), tercijalni relik i subendemit, predstavlja jedan od najinteresantnijih elemenata dendroflora Balkana. Zajednice gljiva u šumama munike su slabo istražene, dok ektomikorizne zajednice munike nisu do sada opisivane, niti potvrđene. Zbog svoje ekološke plastičnosti munika se može koristiti za pošumljavanje ekstremnih terena. U tom smislu pažnju zavređuju i ektomikorizne gljive koje opstaju baš na ovakvim staništima.

Cilj ove doktorske disertacije bio je upoznavanje sa ektomikoriznim zajednicama munike, kao i ispitivanje mogućnosti primene i korišćenja autohtonih ektomikoriznih gljiva u rasadničkoj proizvodnji četinara.

Formirana je kolekcija koja je sadržala oko 40 kultura pretpostavljeno ektomikoriznih gljiva sa prostora Crne Gore, koje su korišćene u daljim istraživanjima.

Upotrebom različitih metoda inokulacije u laboratorijskim uslovima ostvarena je ektomikoriza između munike i 18 vrsta gljiva.

Upotrebom molekularnih metoda izvršena je genetička karakterizacija pojedinih kultura ektomikoriznih gljiva. U Banku Gena NCBI deponavane su 22 sekvence gljiva od kojih 20 pripada mikoriznim vrstama. Na ovaj način su genetički okarakterisane gljive iz 10 ektomikoriznih rodova : *Amanita*, *Boletus*, *Hebeloma*, *Lactarius*, *Russula*, *Suillus*, *Tricholoma*, *Pisolithus*, *Scleroderma*, kao i *Chalciporus* i *Hypholoma*.

Upotrebom restrikcionih enzima *Hinf* I, *Alu* I, *Mbo* I, *Bsur*, *EcoR* I i *Rsa* I dobijeni su restrikcioni šabloni za 25 vrste ektomikoriznih gljiva koji mogu poslužiti za njihovo praćenje.

Karakterizacija ektomikoriznih zajednica munike, obavljena molekularnom analizom korena, na dva lokaliteta sa različito razvijenim zemljištem, pokazuje da se one razlikuju po sastavu i strukturi.

U pionirskoj zajednici munike sa gotovo potpuno nerazvijenim zemljištem, na uzorcima korena identifikovano je 11 različitih morfotipova iz kojih je izolovano je 29 ektomikoriznih taksona. Ektomikoriznom zajednicom munike na ovom staništu dominiraju vrste iz rodova *Suillus*, *Rhizopogon*, *Amphinema*, *Tomentela*, *Willcoxina*, *Sebacine*, *Pseudotomentella*, *Lactarius*, *Tricholoma*, *Inocybe*.

U klimatogenoj zajednici munike na razvijenom smeđem zemljištu na krečnjacima, u uzorcima korena identifikovano je 7 različitih morfotipova, odakle je izolovan 21 mikorizni takson. Ovde dominiraju *Amphinema* taksoni, a zatim *Tomentella*, *Sebacine*, *Pseudotomentella*, *Suillus*, *Russula*, *Lactarius*.

Ispitivanja fizioloških karakteristika *Chalciporus ammarelus* (Quel) Bataile, *Lactarius deliciosus* (L.) Gray, *Russula sanguinaria* (Schumach.) Rauschert, *Suillus granulatus* (L.) Rousell, *Suillus collinitus* (Fr) Kuntze, *Tricholoma batchii* Gulden, *Tricholoma imbricatum* (Fr.) Kumm, *Pisolithus arhizus* (Scop.) Rauschert, *Scleroderma sp.* u laboratorijskim uslovima pokazuju da postoje razlike u izgledu kultura iste gljive kada se ona razvija na različitim temperaturama, različitim izvorima azota i ugljenka. Ispitivani izolati poreklom iz šume munike najbolje rastu na temperaturi od 22 °C, dok izolati *P. arhizus* i *Scleroderma* bolje rastu na 25 °C. Pokazalo se da su svi ispitivani izolati mogli da koriste amonijačni, nitratni i proteinski azot, kao i da su praktično svi imali sposobnost da koriste različite

ugljene hidrate (glukoza, saharoza, dekstrin, arabinoza, ksiloza, skrob) kao izvore hranljivih materija, mada su ove sposobnosti varijabilne između vrsta. Ispitivani izolati dobro su rasli na pH između 4 i 7,5.

Mikorizacija popravlja kvalitet sadnica za pošumljavanje. Ispitivane su mogućnosti korišćenja i efikasnost različitih autohtonih ektomikoriznih gljiva u rasadničkoj proizvodnji sadnica *Pinus nigra* Arnold na otvorenom. Tretmani sporama *P. arhizus*, *S. granulatus*, *S. collinitus*, *Xerocomus rubellus* (10^6 , 10^7 i 10^8 spora/sadnici), *Boletus luridus*, *Boletus fechtneri* i *Boletus aestivalis* (10^7 spora/sadnici), kao i sa vegetativnim inokulumom *P. arhizus*, *S. granulatus*, *Scleroderma* sp. (1:16, 1:8 i 1:4) mogu se primenjivati za dobijanje mikorizovanih kontejnerskih sadnica *P. nigra*. Porast sadnica, kao i stepen razvoja mikorize razlikovao se u zavisnosti od primenjenih vrsta gljiva i metoda inokulacije. Zbog jednostavnosti primene i niske cene, preporučuje se primena inokulumu spora *P. arhizus* sa 10^6 - 10^7 spora/ sadnici, kao i spora *S. granulatus* i *S. collinitus* sa 10^6 spora po sadnici.

Kontrolisana mikorizacija sadnica nije uobičajena u šumskim rasadnicima u Crnoj Gori i Srbiji. Dobijeni rezultati mogu poslužiti unapređenju rasadničke proizvodnje crnog bora i drugih četinara.

Ključne reči: ektomikoriza, *Pinus heldreichii*, molekularna karakterizacija (ITS), ektomikorizne zajednice, fiziološke karakteristike, mikorizacija sadnica, ektomikorizni inokulum.

Naučna oblast: Šumarstvo

Uža naučna oblast: Zaštita šuma

UDK 630*1(497.16)(043.3)

GDK 172.8:181.351:174.7 *Pinus heldreichii*(497.16)(043.3)

ECTOMYCORRHIZA OF CONIFEROUS TREE SPECIES IN
MONTENEGRO WITH SPECIAL ATTENTION TO MYCORRHIZA OF
PINUS HELDREICHII CHRIST

Abstract

Mycorrhizas are symbiotic associations formed between the group of specialized soil fungi and roots of higher plants. Mycorrhizas are present in all terrestrial ecosystems and play a central role in the nutrient uptake. In addition, mycorrhizal plants are often more resistant to diseases caused by microbial soil borne pathogens and to the effects of drought. Ectomycorrhiza is being established with roots of trees, especially the families *Betulaceae*, *Pinaceae*, *Fagaceae* and *Salicaceae*, representing ecologically and economically most important tree species being dominated in boreal, Mediterranean forests and forests in temperate region.

Analysis of diversity and distribution of ectomycorrhizas is important for understanding of their ecological function. According to published data, 50 ectomycorrhizal fungal genera have been recorded in Montenegro until now: 12 Genera of Ascomycota (50 taxa) and 38 Genera of Basidiomycota (267 taxa), representing c.ca one third of the total number of macromycetes' records here.

Pinus heldreichii Christ, being tertiar relict and subendemic, is one of the most interesting elements of Balkan's dendroflora. Fungal communities in *P. heldreichii* forests are only slightly examined, while their ectomycorrhizal communities have not been described or even confirmed. Due to evident ecological adaptability, *P. heldreichii* could be used for afforestation of extreme terrains. In that sense, ectomycorrhizal fungi surviving on these soils should receive a special scientific attention.

The overall aim of this doctoral dissertation was to introduce the ectomycorrhizal communities of *Pinus heldreichii*, also as to examine the possibilities of application of ectomycorrhizal fungi in nursery production of conifers.

The collection of c.ca 40 of fungal culture's isolates of putative ectomycorrhizal fungi from Montenegro area was established and used in further researches.

Using different methods of inoculation under laboratory conditions, ectomycorrhiza were achieved between *P. heldreichii* and 18 fungal species.

Genetic characterisation of fungal cultures was performed using molecular methods (ITS sequencing), and 22 fungal ITS sequences (20 ectomycorrhizal) were deposited in NCBI GenBank. This way, fungi from 10 ectomycorrhizal genera were characterised: *Amanita*, *Boletus*, *Hebeloma*, *Lactarius*, *Russula*, *Suillus*, *Tricholoma*, *Pisolithus*, *Scleroderma*, also as *Chalciporus* and *Hypholoma*.

Using RFLP analysis with *Hinf* I, *Alu* I, *Mbo* I, *Bsur*, *EcoRI* i *Rsa* I restrictive enzymes, RFLP patterns for 25 taxa were obtained, which could serve as an efficient tool for their further monitoring.

Characterization of ectomycorrhizal fungal communities of *P. heldreichii*, done by molecular analysis of plant roots on 2 localities with different soil development, shows their differences in composition and structure.

In pioneer forest community of *P. heldreichii* on calcareous soils in initial phase, 11 morphotypes were identified on root samples, from which 29 ectomycorrhizal taxa were extracted. Species from genera *Suillus*, *Rhizopogon*, *Amphinema*, *Tomentella*, *Willcoxina*, *Sebacine*, *Pseudotomentella*, *Lactarius*, *Tricholoma*, *Inocybe* were predominant in ectomycorrhizal community on this locality.

In climatogenous *P. heldreichii* forest on calcareous brown forest soil, 7 morphotypes and 21 ectomycorrhizal taxa were identified. On this locality, *Amphinema* taxa were predominant, while *Tomentella*, *Sebacine*, *Pseudotomentella*, *Suillus*, *Russula* and *Lactarius* followed.

Examination of physiological characteristics of *Chalciporus ammarelus* (Quel.) Bataile, *Lactarius deliciosus* (L.) Gray, *Russula sanguinaria* (Schumach.) Rauschert, *Suillus granulatus* (L.) Rousell, *Suillus collinitus* (Fr.) Kuntze, *Tricholoma batchii* Gulden, *Tricholoma imbricatum* (Fr.) Kumm, *Pisolithus arhizus* (Scop.) Rauschert, *Scleroderma* sp. *in vitro*, displays differences in appearances of cultures of same fungus developed on different temperatures, nitrogen (NH_4^+ , NO_3^- , protein) and carbon sources (glucose, sucrose, dextrin, arabinose, xylose, starch). Examined isolates from *P. heldreichii* forests showed the

best growth at 22°, while the temperature of 25°C suited better *P. arhizus* and *Scleroderma*. Examined isolates could have used ammonium, nitrate and protein as nitrogen sources, and, practically, all of them were able to use the different carbohydrates as the carbon sources, although those characteristics were variable between the species. All examined isolates exhibited good growth on pH between 4 and 7,5.

Seedling mycorrhization acts as an efficient tool for improving the quality of seedlings. The effectiveness of different autochthonous ectomycorrhizal fungi to produce containerized ectomycorrhizal seedlings of *Pinus nigra* in open field conditions was investigated. Spore inoculation with *P. arhizus*, *S. granulatus*, *S. collinitus*, *Xerocomus rubellus* (10^6 , 10^7 , 10^8), *Boletus luridus*, *Boletus fechtneri* and *Boletus aestivalis* (10^7) and vegetative inoculation with *P. arhizus*, *S. granulatus*, *Scleroderma* sp. (1:16, 1:8, 1:4) on ectomycorrhizal formation and seedling growth were tested and proved to be an effective method of obtaining containerized ectomycorrhizal *P. nigra* seedlings under open field conditions after 11 months. Seedling growth also as ectomycorrhizal formation and development differs according to applied fungal species and inoculation method.

According to obtained results, and having in mind the simplicity of application and low costs, it would be feasible to use the spore inocula of *P. arhizus* with 10^6 - 10^7 spores per plant, also as *S. collinitus* and *S. granulatus*, with 10^6 spores per plant, to produce ectomycorrhizal *P. nigra* plants on a large scale.

Controlled mycorrhizal inoculation of seedlings is not a common practice in Montenegrin and Serbian nurseries; as such, the obtained results will contribute to the enhancement of nursery production of *Pinus nigra* and other conifers.

Key words: ectomycorrhiza, *Pinus heldreichii*, molecular characterisation (ITS), ectomycorrhizal community, physiological characteristics, seedling mycorrhization, ectomycorrhizal inoculum.

Scientific field: Forestry

Scientific discipline: Forest protection

UDC 630*1(497.16)(043.3)

GDC 172.8:181.351:174.7 *Pinus heldreichii*(497.16)(043.3)

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Osnovne ekološke funkcije mikorize i njihov značaj	2
1.1.1. Osnovni tipovi mikoriznih simbioza i njihovo rasprostranjenje	2
1.1.2. Funkcije ektomikorize u prirodnim šumskim ekosistemima	4
1.1.2.1. Trofički status i fluks ugljenika kod mikoriznih biljaka	5
1.1.2.2. Usvajanje i transfer nutrijenata iz zemljišta	6
1.1.2.3. Interakcija sa drugim zemljišnim organizmima	8
1.1.2.4. Transfer ugljenika u ektomikoriznom sistemu	9
1.1.2.5. Dinamika ektomikoriznih zajednica	10
1.1.2.6. Evolutivna ekologija ektomikoriznih gljiva	11
1.2. Raznovrsnost ektomikoriznih gljiva u Crnoj Gori i njihova distribucija	13
1.2.1. Uvod	13
1.2.2. Materijal i metod	14
1.2.2.1. Kriterijumi za izdvajanje ektomikoriznih rodova	14
1.2.2.2. Podela šumskih ekosistema u Crnoj Gori	15
1.2.3. Rezultati istraživanja	17
1.2.4. Diskusija	20
1.2.5. Zaključak	24
1.3. Munika, subendemo-reliktni bor Balkana	26
1.3.1. Šume munike <i>Pinion heldreichii</i> Horv.	29

2. Sinteza mikorize munike pod kontrolisanim uslovima	
2.1. Uvod	32
2.2. Materijal i metod	33
2.2.1. Izolacija ektomikoriznih bazidiomikota	33
2.2.2. Biljni materijal	34
2.2.3. Inokulacija sadnica	35
2.2.3.1. Nesterilne tehnike inokulacije	35
2.2.3.1.1. Inokulum micelije	36
2.2.3.1.1.1. Vermikulitski-čvrsti inokulum i inokulacija sadnica	36
2.2.3.1.1.2. Suspenzija micelije i inokulacija sadnica	36
2.2.3.1.2. Inokulum spora	36
2.2.3.2. Sterilne tehnike inokulacije	37
2.2.4. Praćenje mikorizacije	38
2.3. Rezultati istraživanja	39
2.3.1. Izolacija gljiva u čiste kulture	39
2.3.2. Sinteza mikorize	42
2.4. Diskusija	45
2.5. Zaključak	48
3. Identifikacija kultura ektomikoriznih vrsta gljiva molekularnim metodama	
3.1. Uvod	49
3.2. Materijal i metode	53
3.2.1. Ispitivani materijal - gljive	53
3.2.2. Metode rada pri molekularnim istraživanjima	55
3.2.2.1. Izolacija DNK	55

3.2.2.2. Lančano umnožavanje DNK u prisustvu polimeraza	57
3.2.2.3. Sekvenciranje dobijenog PCR proizvoda	57
3.2.2.4. RFLP razlaganje PCR proizvoda enzimima i analiza razlike u dužini fragmenata dobijenih razlaganjem	57
3.2.2.5. Korišćeni softverski paketi	58
3.3. Rezultati istraživanja	59
3.3.1. Analiza sekvenci	59
3.3.2. Analiza fragmenata dobijena ITS-RFLP razlaganjem	62
3.4. Diskusija	67
3.5. Zaključak	76
4. Karakterizacija ektomikoriznih zajednica munike na osnovu morfološke analize korena i molekularnih metoda istraživanja	
4.1. Uvod	77
4.2. Materijal i metod	79
4.2.1. Istraživani lokaliteti	79
4.2.1.1. Lokalitet Sovrh	79
4.2.1.2. Lokalitet Kastrat	80
4.2.2. Prikupljanje ektomikoriznih uzoraka	80
4.2.3. Morfološko – anatomska karakterizacija korena munike iz prirodnih populacija ..	82
4.2.4. Molekularna analiza (izolacija DNK, PCR amplifikacija i sekvenciranje)	83
4.2.5. Korišćeni softverski paketi	85
4.3. Rezultati istraživanja	86
4.4. Diskusija	98
4.5. Zaključak.....	110

5. Uticaj nekih fizioloških faktora na razvoj ektomikoriznih gljiva	
5.1. Uvod.....	112
5.2. Material i metod	117
5.2.1. Izolacija ektomikoriznih gljiva.....	117
5.2.2. Uticaj temperature na porast micelije ektomikoriznih gljiva.....	118
5.2.3. Uticaj različitih ugljenih hidrata na porast micelije ektomikoriznih gljiva.....	118
5.2.4. Uticaj pH na porast micelije ektomikoriznih gljiva	118
5.2.5. Uticaj različitih izvora azota na porast micelije ektomikoriznih gljiva.....	119
5.2.6. Korišćeni softverski paketi	120
5.3. Rezultati istraživanja.....	120
5.4. Diskusija.....	126
5.5. Zaključak.....	131
6. Mikorizacija u rasadničkoj proizvodnji	
6.1. Uvod.....	132
6.1.1. Izbor biljke domaćina.....	134
6.1.2. Izabrane vrste mikosimbionta.....	135
6.1.3. Vrsta ektomikoriznog inokuluma.....	141
6.1.3.1. Inokulum spora.....	142
6.1.3.2. Vegetativni inokulum.....	142
6.1.4. Inokulaciona doza.....	143
6.2. Materijal i metod	144
6.2.1. Mikorizni simbiot (gljiva)	144
6.2.2. Biljni materijal.....	144
6.2.3. Inokulacija sadnica	145

6.2.3.1. Proizvodnja vegetativnog inokuluma i inokulacija	145
6.2.3.2. Inokulacija sporama	145
6.2.3.2.1. Inokulacija sporama <i>Pisolithus. arhizus</i>	145
6.2.3.2.2. Inokulacija sporama <i>Suillus</i> spp, <i>Boletus</i> spp.i <i>Xerocomus rubellus</i>	146
6.2.4. Tok ogleada: gajenje i nega biljaka	149
6.2.5. Mereni parametri i statistička analiza	149
6.3. Rezultati istraživanja	151
6.3.1. Usporedna inokulacija vegetativnim i inokulumom spora	152
6.3.1.1. <i>Pisolithus arhizus</i>	152
6.3.1.2. <i>Suillus granulates</i>	153
6.3. 2. Inokulacija sporama.....	156
6.3.2.1. <i>Suillus collinitus</i> i <i>Xerochomus rubellus</i>	156
6.3.2.2. <i>Boletus</i> vrste.....	157
6.3.3. Inokulacija vegetativnim inokulumom.	158
6.3.3.1. <i>Scleroderma</i> sp.....	158
6.4. Diskusija.....	160
6.5. Zaključak.....	172
7. Literatura.....	173
8. Prilog 1. – Taksoni gljiva zabeleženi u Crnoj Gori, unutar ektomikorizih rodova Ascomycota i Basidiomycota i njihovo rasprostranjenje.....	192
Biografija	210

1. Uvod

Termin mikoriza potiče od grčkih reči *miko* = gljiva, i *rhiza* =koren. Ovaj termin prvi je upotrebio nemački šumar fitopatolog Albert Bernhard Frank (1885) za zajednicu između gljiva i drveća. On je verovao da se ova simbiotska zajednica između biljke i gljive ostvaruje radi ishrane oba partnera. Danas se mikoriza definiše kao zajednica između hifa gljive i organa viših biljaka povezanih sa absorpcijom jedinjenja (substanci) iz zemljišta (HARLEY i SMITH, 1983; BRUNDERTT, 2004). Novija i šira definicija mikorize je: *Mikoriza je simbiotska asocijacija (zajednica) neophodna za jednog ili oba partnera, između gljive (specijalizovane da živi u zemljištu i u biljci) i korena (ili drugog organa koji je u kontaktu sa substratom-zemljištem) žive biljke, koja je prvenstveno služi za transport hranljivih materija. Mikoriza se javlja u specijalizovanim biljnim organima gde bliski kontakt predstavlja rezultat sinhronizovanog razvoja biljke i gljive.*

Svaka biljka koja u sebi ima gljivu, pa tako i biljka sa mikorizom, može biti označena kao *biljka domaćin*, nezavisno od toga da li je zajednica korisna ili nije. Za označavanje mikorizne gljive u biljci koriste se različiti termini (simbiont, mikobiont, „stanovnik“), ali je uobičajeno da se ona naziva *gljiva*.

U ovoj simbiozi biljka gljivi obezbeđuje stanište i ugljenik, fiksiran u procesu fotosinteze, dok gljiva obezbeđuje domaćinu rastvorene organski vezane hranljive materije, posebno azot i fosfor. Gljiva takođe ima i druge funkcije, kao što je ublažavanje stresa izazvanog negativnim uticajima životne sredine, što mogu biti uticaji hemijske prirode, herbivore, patogeni ili suša.

Koristi koje biljka ima od mikorize mogu da se izraze ekološki, poboljšanjem opšteg stanja biljke („kondicije“) i ekonomski, u povećanju porasta i prinosa. To je posledica veze koja se zahvaljujući mikoriznim gljivama ostvaruje između korena biljaka i zemljišta. Mikorizne gljive se razvijaju u zemljištu i unutar biljke. Zemljišna ili ektramatrična micelija usvaja hranljive materije iz zemljišnog rastvora i transportuje ih do korena. Na ovaj način mikoriza povećava efektivnu absorcionu površinu korena biljke. Na zemljištima koja su

siromašna nutijentima i na kojima postoji deficit vlage, hranljive materije usvojene putem ektramatrične micelije omogućavaju bolji porast biljaka i reprodukciju. Kao posledica mikorize, mikorizne biljke su često kompetitivnije i bolje tolerišu stres izazvan nepovoljnim uslovima spoljašnje sredine od nemikorizovanih biljaka.

Velika većina terestričnih biljaka obrazuje simbiotsku zajednicu sa gljivama. Na osnovu taksonomskih i ekoloških ekstrapolacija, procenjuje se da oko 86 % terestričnih biljnih vrsta obezbeđuje mineralne hranljive materije preko mikoriznih korenova, odnosno preko mikorizne simbioze (BRUNDRETT, 2009; TEDERSOO *et al.*, 2010). Stoga se može reći da „stanje“ mikorize među biljkama u prirodi predstavlja pravilo, a ne izuzetak. Takođe, mikoriza nije obligatna simbioza jer biljke mogu da rastu, ili da se gaje, i na staništima na kojima ne postoje ograničenja u pogledu hranljivih materija ili vode. Ali, na većini terestričnih staništa, ona ima odlučujuću ulogu za razvoj i stabilnost biljnih zajednica, i stoga se može smatrati »ekološki obligatnom« (BUSCOT *et al.*, 2000).

1.1. Osnovne ekološke funkcije mikorize i njihov značaj

1.1.1. Osnovni tipovi mikoriznih simbioza i njihovo rasprostranjenje

Mikorizne zajednice značajno variraju u strukturi i funkciji. Iako postoje mnogi izuzeci, moguće je načiniti generalizaciju u odnosu na geografsku širinu i nadmorsku visinu, osobine zemljišta i funkcije različitih tipova mikoriza koje naseljavaju dominantnu vegetaciju po gradijentu klimatskih zona (READ, 1989).

Žbunasta vegetacija predstavnika familije *Ericaceae*, koja dominira na kiselim zemljištima koja se odlikuju visokim prisustvom organske materije, karakterističnim za subarktičke i subalpijske regione, gradi zajednice sa grupom gljiva iz kolena (Phylum) Askomycota, razvijajući erikoidan tip mikorize. Ovaj tip mikorize karakteriše se obilnim rastom hifa unutar kortikalnih ćelija (intracelularno), ali sa slabim rastom u zemljištu. Gljive produkuju ekstracelularne (vanćelijske) enzime koji razlažu organsku materiju. Na taj način

biljke mogu lakše da asimiluju hranljive materije, mineralizovane iz organskih komponenti, prisutne u koloidnom rastvoru koji okružuje koren.

Pomeranjem ka Ekvatoru, žbunastu vegetaciju *Ericacea*, zamenjuje četinarsko drveće, kao dominantna vegetacija. Četinarsko drveće gradi zajednicu sa velikom grupom gljiva, većinom Basidiomycota, koje rastu između kortikalnih ćelija korena (intercelularno) formirajući ektomikorizni tip mikorize. Ektomikorizne gljive mogu da obrazuju veliku količinu hifa na površini korena i u zemljištu. Ove hife imaju ulogu u absorpciji i translokaciji neorganskih hranljivih materija i vode, ali isto tako luče enzime uključene u mineralizaciju organske materije, koji utiču na oslobađanje hranljive materije iz površinskih slojeva stelje.

U toplijim i suvljim krajevima, pomeranjem dalje prema Ekvatoru, dominantnu vegetaciju čine zajednice trava. U ovim ekosistemima upotreba hranljivih materija je visoka i ograničavajući faktor za rast vegetacije najčešće predstavlja nedostatak fosfora. Trave, i veliki broj drugih biljaka koje su karakteristične za ovakva staništa, grade simbiozu sa gljivama iz reda Glomeales (klasa Zigomycetes). Ove gljive grade arbuskule¹ ili jako razgranate strukture unutar kortikalnih ćelija korena (intracelularno), što predstavlja arbuskularni tip mikorize. Gljive iz reda *Glomales* obrazuju obilne ektramatrične hife (hife van korena) i mogu značajno da povećaju stepen unosa fosfora u biljku koju nastanjuju.

Divezitet asocijacija korena biljaka i gljiva omogućava biljkama postojanje niza strategija koje doprinose efikasnom funkcionisanju u različitim „sistemima“ biljka-zemljište. Postoji nekoliko podela mikorize na različite tipove na osnovu relativnog položaja gljive u korenu. Prvobitne morfološke klasifikacije dele mikorize na endomikorize, ektomikorize i ekto-endomikorize. Kasnije podele podrazumevale su nešto veći broj tipova, koje su u kasnijem radu BRUNDRETT-a (2004) okarakterisani kao podtipovi u okviru velikih „kategorija“ vaskularno-arbuskularne mikorize (VAM) i ektomikorize (ECM).

BRUNDRETT (2004) predlaže da se mikorizne asocijacije definišu i klasifikuju prvenstveno na osnovu anatomskih kriterijuma koji su kontrolisani od strane biljke domaćina, pošto osobine (morfortipovi) koje su kontrolisane od strane gljive mogu da variraju sa promenom biljke domaćina. Autor razlikuje 5 tipova mikoriznih asocijacija koje

¹ arbuskula znači malo drvo

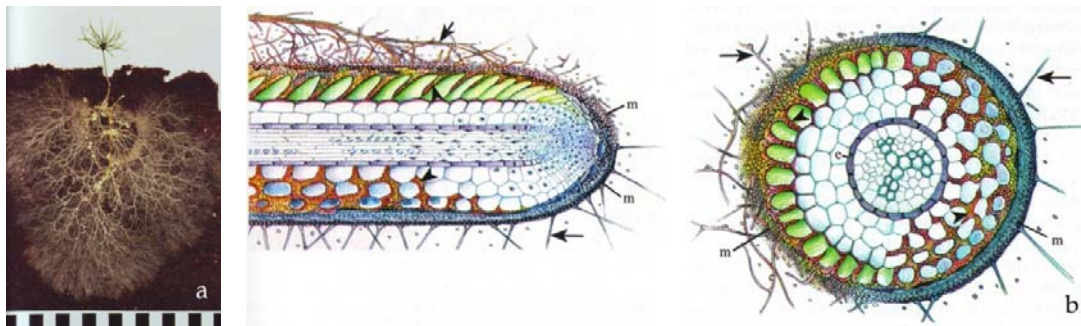
„kontrolniše“ biljka domaćin: 1) vezikularno-abuskularna mikoriza VAM, 2) ektomikoriza ECM, 3) mikoriza orhideja, 4) erikoidna mikoriza, 5) subepidernalna mikoriza.

1.1.2. Funkcije ektomikorize u prirodnim šumskim ekosistemima

Od drugih pretpostavljeno mutualističkih interakcija između biljke i gljive, ektomikoriza se razlikuje na osnovu prisustva omotača gljive i Hartigove mreže.

Omotač (engl. *mantle*) je izgrađen od hifa različite debljine koji prekrivaju (okružuju) vrhove korena. Iz omotača se hife, ili specijalizovane agregacije hifa (rizomorfe) šire radijalno u substrat da bi koristile vodu ili hranjive materije. Hife iz omotača takođe se šire u apoplast korteksa korena. Tu formiraju Hartigovu mrežu koja ima veliku površinu za čija je osnovna funkcija razmena rastvora.

Hartigova mreža predstavlja kompleksan organ koji je sastavljen od kortikalnih ili epidermalnih ćelije korena biljke i hifa gljive, koje su razgranate između pojedinačnih ćelija korena, kako bi omogućile maksimalan kontaktnu površinu koja je neophodna za recipročnu razmenu (transfer) hranljivih materija (BRUNDERTT, 2004; TEDERSOO, 2010).



Slika 1. a. Ekstraradikalna micelija *Suillus bovinus* u simbiozi sa *Pinus sylvestris* (foto D.J. Read); **b.** Dijagram ektomikorize na uzdužnom i poprečnom preseku prikazuje glavne karakteristike koje se pojavljuju kod skrivenosemenica (gornja polovina i levo) i četinara (donja polovina i desno). Ekstraradikalna micelija (strelica), M-omotač (mantle), Hartigova mreža (vrh strelice). (Preuzeto iz: PETERSON *et al.*, 2004, Mycorrhizas: anatomy and cell biology: 7, 29).

Osnovni koncept ektomikorize predstavlja izbalansirani recipročni odnos između korena biljaka i gljiva, gde je simbioza korisna (tj. mutualistička) za oba partnera u prirodnim uslovima. Međutim, treba imati u vidu da ova ravnoteža može biti ozbiljno narušena na antropogenim staništima i pod veštačkim uslovima, zbog toga što povišeni nivo hranljivih materija u zemljištu (koji nije prirodan) omogućava dominaciju jednog ili drugog partnera (TEDERSOO, 2010).

Doprinos mikorize opštem stanju biljake izražava se na više načina. Prema READ (1989), on se u najopštijim crtama odnosi na: 1) neophodnost mikorize za kompletiranje životnog ciklusa kod pojedinih biljnih vrsta (*Hyacinthoides non-stricta*, VAM); 2) uticaj mikorize na opstanak u zoni regeneracije (zajednice trava i AM gljive); 3) uticaj mikorize na fekunditet (oplođenje), kvalitet semena i snagu izbojaka (VAM i ECM); 4) poboljšanu otpornost na patogene (kao osnovu poboljšanog zdravstvenog stanja) (VAM i ECM); 5) uticaji na fiziološke procese u biljci, koji nisu u direktnoj vezi sa ishranom (npr. značajan porast stope fotosinteze) (VAM i ECM); 6) otpornost prema ekstremnim uslovima spoljašnje sredine (VAM i ECM).

1.1.2.1. Trofički status i fluks ugljenika kod mikoriznih biljaka

Mikorizne gljive mogu biti obligatni simbionti, kada ugljenik dobijaju isključivo od biljke domaćina, što je slučaj sa arbuskularno mikoriznim gljivama, ili, u manjoj ili većoj meri, fakultativnih simbionata, koji takođe mogu da vrše mineralizaciju organskog ugljenika iz neživih izvora, što je slučaj sa nekim ektomikoriznim vrstama. Heterotrofne mikorizne gljive u prirodi dobijaju sav, ili većinu, ugljenika od autotrofnih biljaka domaćina.

Utvrđeno je da se oko 20% ukupnog ugljenika koji biljka asimiluje premešta u gljivu. Ovaj transfer ugljenika iz biljke domaćina u gljivu se nekada smatrao „dreniranjem“ - ceđenjem domaćina. Danas se zna da zahvaljujući prisustvu mikorize, biljka povećava nivo fotosinteze, i na taj način kompenzuje gubitak ugljenika prema „zemljištu“, tj. mikoriznom simbiontu. Poznato je da kao posledica mikorizacije može da dođe do smanjenja porasta

biljke, ali do toga dolazi u slučaju nedovoljne količine fotosintata, koji su posledica ograničene fotosinteze, usled nedovoljne količine svetlosti, ili visokog prisutva fosfora u zemljištu.

Ektomikorizne i erikoidne mikorize vrše transformaciju ugljenih hidrata domaćina u skladišne ugljene hidrate koji su pecifični za gljive, kao što su manitol i trehaloza. Manitol i trehaloza predstavljaj "zalihu" produkata fotosinteze koja olakšava transport ugljenih hidrata.

Prisustvo mikorize značajno pospešuje tok ugljenika prema zemljištu. Tok ugljenika u prirodnim ekosistemima, koji se ostvaruje kroz ektomikoriznu miceliju ima izuzetnu važnost za funkcionisanje šumskih ekosistema. Kod nekih mikoriza, ekstramarične hife produkuju hidrolitičke enzime, kao što su proteaze i fosfataze, koji mogu da imaju značajan uticaj na mineralizaciju organske materije i raspoloživost nutrijenata. Ekstramatrične hife mikorize takođe drže čestice zemljišta zajedno i na taj način doprinose agregaciji zemljišta. Kao posledica toka ugljenika prema gljivi, dolazi do razvoja jedinstvene rizosferne zajednice mikroorganizama, koja se naziva mikorizosfera. Naučnici koji se bave zemljištem smatraju da je tok ugljenika u zemljište odlučujući za formiranje agregacija zemljišta i održavanje izbalansiranog i zdravog sistema biljka-zemljište.

1.1.2.2.Usvajanje i transfer nutrijenata iz zemljišta

Usvajanje hranljivih materija, posebno u slučajevima kada je količina hranljivih materija u zemljišnom rastvoru ograničena, zavisi od spoljne površina korena. Hife mikoriznih gljiva mogu značajno da povećaju absorbujuću površinu korena. Utvrđeno je da, kod sadnica bora, ekstramatrična micelija ektomikoriznih gljiva čini manje od 20% ukupne mase površine koja vrši absorpciju, ali u isto vreme, ona čini skoro 80% površine korena koja vrši absorpciju (ROUSSEAU *et al.*,1994).

Za efikasno usvajanje hranljivih materija iz zemljišta, potrebno je da hife ekstramatrične micelije mikorize budu distribuirane izvan zone depletacije (ispražnjenja)

hranljivih materija, koja se formira oko korena. Zona depletacije hranljivih materija formira se oko korena kada hranljive materije iz zemljišnog rastvora mnogo brže odlaze, nego što mogu da budu zamenjene difuzijom. Za slabo pokretljive jone kakvi su fosfati, u blizini korena se formira jasna i uska zona depletacije. Hife mikoriznih gljiva mogu lako da premoste ovu zonu i da "dosegnu" zone sa adekvatnim zalihama fosfora. Usvajanje mikro elemenata kao što su Zn i Cu je takođe poboljšano u prisustvu mikorize jer su ovo elementi sa ograničenom difuzijom u mnogim zemljištima.

Za mobilnije nutrijente, kakvi su nitrati, depletaciona zona je široka i manje je verovatno da se hife šire u zonu koja nije pod „uticajem“ korena. U slučaju usvajanja azota prednost mikorize se odnosi na različite organske i neorganske oblike azota koje sama biljka ne može, ili ne može dovoljno brzo i efikasno, da usvoji.

Drugi faktor koji doprinosi da mikoriza efikasno absorbuje hranljive materije, je mali prečnik hifa u odnosu na koren. Jačina gradienta difuzije za hranljive materije je recipročna prečniku jedinice koja vrši absorpciju, tako da uska jedinice koja vrši absorpciju, kao što je hifa može lakše da vrši usvajanje više koncentrovanog zemljišnog rastvora. Osim toga, usled malog prečnika, hife mogu da prorastaju kroz uske pore zemljišta koje nisu dostupne korenu ili korenskim dlakama.

Karakteristika korena koja je od izuzetne važnosti za usvajanje hranljivih elemenata je absorciona snaga za jone hranljivih materija i vodu. Distribucija absorpcione snage korena značajno zavisi od uslova zemljišta, kao što je na primer temperatura. Jedna od izvanrednih osobina mikorize je stalna snaga kojom se vrši absorpcija u zemljištu, dok je velika absorciona snaga pojedinih delova nemikoriziranog korena prolazna. Osim toga, ne inficirani vrhovi korena imaju vrlo karatak funkcionalni životni vek (nekoliko dana do nekoliko nedelja), dok se mikoriza odlikuje dugovečnošću, od nekoliko meseci do godine (BOWEN, 1970).

Usvajanje fosfora kod biljaka sa mikorizom je takođe olakšano usled toga što mikorizne gljive omogućavaju pristup zalihama fosfora koje nisu lako pristupačne biljkama. Neke vrste ektomikoriznih gljiva proizvode velike količine oksalne kiseline. Uz pomoć organskih kiselina dolazi do oslobađanja fosfora, kroz reakciju organskih anjona niske molekulske mase, kao što su oksalati. FOX *et al.* (1990) smatraju da oksalati mogu da: 1) zamene fosfor vezan na površini hidroksida metala preko reakcije razmene ligana, 2)

rastvore površinu oksida metala koja vezuje fosfor i 3) zadrže metale u rastvoru i na taj način spreče precipitaciju fosfata.

Još jedan mehanizam pomoću kojeg mikorizne gljive oslobađaju neorganski fosfor je kroz mineralizaciju organske materije. Ovo se dešava hidrolizom fosfatno-estarskih veza (C-O-P) uz pomoć fosfataza. Značajna aktivnost fosfataza zabeležena je kod mikoriznih gljiva gajenih u kulturi, kao i kod izolovanih (odvojenih) intaktnih ektomikoriznih korenova. U poljskim uslovima zabeležena je pozitivna korelacija između aktivnosti fosfataza i dužine hifa gljiva koje su vezi sa ektomikoriznim omotačem (HAUSSLING & MARSCHNER, 1989). Međutim, ovi rezultati se moraju pažljivo interpretirati jer sam koren, kao i okolna mikroflora (rizosfera) takođe produkuje organske materije i fosfataze. Smatra se da mikoriza sigurno intenzivira ovu aktivnost.

1.1.2.3. Interakcija sa drugim zemljišnim organizmima

Mikorizne gljive stupaju u interakciju sa velikim brojem organizama u rizosferi. Rezultat interakcije može biti pozitivan, negativan ili neutralan za mikoriznu zajednicu ili pojedinačne komponente rizosfere. Na primer, specifične bakterije stimulišu formiranje mikorize u rasadnicima četinara, i one se zovu bakterije koje pomažu mikorizaciju. Smatra se da u nekim slučajevima zbog prisustva bakterija nema potrebe za fumigacijom zemljišta (GARBAYE, 1994).

Mikorizne gljive „nastanjuju“ vrhove korena, i na taj način su u interakciji sa patogenima korena koji pretenduju da parazitiraju isto tkivo. Brojna istraživanja su se bavila uticajem mikorizne kolonizacije na patogene korena. Dokazano je da mikorizne gljive mogu da redukuju pojavu i jačinu napada bolesti korena. Pretpostavlja se da ovi zaštitni efekti mogu da se objasne preko sledećih mehanizama: 1) formiranje mehaničke barijere za infekciju patogena, što se posebno odnosi na omotač ektomikoriznih gljiva, 2) proizvodnja antibiotskih jedinjenja-materija koje ograničavaju patogena, 3) kompeticija prema hranljivim materijama sa patogenima, uključujući produkciju siderofora (*siderophores*) i 4) indukcija odbranbenih mehanizama domaćina.

1.1.2.4..Transfer ugljenika u ektomikoriznom sistemu

Mada postoje određene specifičnosti u okviru ektomikoriznih simbioza, većina ektomikoriznih gljiva umerenih i borealnih šuma pokazuje nisku selektivnost kada kolonizira koren biljke domaćina (MOLINA *et al.*, 1992). Kao posledica toga, micelija ovih gljiva formira široke fizičke među-veze između pojedinačnog drveća i između drveća različitih biljnih vrsta.

FINLAY i READ (1986) su eksperimentima u mikrokosmosu, uz korišćenje $^{14}\text{CO}_2$, omogućili vizuelizaciju micelijalne mreže koja formira vezu između vrsta i demonstrirali da ugljenik može da se kreće iz biljke u biljku kroz miceliju. Na ovaj način potvrđeno je kretanje ugljenika iz biljke u biljku u jednom pravcu.

Ogroman korak prema razumevanju funkcije ektomikorize u šumskim ekosistemima napravili su SIMARD *et al.* (1997). Oni su istraživali transfer ugljenika između *Betula papyrifera* Marsh. i *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco, korišćenjem dva izotopa ugljenika koji lako mogu da se razlikuju, ^{13}C i ^{14}C , kojima su sinhronizovano »hranili« individue drveća. Na ovaj način kvantifikovali su bidirekciono (u dva smera) kretanje ugljenika, i prvi put prikazali da u prirodi dolazi do transporta značajne količine ugljenika kroz mrežu micelije, u ovom slučaju između *Betula papyrifera* i *Pseudotsuga menziesii*. Ove dve vrste drveća su u prirodi povezane sa preko 11 različitih vrsta mikoriznih simbiozita. Treća vrsta uključena u eksperimente bila je *Thuja occidentalis* L., koja nije ni davala ni primala ugljenik. *P. menziesii* pokazuje nižu fotosintetičku aktivnost i nižu koncentraciju azota u tkivu nego breza, te se smatra da je veća »usisna« snaga *P. menziesii*, faktor koji je određivao pravac toka ugljenika.

Model distribucije ugljenika je »norma« u prirodi, i saznanje da on može da se kreće između biljaka kroz mikoriznu mrežu, iz zona visoke u zone niske dostupnosti asimilata, značajno doprinosi našem razumevanju dinamike ekosistema. Drveće sa različitom fotosintetičkom efikasnošću je u ekosistemima povezano preko ektomikoriznih gljiva i može da razmenjuje ugljenik (READ, 1999).

Istraživanja SIMRAD i SMIT (1997) otvaraju brojna pitanja na biohemijskom nivou. Još od LEWIS i HARLEY (1965) prihvaćerno je da se proces prenošenja ugljenika iz autotrofa u gljivu (koji je zapažen kod svih tipova mikorize sem kod orhideja), dešava u jednom smeru. Hidroliza saharoze u glukozu i fruktozu pomoću biljnih invertaza je praćena konverzijom (prevođenjem) monosaharida u šećerne alkohole u gljivi, koji tamo postaju nedostupni biljci. Ukoliko se ugljenik pomera iz donorskog do receptorskog autotrofa kroz gljivu, on se mora kretati u nazad prema receptoru, ali u kom obliku? Pretpostavlja se mogućnost da amino grupe karboksiliraju pre nego što bivaju prenesene duž »sistema« gljiva-biljka (SMITH i SMITH, 1990). SIMARD *et al.* (1997) zapažaju intenzivniji transfer ugljenika iz tkiva koja imaju visok status azota, u tkiva niskog statusa azota, što može da bude objašnjeno ukoliko se ugljenik kreće duž gradijenta azota u obliku amino kiselina. READ (1999) smara da se može pretpostaviti da su, tokom evolucije simbioze, u velikom broju razlićitih mikoriznih sistema, razvijeni mehanizmi koji omogućavaju reverzinbilan transfer ugljenika u obliku ugljenih hidrata.

S obzirom da je specifićnost većine mikoriznih gljiva prema domaćinu niska, biljke mogu da budu kolonizovane i međusobno povezane sa velikim brojem simbiotskih gljiva. Usled poznavanja ove činjanice, konvencionalno proućavanje pojedinaćnih vrsta biljaka i gljiva »u izolovanim« oglecima, dovedeno je pitanje. Smatra se da istraćivanja sprovedena na ovaj naćin ne mogu mnogo doprineti razumevanja funkcija u simbiozi, i odvesti znatno dalje od rezultata koji su postignuti do sada (READ, 1999).

1.1.2.5. Dinamika ektomikoriznih zajednica

Za razumevanje mesta i funkcije ektomikoriznih gljiva u šumskim zajednicama, znaćajno je takoće pitanje dinamike ektomikoriznih zajednica. Ranije se smatralo da sa starenjem šumskog drveća dolazi do sukcesije gljiva u zajednici (VISSER, 1995). Danas se smatra da se ovaj princip uslovno može primeniti jedino na šumske kulture.

Utvrđeno je da u ranim fazama razvoja šumskih kultura, na staništima na kojima ranije nije bilo šume, preovlađuju pionirske vrste gljiva, koje mikorizuju koren domaćina putem spora nošenih vazduhom. Sa razvojem zajednice, one bivaju zamenjene gljivama koje dolaze u kontakt sa korenom domaćina i „nastanjuju ga“ micelijom poreklom iz snažnih micelijalnih sistema koji imaju sposobnost formiranja rizomorfi. Smatra se da ovakvi micelijalni sistemi imaju veliki inokulacioni potencijal. To su gljive „kasnije faze“. Istraživanja potvrđuju da kako u šumama, tako i u kulturama, pionirske vrste ostaju subordiniranoj ulozi u populacijama mikoriza, i da dolazi do progresivnog povećanja diverziteta gljiva sa staršću sastojine (VISSER, 1995), do jednog određenog momenta. Zrele i klimaksne zajednice odlikuju se nižim diverzitetom vrsta, nego mlađe sastojine koje se razvijaju.

Ovakav sukcesioni model, međutim, nije primenjiv na prirodne šume. Ovde različite populacije gljiva, koje su u kulturama prepoznate ili kao pionirske, ili kao gljive »kasnije faze«, koegzistirajuju, kolonizirajući jednako korenove klijavaca i zrelog drveća (MOLINA *et al.*, 1992). Izgleda da razlike između pionirskih, i onih vrsta koje »ulaze« u mnogo starije plantaže leže većinom u njihovim zahtevima za ugljenikom. Ekstenzivni (obilni) micelijalni sistemi gljiva »kasnije faze« (nepionirskih vrsta) imaju znatno veće zahteve za ugljenikom, koji mogu da budu zadovoljeni jedino od strane starijeg korenovog sistema, odnosno starijeg drveta. Dokazano da klijanici breze, koji niču u zreloj šumi, bivaju kolonizovani rizomorfim gljivama starijeg drveća. Na korenu klijanaca u prirodnim šumama zabeležene su mešane populacije pionirskih gljiva i gljiva »kasnije faze«. U prirodnim sastojinama, takođe, klijavci izolovani od odraslog drveća su naseljeni prvenstveno pionirskim gljivama (SIMARD *et al.*, 1997).

1.1.2.6. Evolutivna ekologija ektomikoriznih gljiva

Na osnovu prethodnih proučavanja načina života ektomikoriznih gljiva, i na osnovu filogenetskih studija, smatra se da su se ektomikorizne gljive razvile od nemikoriznih predaka. Na osnovu pretpostavljene ekologije nemikoriznih sestrinskih i sukcesivnih taksona, ektomikorizne linije su evoluirale većinom od saprotrofnih gljiva (94,7%). Između

sestrinskih saprotrofa, preovlađuju saprobi humusa (61,1%), zatim saprobi drveta (30,6%) i pirofilni saprobi (8,3%). Među truležnicama, ektomikorizne linije izgleda da su evoluirale od specialista bele truleži, mrke truleži i meke truleži. Analiza TEDERSOO *et al.* (2010) pokazuje da nijedna ektomikorizna linija nije nastala od truležnica stelje. Sekvestrirane forme plodonosnih tela pojavljuju se u najmanje 30 linija (45,5%) ektomikoriznih gljiva.

Dominacija saproba humusa među sestrinskim grupama ektomikoriznih linija sugerise da je deljenje staništa u zemljištu jak preduslov za evoluciju ektomikorizne simbioze kod gljiva. Većina predaka pretpostavljenih saproba drveta su sekundarne truležnice drveta koje često dele svoje stanište sa korenom drveća koje prodire u trulo drvo. Smatra se da usled iscrpljivanja rezervi nutrijenata u trulom drvetu, dolazi do „snažnog pritiska“ na gljive truležnice da upotrebe alternativne izvore energije. Dokazano je da neke truležnice mogu formirati tanke, nediferencirane strukture koje podsećaju na omotač mikoriznih gljiva i penetrirati u korenčice intercelularno, bez jasnih simptoma bolesti (VASILIAUSKAS *et al.*, 2007). Kod *Pezizales*, pirofilne, kao i vrste koje prate poremećaje, predstavljaju sestrinske takson ektomikoriznim linijama sa manje više pirofilnim i načinom života adaptiranim na poremećaj (*Sphaerosporella* i *Pulvinula*). Ovo sugerise da određeni ekološki afiniteti mogu nastaviti da postoje kod taksona gljiva i nakon razvoja ektomikoriznih osobina.

TEDERSOO *et al.* (2010) u evolucionim modelima ektomikoriznih linija nisu evidentirali kretanje obrnutim smerom - ka neektomikoriznom načinu ishrane. Ipak, vrlo je verovatno da su bar neke ektomikorizne vrste počele da iskorišćavaju svoje partnere. Multigena filogenija na nivou reda je značajno doprinela razumevanju evolucije ekoloških i morfoloških karakteristika kod gljiva i potvrdila nezavisnu evoluciju taksona koji formiraju ektomikorize, bez jasne evidencije za suprotno. Međutim, dosadašnje „uzorkovanje“ taksona i znanje o filogeniji ukazuju da postoji mogućnost da se kod Atheliales, Boletales i Telephorales ponovo stekne saprotrofni ili drugi model ishrane.²

² Polifilektizam ili parafilektizam (nasuprot monofilektizmu) koji se javlja kod velikog broja rodova gljiva predstavlja glavni problem kod označavanja trofičkog statusa određenih vrsta gljiva. Mnogi poli- ili parafilektički rodovi Askomycota (*Humaria*, *Peziza*, *Tricharina*, *Trichophaea*), Basidiomycota (*Amanita*, *Entoloma*, *Gyrodon*, *Lyophyllum*, *Ramaria*, *Sebacina*, *Sistotrema*, *Tomentella*, *Tulasnella*) i Zigomycota (*Endogone*), sadrže kako ektomikorizne, tako i saprotrofne vrste. Većina ovih rodova sadrži veliki broj vrsta koji taksonomski nisu revidirani od vremena njihovog opsivanja. Mnogi od ovih rodova su zadržani usled nedostatka dobrih diskriminacionih obeležja morfoloških karakteristika. Posebno *Sebacina*, *Tulasnella* i *Ceratobasidium* sadrže mnogo kriptičnih (skrivenih) vrsta sa kontrastnim načinima života. Kod ovako heterogenih rodova, ektomikorizne vrste su obično grupisane unutar jedne ili više monofilektičkih grana. Ali, još uvek ne raspoložemo filogenetskim tretmanima za mnoge od ovih rodova. Smatra se da prisustvo različitih trofičnih modela unutar roda predstavlja jak argument za ponovo razmatranje veza u okviru roda.

1.2. Raznovrsnost ektomikoriznih gljiva u Crnoj Gori i njihova distribucija

1.2.1. Uvod

Ektomikorizni domaćini čine ekološki i ekonomski najznačajnije vrste šumskog drveća koje dominiraju šumskim zajednicama u borealnim, mediteranskim i šumama umerenog pojasa na Severnoj hemisferi (TEDERSOO *et al.*, 2010), kao i u određenim delovima Južne hemisfere. To su vrste autotrofnog drveća i žbunja iz familija *Pinaceae*, *Fagaceae*, *Betulaceae*, *Salicaceae*, *Nothofagaceae*, kao i *Leptospermoidea* fam. *Myrtaceae* (uključujući *Eucalyptus*), *Dipterocarpaceae* i *Ambersteae* iz familije *Caesalpinaceae*. Gljive koje obrazuju ektomikorizu pripadaju kolu Basidiomycota, Ascomycota i Zigomycota (TEDERSOO *et al.*, 2010).

Procenjuje se da u borealnim šumama i šumama umerenog regiona 5000-6000 vrsta gljiva formira ektomikorize. Ovako veliki diverzitet gljiva omogućava razvoj vegetacije sa malim diverzitetom drvenastih biljnih vrsta, jer su se ektomikorizne gljive prilagodile da usvajaju i mobilizuju heterogene izvore fosfora i azota iz površinskih slojeva zemljišta (BUSCOT *et al.*, 2000).

U Crnoj Gori je do sada registrovano više od 1000 vrsta, i nižih taksonomskih jedinica makromiceta, na osnovu praćenja pojave plodonosnih tela (PERIĆ i PERIĆ, 1994; LAZAREVIĆ *et al.*, 2011). Analiza diverziteta i distributivnih modela ektomikorize značajna je za razumevanje njene ekološke uloge. Smatra se da mikoriza odražava heterogenost različitih hranljivih materija u različitim zemljištima i da doprinosi stabilnosti biljnih zajednica (BUSCOT *et al.*, 2000). Iako je, osim u slučaju pojedinih rodova, specifičnost ektomikoriznih gljiva prema domaćinima niska, postoje i drugi faktori spoljašnje sredine koji utiču na pojavu i rasprostranjenje gljiva. Podaci o njihovom rasprostranjenju, posmatrano na nivou vrsta i taksona u odnosu na različite ekosisteme, mogu da doprinesu boljem poznavanju ekologije i fiziologije gljiva i pruže vredne podatke o šumskim ekosistemima u celini. Oni posredno mogu da ukažu i na očuvanost, ili stepen poremećaja šumskih ekosistema.

1.2.2. Materijal i metod

Na osnovu do sada objavljenih podataka o rasprostranjenju makromiceta u Crnoj Gori, ovde su izdvojene ektomikorizne vrste, a njihovo rasprostranjenje određeno je u odnosu na različite tipove klimazonalnih šumskih ekosistema i na glavne domačine.

Lista pretpostavljeno ektomikoriznih vrsta gljiva u Crnoj Gori, sačinjena je na osnovu podataka iz literature koji se odnose na: 1) prisustvo plodonosnih tela pojedinih vrsta gljiva u Crnoj Gori, kao i 2) na poznati trofički sastav pojedinih rodova i filogenetskih grupa gljiva.

Izvršena je analiza objavljenih podataka o prisustvu i rasprostranjenju gljiva u Crnoj Gori³.

1.2.2.1. Kriterijumi za izdvajanje ektomikoriznih rodova

Rodovi ektomikoriznih gljiva izdvojeni su na osnovu preglednog rada TEDERSOO *et al.*, 2010: "Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution and evolution of phylogenetic lineages", koji je integrisao savremene principe i saznanja o ekologiji, trofičkom statusu i filogeniji ektomikorizne simbioze.

Prema TEDERSOO *et al.* (2010), rodovi ektomikoriznih gljiva izdvojeni su na osnovu kritičke ocene sve raspoložive literature u kojoj je razmatran ektomikorizni status vrsta: 1) praćenjem micelije ektomikoriznih gljiva od plodonosnog tela do korenskih završetaka; 2) poređenjem morfologije hifa iz plodonosnog tela i hifa ektomikorize direktnim mikroskopiranjem; 3) sintezom mikorize u čistoj kulturi; 4) molekularnom identifikacijom *in situ*, upotrebom RFLP –a ili sekvenciranja DNK; 5) proučavanja koja koriste stabilne izotope za izdvajanje ektomikoriznih od saprobnih rodova i 6) filogenetske studije ektomikoriznih i njima bliskih rodova.

Uobičajeno je i prihvaćeno kao princip u literaturi da se trofički status gljiva razmatra na nivou roda, ili filogenetskih linija. U formiranu listu ektomikoriznih gljiva, koja je ovde

³ Većina eksikata deponovana je u mikološkoj kolekciji Crnogorskog mikološkog centra u Podgorici. Nalazi su precizno evidentirani, i većina vrsta praćena je foto dokumentacijom- makroskopskim fotografijama plodonoskih tela, kao i fotografijama i crtežima mikrodetalja začajnih za determinaciju vrsta.

data na nivou taksona (vrsta i nižih taksonomskih jedinica) upisane su sve vrste iz potvrđenih ektomikoriznih rodova. Međutim, trofički status pojedinih vrsta gljiva nije rešen, i pojedini poli i paraflektički rodovi Ascomycota i Basidiomycota sadrže ektomikorizne i saprotrofne vrste. Ovakvi rodovi u *fungiji* Crne Gore su malobrojni, a sa stanovišta ekologije vrsta jako interesantni i još uvek bez konačnog odgovora (npr. *Peziza*). Stoga su kao ektomikorizne „predstavljene“ sve do sada zabeležene vrste na teritoriji Crne Gore i iz ovih rodova.

Imena gljiva su data su prema *Index Fungorum*, osim za vrste iz fam. *Boletaceae* (uključujući *Gyrodontaceae*, *Gyroporaceae* i *Suillaceae*), koje su date prema *Index Fungorum* i MUÑOZ (2005), što je preuzeto iz PERIĆ i PERIĆ (2006) . Taksoni koje se u literaturi sreću pod nekim drugim nazivom, „prevedeni“ su u naziv koji je trenutno validan na osnovu *Index fungorum*, dok je naziv pod kojim je takson opisan naveden u napomeni.

U slučaju kada su taksoni predstavljani u preglednim radovima kao što su PERIĆ i PERIĆ (1997), PERIĆ i PERIĆ (2004), PERIĆ i PERIĆ (2006), sve ranije reference istih autora koje su ovde upisane, nisu ponovo navođene.

1.2.2.2. Podela šumskih ekosistema u Crnoj Gori

Kod definisanja podele na različite komplekse šumskih ekosistema, javila su se dva problema: velika raznovrsnost šumske vegetacije zastupljene na teritoriji Crne Gore sa jedne strane, i velika neujednačenost podataka koji se odnose na nalaze sporokarpa. Podaci o domaćinu, ili tipu šume često nisu dovoljno precizni ili nedostaju, tako da su pojedini nalazi svrstavani u određene šumske komplekse na osnovu isključivo geografskih pokazatelja (lokaliteta).

Imajući u vidu da, mada određene specifičnosti u okviru ektomikoriznih simbioza postoje, većina ektomikoriznih gljiva umerenih i borealnih šuma pokazuje nisku selektivnost kada kolonizira koren biljke domaćina (MOLINA *et al.*, 1992), podela šumskih ekosistema u Crnoj Gori, izvršena je u odnosu na klimatogenu šumsku vegetaciju i dominantne vrste domaćina. Osim toga, jedino ovakvom podelom šumske vegetacije mogao je da se obezbedi odgovarajući nivo pouzdanosti, kao i preglednost podataka.

Šumski ekosistemi u Crnoj Gori, podeljeni su u odnosu na klimatogenu šumsku vegetaciju i dominantne vrste domaćina (BLEČIĆ i LAKUŠIĆ, 1976, BLEČIĆ i LAKUŠIĆ, 1987, STEVANOVIĆ *et al.*, 1995, STEFANOVIĆ, 1977, TOMIĆ, 1992) na: mediteranske šume i kulture borova, termofilne submediteranske šume liščara, mezofilne šume mezijske bukve, borealne četinarske šume i reliktnne šume balkanskih borova⁴.

1. Mediteranske šume i kulture borova, u kojima su pronalazena plodnosna tela gljiva obuhvataju:

1.1 prirodne šume alepskog bora (*Pinus halepensis* Mill.) i pinjola (*Pinus pinea* L.), sa čempresom (*Cupressus sempervirens* L.), koje se javljaju se kao različiti degradacioni oblici klimatogenih šuma iz sveze *Quercion ilicis* Br.-Bl., na Jadranskoj obali,

1.2 kulture alepskog bora u Podgorici i okolini.

Kao glavni edifikator i ektomikorizni domaćin ovde se javlja *Pinus halepensis* Mill.

2. Termofilne submediteranske šume liščara u kojima su pronalazena plodnosna tela gljiva obuhvataju:

2.1 submediteranske kserofilne šume mediteranskog zaleđa iz sveze *Ostryio – Carpinion orientalis* Lakš. *et al.*, sa asocijacijama *Quercio – Carpinetum orientalis s.l.*, i *Quercetum trojanae s.l.*,

2.2 kserofilne i kseromezofilne šume kontinentalnih regiona, sa svezama *Quercion frainetto* Horv., *Quercion pubescentis petreae* Br.-Bl., *Quercion petrea – cerris* Lakš. et Jov. i *Orno – Ostryon* Tom., kao i asocijacijom *Seslerio – Ostryetum carpinifolia* Bleč. et Lakš.,

2.3 termo-mezofilne šume kestena na kiselim zemljištima submediteranskih regiona iz asocijacije *Quercio – Castanetum submediterraneum* Wrab..

Kao glavni edifikatori i ektomikorizni domaćini u ovim šumama javljaju se *Quercus pubescens* Willd., *Q. trojana* Webb, *Q. cerris* L. i *Castanea sativa* Mill.

⁴ Precizniji podaci o rasprostranjenju pojedinih vrsta gljiva, kada se smatralo da to može da ima posebnog značaja, dati su u napomeni.

3. Mezofilne šume mezijske bukve u kojima su pronađena plodonosna tela gljiva obuhvataju:

3.1 šume iz sveze *Fagion moesicae* Bleč. et Lakš., asocijacije: *Seslerio – Fagetum s.l.* *Fagetum montanum s.l.*, *Fagetum subalpinum s.l.*, *Abieti – Fagetum s.l.*

3.2 šume iz sveze *Quercio – Carpinion betuli s.l.*, asocijacije *Quercetum petraeae s.l.* i *Quercetum petraeae-cerris* Lakš. et Jov..

Kao glavni edifikatori i ektomikorizni domaćini u ovim šumama javljaju se *Fagus moesiaca* (K. Maly) Czezcott i *Quercus petraea* (Mattuschka) Liebl.

4. Borelne četinarske šume obuhvataju:

4.1 šume iz sveze *Vaccinio Piceion* Br.-Bl., asocijacije. *Picetum excelsae montanum s. l.*,

4.2 šume iz sveze *Eu-Vaccinio Piceenioni* Br.-Bl., asocijacije *Picetum excelsae subalpinum s.l.*

Kao glavni edifikatori i ektomikorizni domaćini u ovim šumama javljaju se *Picea abies* (L.) H. Karst i *Abies alba* Mill.

5. Reliktne šume balkanskih borova obuhvataju:

5.1 šume iz sveze *Pinion heldreichii* Horv., asocijacija *Pinetum heldreichii s.l.*,

5.2 šume iz sveze *Pinion peucis* Horv. et al., asocijacije *Pinetum peucis s.l.*

Kao glavni edifikatori i ektomikorizni domaćini u ovim šumama javljaju se *Pinus heldreichii* H. Christ ili *Pinus peuce* Griseb..

1.2.3. Rezultati istraživanja

Podaci koji su predstavljeni u ovome radu dobijeni su na osnovu praćenja pojave plodonosnih tela ektomikoriznih gljiva u šumama Crne Gore. Mikološka istraživanja u Crnoj Gori do sada su se odnosila prvenstveno na determinaciju pojedinih vrsta gljiva (PERIĆ i PERIĆ 1997, 2004). Iz podataka o ukupnom rasprostranjenju i broju nalaza, za sada, može se indirektno izvoditi zaključak i o populacijama pojedinih vrsta gljiva.

Tabela 1. Broj taksona gljiva zabreženih u Crnoj Gori unutar ektomikoriznih rodova Ascomycota i Basidiomycota i njihovo rasprostranjenje

	Ascomycota ukupno	<i>Basidiomycota</i>											<i>Basidiomycota</i>													
		<i>Pezizales</i>											<i>Agaricales</i>							<i>Boetales</i>						
		<i>Humaria</i> Fuckel	<i>Geopora</i> Harkn.	<i>Ovidea</i> (Pers.) Bouord	<i>Marcellina</i> Brunn., Korf. & Rifai	<i>Pulvinula</i> Boud.	<i>Sarcosphaera</i> Auersw.	<i>Sowerbyella</i> Nannf.	<i>Trichophaea</i> Boud.	<i>Tarzetta</i> (Cooke) Lambotte	<i>Peziza</i> Pers.	<i>Helvella</i> L.	<i>Wynnella</i> Boud.	<i>Amanita</i> Pers.	<i>Cortinarius</i> (Pers.) Gray	<i>Entoloma</i> (Fr.) P. Kumm.	<i>Hebeloma</i> (Fr.) P. Kumm.	<i>Hygrophorus</i> Fr.	<i>Inocybe</i> (Fr.) Fr.	<i>Laccaria</i> Berk. & Broome	<i>Tricholoma</i> (Fr.) Staude	<i>Boletus</i> Dill. ex L. : Fr.	<i>Leccinum</i> Gray	<i>Leccinellum</i> Bresinsky & Binder	<i>Phylloporus</i> Quel.	<i>Porphyrellus</i> E.-J. Gilbert
Mediterranske š. i kult. borovova	20	4	4	2	-	1	1	-	1	1	5	5	-	-	3	-	1	8	1	8	2	-	-	-	-	
termofilne submedit. šume lišćara	17	-	1	1	-	-	-	-	-	2	5	7	-	21	5	5	1	4	4	2	7	17	-	-	-	-
mezofilne šume bukve	23	1	-	2	1	-	1	1	-	-	7	8	-	13	7	6	3	7	4	2	6	13	5	-	-	-
borealne četinarske šume	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	5	7	1	1	6	1	1	5	2	-	1	1	1
reliktne šume balkanskih borova	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	1	1	-	-	2	-	1	3	-	-	-	-	-
ukupno u rodu	50	1	5	4	1	2	2	1	1	3	18	11	1	26	17	12	3	16	11	2	18	26	5	1	1	1

	<i>Basidiomycota</i>																									
	<i>Boletales</i>														<i>Cantharellales</i>			<i>Russulaes</i>		<i>Thelephorales</i>						
	<i>Strobilomyces</i> Berk.	<i>Tylopilus</i> P. Karst.	<i>Xerocomus</i> Quéél.	<i>Gyrodon</i> Opat.	<i>Alpova</i> Dodge	<i>Melanogaster</i> Corda	<i>Paxillus</i> Fr.	<i>Gyroporus</i> Quéél.	<i>Pisolithus</i> Alb. & Schwein.	<i>Scleroderma</i> Pers.	<i>Chroogomphus</i> (Singer) Mill.	<i>Gomphidius</i> Fr.	<i>Rhizopogon</i> Fr. & Nordholm	<i>Suillus</i> Micheli ex Adans.	<i>Cantharellus</i> Fr.	<i>Craterellus</i> Pers.	<i>Clavulina</i> J. Schröt.	<i>Gomphus</i> Pers.	<i>Ramaria</i> Fr. ex Bonord.	<i>Lactarius</i> Pers.	<i>Russula</i> Pers.	<i>Hydnellum</i> P. Karst.	<i>Sarcodon</i> Quéél ex P. Karst.	<i>Phellodon</i> P. Karst.	<i>Thelephora</i> Ehrh. ex Willd.	Basidiomycota ukupno
Mediteran. šume i kulture borova	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	5	2	-	-	-	2	6	5	-	1	1	-	53
termofilne submed šume liščara	-	-	5	-	-	1	-	1	1	5	1	-	-	1	6	1	1	-	4	8	9	-	-	-	-	114
mezofilne šume bukve	1	-	5	1	1	1	2	2	-	1	1	1	1	2	3	1	-	-	4	17	21	-	2	-	1	136
borealne četinar šume	-	3	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	3	2	-	-	1	3	12	11	4	2	-	-	78
reliktno šume balkanskih borova	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	1	2	-	-	1	1	-	3	1	-	-	-	3	21
ukupno u rodu	1	3	7	1	1	2	2	2	1	5	1	1	1	8	8	1	2	1	9	30	27	4	4	1	3	267

Kompletan lista zabeleženih taksona data je u prilogu (Prilog 1).

Na osnovu sprovedene analize u Crnoj Gori je zabeleženo 50 rodova ektomikoriznih gljiva, 12 rodova Ascomycota i 38 rodova Basidiomycota. Ukupan broj od 322 pretpostavljeno mikoriznih taksona predstavlja oko trećinu svih makromiceta zabeleženih u Crnoj Gori. Broj zabeleženih taksona Basidiomycota iznosi 267 i 50 taksona Ascomycota.

Najbrojniji ektomikorizni rodovi među Basidiomycota-ma su: *Lactarius* (30), *Russula* (27), *Amanita* (26), *Boletus* (26), *Tricholoma* (18), *Cortinarius* (17), *Hygrophorus* (16), *Inocybe* (11), *Entoloma* (12), *Ramaria* (9), *Cantharellus* (8); kao i *Peziza* (18), *Helvella* (11) i *Geopora* (5), među Ascomycota-ma.

U mediteranskim šumama borova zabeleženo je 73 taksona (20 Ascomycota i 53 Basidiomycota) pretpostavljeno ektomikoriznih gljiva. U termofilnim hrastovim šumama zabeležen je 131 takson (17 Ascomycota i 114 Basidiomycota); u šumama bukve zabeleženo je 159 taksona (23 Ascomycota i 137 Basidiomycota); u šumama smrče i jele zabeleženo je 79 taksona (1 Ascomycota i 78 Basidiomycota), i u šumama munike i molike zabeleženo je 22 taksona (1 Ascomycota i 21 Basidiomycota) pretpostavljeno ektomikoriznih gljiva.

1.2.4. Diskusija

S obzirom da je dostupan mali broj podataka o prisustvu pojedinačnih vrsta u Crnoj Gori, ne mogu se donositi opšti zaključci o pretpostavkama za razvoj pojedinih vrsta. Oni se međutim uklapaju u globalnu sliku i potvrđuju takođe da je specifičnost ektomikoriznih gljiva prema domaćinima niska (CAIRNEY 1999, cit. MOLINA 1992). Veliki broj rodova i vrsta ektomikoriznih gljiva gradi simbiozu sa velikim brojem lišćarskog i četinarskog drveća i žbunja, dok su druge ograničene na simbiozu sa nekoliko biljnih vrsta. Postoji, takođe, određen broj vrsta kod kojih je zapažena specijalizacija prema određenom domaćinu. Takve su *Suillus* vrste, koje su gotovo isključivo vezane za domaćine iz Fam. *Pinaceae*. Nalazi *Leccinum*-a u Crnoj Gori vezani su za pionirsku vegetaciju breze i jasike, te kulture crnog bora. Vrste iz roda *Boletus* pojavljuju se najčešće uz hrastove, dok su *Hydnellum*-i uz smrču.



Slika 2. Vegetacijska karta Crne Gore (preuzeto od BLEČIĆ i LAKUŠIĆ (1987), Šumarska enciklopedija 3, Zagreb: 393) sa obeženim lokalitetima na kojima su najčešće beležena plodnosna tela ektomikoriznih gljiva.

Treba istaći da dosadašnja mikološka istraživanja nisu ravnomerno pokrila čitavu teritoriju Crne Gore. Ovo je posledica činjenice da je u rad uključen mali broj istraživača kao i činjenice da su se ona odvijala u oteženim uslovima, bez adekvatne podrške od strane nadležnih institucija. Tako su najbolje proučeni lokaliteti koji su najdostupniji: u bizini Podgorice, u pojasu mediteranskih šuma borova i termofilnih hrastovih šuma. Tokom višegodišnjih istraživanja odabran je jedan broj lokaliteta, u okviru različitih šumskih zajednica, koji je stalno praćen. Oni, prema broju nalaza, predstavljaju dominantne lokalitete, i mogu se smatrati kao reprezentativni za pojedine komplekse šumskih ekosistema. U kompleksu mediteranskih šuma borova to su lokaliteti: Gorica i Ljubović u Podgorici, Lučice, Sušćepan i Herceg Novi (Savinska Dubrava, Kotobilje, Borići). U kompleksu termofilnih šuma hrasta, to su lokaliteti Paštrovačka Gora, Građen, Raušnik, Kakaritska gora i lokalitet Livari, sa šumom pitomog kestena. U kompleksu bukovih šuma permanentno su praćeni lokaliteti na Biogradskoj Gori i Bindži (Komovi). Gotovo svi nalazi iz šuma smrčice i jele vezuju se za planinski masiv Durmitora, mada ima i nalaza sa Hajle i iz okoline Rožaja. Šume munike predstavljaju lokaliteti na Humu Orahovskom, Kučkim Koritima i na Kastratu, sa pojedinačnim nalazima na Orjenu i Prokletijama. Šume molike su mikološki neistražene, sa nekoliko nalaza makromiceta sa lokaliteta Ridsko jezero.

Veliki broj lokaliteta je za sada ostao nepokriven ili sa malim brojem nalaza, iako je na osnovu dosadašnjih obilazaka terena i determinacije prikupljenog materijala očigledno da se oni odlikuju velikim bogatstvom vrsta gljiva. Pojedinačne posete novim lokalitetima, često su beležile brojne taksonomski i ekološki zanimljive vrste, što podržava opredeljenje da se ovakva istraživanja nastave. S druge strane, u crnogorskoj mikologiji se zapaža trend zapostavljanja principa široko-obuhvatnog evidentiranja vrsta i njihove distribucije. Sve je prisutnija tendencija specijalizacije i upućivanja ka pojedinim taksonomskim grupama (Boletales, Pezizales). Imajući u vidu da je na teritoriji Crne Gore izdvojeno 37 klasa, 53 reda, 97 sveza i 267 asocijacija (BLEČIĆ i LAKUŠIĆ, 1967), što je više nego u celoj srednjoj Evropi, ovde treba očekivati izuzetno bogatstvo gljiva (PERIĆ i PERIĆ 2004).

Posmatrano u generalnim crtama, kada se uzmu u obzir frekventnost obilazaka terena i broj nalaza sporokarpa, teritorijalna pokrivenost se može smatrati dobrom. Raspoloživi podaci predstavljeni i analizirani zbirno i na nivou klimatogenih šumskih zajednica pružaju dobar uvid u zastupljenost i značaj pojedinih taksona, grupa taksona ili rodova u odgovarajućim zajednicama.

Trofički status pojedinih vrsta, odnosno rodova gljiva nije rešen (TEDERSOO *et al.*, 2010, TAMM *et al.*, 2010). *Humaria*, *Peziza*, *Trichophaea* kao i *Geopora* (Ascomycota, Pezizales), koji su zabeleženi u Crnoj Gori, predstavljaju poli- ili parafilektičke rodove koji sadrže kako ektomikorizne tako i saprobne vrste (TEDERSOO *et al.*, 2010, TAMM *et al.*, 2010). Broj nalaza vrsta iz ovih rodova na planetarnom nivou nije velik, što otežava preciznije taksonomsko opisivanje i filogenetsku analizu.

Mnoge Pezizales u Crnoj Gori zabeležene su posle požara na gorelom drvetu, kao i na nekim drugim substratima, ili siromašnim staništima. Prema TEDERSOO *et al.*, 2010 (cit. WARCUP, 1990) mnogi *Peziza* taksoni koji se javljaju posle požara lako formiraju mikorize sa brojnim domaćinima, a česti su u aridnim i semiaridnim oblastima (TEDERSOO *et al.*, 2010 cit. TRAPPE *et al.*, 2008). Poslednjih godina intenzivirana su izučavanja vrsta iz reda Pezizales u Crnoj Gori, pri čemu se potvrđuju teškoće u njihovom taksonomskom opisivanju. Ona u perspektivi mogu da doprinesu boljem poznavanju ekologije i filogenetskim odnosima u okviru ovog reda.

Do sada je u Crnoj Gori u okviru reda Pezizales objavljeno 50 taksona. U okviru rodova sa spornim trofičkim statusom (*Humaria*, *Peziza*, *Trichophaea* i *Geopora*) determinisana su 24 taksona. Među rodovima Basidiomycota konsatovanim u Crnoj Gori kod kojih trofički status nije u potpunosti rešen nalaze se: *Amanita* (26), *Entoloma* (12) i *Ramaria* (9); ukupno 47 taksona.

Aktuelna slika o diverzitetu ektomikoriznih gljiva u šumama Crne Gore formirana je na osnovu praćenja plodonošnje ektomikoriznih gljiva. Međutim, mikološka istraživanja u svetu počinju da se kreću u drugom pravcu. Pokazalo se da isključivo praćenje pojave sporokarpa ne obezbeđuje celovite informacije o populacijama ektomikoriznih gljiva, koje naseljavaju mikorizovane korenove (GARDES i BRUNS, 1996). Oslanjajući se isključivo na prisustvo sporokarpa, može se dobiti iskrivljena slika, o učešću pojedinih vrsta u populacijama. Preciznije informacije o prisustvu određenih vrsta u ekosistemu dobijaju se identifikacijom tipova mikorize na osnovu analize korenova prikupljenih u prirodnim populacijama. (GARDES i BRUNS, 1996; RICHARD *et al.*, 2005). U današnje vreme, ova istraživanja se uspešno obavljaju korišćenjem molekularnih metoda, što je predstavljeno u poglavlju 5 ove doktorske disertacije.

Iako su podaci dobijeni isključivo na onovu analize pojave plodonosnih tela u prirodi, sa relativno malog broja lokaliteta u odnosu na raznovrsnost staništa u Crnoj Gori, oni pokazuju bogatstvo diverziteta ektomikoriznih gljiva u šumama Crne Gore.

Iako je funkcionalni značaj pojedinih taksona još uvek slabo istražen, poznato je da je diverzitet ektomikoriznih gljiva veoma važan za funkcionisanje šumskih ekosistema. BURNS (1995) naglašava da su faktori koji kontrolišu raznovrsnot ektomikoriznih gljiva na globalnom, regionalnom, pa čak i na nivou pojedračnog korena, još uvek predmet otvorene debate.

1.2.5. Zaključak

Analiza diverziteta i rasprostranjenja ektomikorize značajna je za razumevanje njene ekološke uloge. Dosadašnjim istraživanjima je na osnovu praćenja pojave plodonosnih tela zabeleženo 48 rodova ektomikoriznih gljiva: 12 rodova Ascomycota i 38 rodova Basidiomycota. Ukupan broj pretpostavljeno mikoriznih taksona je 317, što predstavlja oko trećinu makromiceta zabeleženih u Crnoj Gori. Od toga 267 taksona pripada Basidiomycotama a 50 Ascomycotama.

Na osnovu sprovedene analize, najbrojniji ektomikorizni rodovi među Basidiomycota-ma u Crnoj Gori su: *Lactarius* (30), *Russula* (27), *Amanita* (26), *Boletus* (26), *Tricholoma* (18), *Cotinarius* (17), *Hygrophorus* (16), *Inocybe* (11), *Entoloma* (12), *Chantharellus* (11). Među Ascomycota-ma, to su : *Peziza* (18), *Helvella* (11) i *Geopora* (5).

U mediteranskim šumama borova zabeleženo je 73 taksona, u termofilnim hrastovim šumama zabeležen je 131 takson, u šumama bukve 159 taksona, u šumama smrče i jele 79 taksona i u šumama munike i molike zabeleženo je 22 taksona pretpostavljeno ektomikoriznih gljiva.

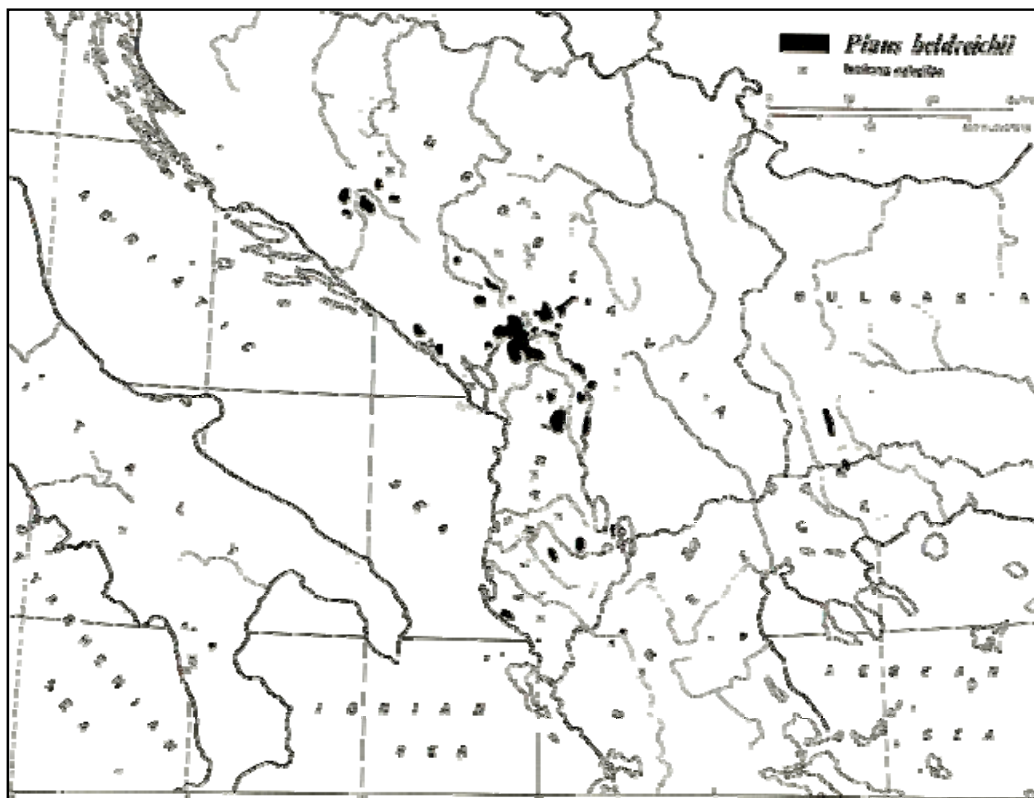
Mikološka istraživanja u Crnoj Gori nisu ravnomerno pokrila čitavu teritoriju Crne Gore. Vreme u kojim su žapočeta, otežani uslovi i problemi koji inače prate pionirski rad

uzrokovali su neujednačenost i razlike kako u proučenim lokalitetima tako i u broju zabeleženih taksona, unutar pojedinih šumskih zajednica. Pretpostavlja se da je bogatstvo diverziteta gljiva u šumama Crne Gore veće i stoga je započeta istraživanja potrebno nastaviti.

Raspoloživi podaci predstavljeni i analizirani na nivou klimatogenih šumskih zajednica omogućavaju dobar uvid u zastupljenost i značaj pojedinih taksona grupa taksona ili rodova u odgovarajućim šumskim zajednicama.

1.3. Munika, subendemo-reliktni bor Balkana

Munika je tercijarni relik i subendemit Balkanskog i najjužnijih delova Apeninskog poluostrva. Na Balkanu, njene sastojine nalaze na planini Hranisavi (Bosna), zatim na Čvrsnici, Čabulji i Prenju (Hercegovina); u Crnoj Gori raste na Orjenu, Bjeloj Gori, Lovćenu, Durmitoru, Sinjajevini, Bjelasici, Maganiku, Kameniku, Komovima, Koritniku, i na padinama Prokletija, preko kojih prelazi na albanske planine, pa dopire u Grčku na planine Pind i Olimp. U Makedoniji raste na Galičici, Korabu, Rudoki, na kosovskom ogranku Šare, pa dalje na istoku na bugarskim planinama Pirinu i Sjavjanki - Ali Botušu. U Albaniji munika raste od severa do juga zemlje (VIDAKOVIĆ, 1982). U južnoj Italiji raste na malom prostoru Kalabrije i Brazilikata (Slika 3).



Slika 3. Rasprostranjenost *Pinus heldreichii*, prema CRITCHFIELDU i LITTLENU (1966) (preuzeto od VIDAKOVIĆ, 1982).

Na nekim planinama šume munike i molike predstavljaju klimaks zajednice uslovljene specifičnom visokoplaninskom klimom (JANKOVIĆ, 1960).

Munika - *Pinus heldreichii* Christ. i molika- *Pinus peuce* Gris. spadaju među najznačajnije vrste dendroflore Balkanskog poluostrva (JANKOVIĆ, 1960).

Munika i molika imaju isto visinsko rasprostranjenje, one rastu u istoj visinskoj zoni nekih mediteranskih i submediteranskih balkanskih planina. U skladu sa specifičnostima svojih ekoloških i fizioloških osobina, ali i uslova sredine u kojoj žive, one se uzajamno isključuju ili dopunjavaju. Prilagođene su kratkom vegetacionom periodu visokoplaninske zone, sušnom i toplom planinskom letu sa veoma intenzivnom sunčevom radijacijom, ali i surovim zimama. Ekološke i fiziološke karakteristike munike i molike, posebno adaptacije koja im omogućavaju da podnesu velike ekstreme između leta i zime, omogućile su im da izgrade nekada moćan visokoplaninski pojas kserotermne i frigofilne vegetacije Balkanskog poluostrva. Danas je ova vegetacija antropogeno veoma degradirana i poremećena (JANKOVIĆ, 1960).

Primarno stanište munike predstavlja karbonatni supstrat na visokim planinama subalpskog regiona. Munika takođe raste i na serpentinskoj podlozi Šar-planine i nekih albanskih planina, kao i na silikatnoj podlozi na Prokletijama. Na primarnom staništu raste veoma sporo, na Prokletijama stabla munike starosti 150 godina dostižu visinu od 15,5 m. Na terenima sa silikatnim supstratom munika bolje raste nego na krečnjaku, i ukoliko nema konkurencije sa brzorastućim vrstama može dostići visine i do 20 m (VUKIĆEVIĆ, 1974).

Munika može da se javi i kao pionirska vrsta ukoliko se na nižim nadmorskim visinama desi požar ili seča pa je primarna šumska vegetacija uništena. Šume munike tada rastu na sekundarnom staništu i predstavljaju prvu etapu u progresivnoj sukcesiji. Međutim, trajnije održavanje ovih šuma uslovljeno je odgovarajućim gazdovanjem od strane čoveka, a ono je diktirano fiziologijom i bioekologijom ove vrste (JANKOVIĆ, 1972).

Stabla munike imaju piramidalnu krošnju. Kora stabla je veoma debela, siva, ispucala u pločice, nalik panciru. Igllice su po dve na kratkom izbojku, mlade igllice su svetlo-zelene, dok su starije sjajno-zelene. U toku razvoja, stabla munike razvijaju veoma jak i razgranat koren koji im obezbeđuje stabilnost u surovim klimatskim i stanišnim uslovima (VIDAKOVIĆ, 1982). Koren munike prodire duboko u kamenite pukotine krečnjaka i mestimično je deblji od samog debla. Prema KNEŽEVIĆ (1958), nijedna druga vrsta ne bi se

održala na tako strmim položajima gde je munika sebi pronašla mesto i razvila se u srednje visoka lepo razvijena stabla.

U prirodnim sastojinama munika počinje da plodonosi nakon 40-te godine, a na osami znatno ranije. Munika semenosi svake godine, a periodičnost semenošenja ispoljava se smenama perioda sa dobrim i smanjenim urodom. Pojedina stabla po svojoj genetičkoj predispoziciji su sklona da obrazuju veliki broj šišarica iz godine u godinu, a druga neznatan broj. Neka stabla osim što obrazuju različit broj šišarica iz godine u godinu, takođe obrazuju različit broj semena u šišaricama (STOJČIĆ, 2005). Pri izboru stabala u semenskim sastojinama ili pri podizanju klonskih plantaža neophodno je poznavanje ovih karakteristika. Putem odabiranja moguće je odgajiti klonove koji mogu obezbediti veću količinu šišarica po hektaru, a takođe i veću količinu semena. Semena munike su dormantna, a za prekid dormancije neophodno je semena stratifikovati šest nedelja na 3-5 °C (STILINOVIĆ, 1985). Prema JOVANOVIĆ (1971), munika pokazuje ograničenu sposobnost za prirodno podmlađivanje, te je zbog ove činjenice neophodno je pronaći načine da se ova vrsta očuva i obnovi na njenim prirodnim staništima.

Značaj munike za šumarstvo proističe ne samo iz činjenice da je ova vrsta subendemit i tercijerni relikat koji izgrađuje posebnu šumsku zonu sve do gornje šumske granice već i zbog karaktera i položaja visinske vegetacijske zone koju izgrađuje. Nalazeći se u najvišoj vegetacijskoj šumskoj zoni niza balkanskih planina, vegetacijski pojas munike ima izrazito zaštitnu ulogu, jer se ovaj pojas suprotstavlja razornom i često katastrofalnom dejstvu erozije, bujica i lavina. Međutim, visokoplaninski šumski pojas munike je danas veoma raskidan, mnogi njeni kompleksi su devastirani i degradirani a na mnogim planinskim masivima svedeni su na najmanju meru ili čak sasvim uništeni (JANKOVIĆ, 1972). Imperativ našeg šumarstva je restauracija visokoplaninske vegetacijske zone šuma munike u čitavom području njihovog prirodnog areala, i zato na obnovi klimatogenog vegetacijskog visokoplaninskog šumskog pojasa munike treba insistirati (JOVANOVIĆ, 1971). Izrazita otpornost prema nepovoljnim klimatskim uslovima i uslovima staništa ukazuje da je ova vrsta pogodna za pošumljavanje siromašnih terena i da je moguće podizanje šumskih zajednica izvan prirodnog areala munike (JOVANOVIĆ, 1971). Pokušaja

da se munika introdukuje van njenog prirodnog areala je bilo i pre više decenija kada su u severnim delovima Srbije podignute grupacije ili manje kulture munike (STILINOVIĆ i TUČKOVIĆ, 1972). Prednosti koje munika ima treba da podstaknu šumare da muniku koriste za pošumljavanje kserotermnijih a ponekada i mezofilnijih staništa (STOJČIĆ, 2005).

Ova vrsta se veoma dobro razvija i u uslovima gradske klime, i dobro podnosi zagađenost gradskog vazduha.

Opažanja sa terena međutim pokazuju da se u poslednje vreme, usled smanjene ispaše, munika uspešno prirodno obnavlja na mnogim lokalitetima (iznad 1200-1400 mnnv), a glavni faktor koji ugrožava njene populacije danas predstavljaju požari.

Prema navodima KONTIĆ (1962), na Morakovu se, na oko 1000 mnnv, pojavljuje se odličan prirodni podmladak munike, naročito na terenima gde je bio veći zahvat seče, ili gde ranije uopšte nije bilo munike. I na onim površinama koje su bile bez biljnog pokrivača. Zahvaljujući dobrom biološkom potencijalu munike, danas imamo jako sklopljene mlade sastojine. Prema podacima uredjajnog elaborata u pojedinim odeljenjima ima preko 2200 stabala po ha, što govori da je prirodno podmlađivanje na ovom terenu odlično uspelo.“

1.3.1. Šume munike *Pinion heldreichii* Horv.

Munika izgrađuje raznovrsne i brojne šumske zajednice koje su uslovljene nizom spoljašnjih uslova, geografskim položajem planinskih masiva, geološkom podlogom, nadmorskom visinom. Ovo su svetle šume, pa to omogućava postojanje raznovrsne spratovnosti žbunastih i prizemnih biljaka (JANKOVIĆ, 1972).

Sveza šuma munike predstavljena je u Crnoj Gori sa tri geografske varijante: primorskom *Pinetum heldreichii mediteraneo-mnontanum* Bleč et Lakl. 69, prokletijskom *Pinetum heldreichii bertisceum* Bleč. 59 i kontinentalnom *Pinetum heldreichii continentale* Bleč et Lak. 69.

Primorska varijanta obuhvata šume munike na Orjenu. Lovćenu. Rumiji, Štitovu. Maganiku i Prekornici. Prokletijskoj varijanti pripadaju šume munike na Komovima i Prokletijama, a kontinentalnoj varijanti šume munike na Bjelasici i Sinjajevini.

Meditersko montane šume munike javljaju se u pojasu između 1200 i 1800 m nad morem, na svim ekspozicijama i nagibima između 5 i 40°, na karbonatnim i plićim karbonatnim tlima. Skup karakterističnih vrsta čine *Pinus heldreichii*, *Senecio visianianus*, *Dianthus petraeus* ssp. *Novakovicii*, *Gentiana amblyphylla*, *Lonicera glutinosa* i *Cerastium grandiflorum*. Daljom evolucijom tla i vegetacije ove šume prelaze u termofilne šume mezijске bukve (BLEČIĆ i LAKUŠIĆ, 1969).

Prokletijske šume munike, *Pinetum heldreichii bertisceum* Bleč.59, zauzimaju širok pojas na karbonatnim masivima Prokletija, između 1500 i 2000 mnv, na svim ekspozicijama i nagibima. U karakterističnom su skupu vrste *Pinus heldreichii*, *Daphne oleides*, *Daphne blagayana* ssp. *Zogovici*, *Wulfenia bleicii* ssp. *Bleicci*, *Thymus albanicus*, *Acinos alpinus* ssp. *Dinaricus*, *Achillea abrotanoides* ssp. *Montenegrina*, *Euphorbia montenegrina* i dr. Daljom evolucijom tla i vegetacije prelaze u jelove i bukovo jelove mediteransko-montane šume, a na severoistočnim Prokletijama i u smrčevo jelove (BLEČIĆ i LAKUŠIĆ, 1969).

Kontinentalne šume munike *Pinetum heldreichii* continentale Bleč. et Lak. 69 javljaju se u obliku eksklava na južnim ekspozicijama Bjelasice i drugih kontinentalnih dinarskih planina Crne Gore, u pojasu između 1500 i 1700 mnv na strmim nagibima (između 30 i 70°). Geološku podlogu čine trijaski krečnjaci, a zemljišta su kalkoregosol i kalkomelanosol, ređe degradirani kalkokambisol. Skupinu karakterističnih vrsta čine: *Pinus heldreichii*, *Daphne blagayana*, *Pinus sylvestris* var. *Dinaricus*, *Thimus balcanus*, *Silene viridiflora*, *Laserpitium marginatum* i dr. Evolucija tla i vegetacije u ekosistemu kontinentalnih šuma munike vodi prema jelovo-smrčevim, subalpskim bukovo-javorovim ili subalpskim smrčevim šumama, što upućuje na floristički sastav recentne fitpcenoze (BLEČIĆ i LAKUŠIĆ 1969).

Geološku podlogu šuma munike najčešće čine mezozojski krečnjaci, a najrasprostranjeniji tipovi tla su buavica i smeđe krečnjačko koje je najčešće erodirano (zemljišta razvijena na krečnjacima od sirozema na krečnjacima do humusnog i smeđeg krečnjačkog zemljišta).

Što se tiče količine padavina, može se računati na godišnju sumu padavina od oko 2000-3000 mm, ponekad, naročito kada su u pitanju mediteransko montane šume munike i više (preko 5000 mm). Raspodela padavina u toku godine, međutim, nije povoljna, jer je u toku vegetativnog perioda ukupna količina padavina veoma niska (što je za vegetaciju od znatno većg značaja, nego ukupna količina padavina).

Spektar fitocenotipova ukazuje na brojno prisustvo i značajne pokrovne vrednosti elemenata reliktnih borovo-crnjušinih šuma Klase *Erico-Pinetea* Horv.

Najbrojniji pratioci u prizemnom spratu munikinih šuma su biljke planinskih rudina na krečnjacima Klase *Elyno-Seslerietea* Br.-Bl. i biljke pukotina krečnjačkih stena Klase *Asplenietea rupestris* (H. Meyr)Br.-Bl., koje zakonito predstavljaju prvu fazu u razvoju odnosno progradaciji mediteransko-montanih i subalpskih šuma munike na Balkanskom i Apeninskom poluostrvu (BLEČIĆ i LAKUŠIĆ 1969).

Spektar flornih elemenata pokazuje izrazitu dominaciju balkanskih endemičnih biljaka, posle koje slede submediteranske vrste sa arealima u različitim pravcima (istočno-submediteranske, submediteransko-subatlanske, submediteransko-prealpske, submediteransko-kontinentalne i druge). Najmanje je alpskih vrsta, a nešto više su zastupljene severno-evroazijske-cirkumborealne biljke, što je sasvim razumljivo s obzirom na reliktni karakter ovih šuma i njihovu autohtonost u jugoistočnoj Evropi.

Spektar životnih oblika ukazuje na izrazitu dominaciju hemi-kriptofita, što je uslovljeno svetlosnim režimom u munikinim šumama i visokim temperaturnim amplitudama, a naročito apsolutnim minimalnim temperaturama, koje u subalpijskom pojasu mogu da se spuste i na -30°C . Visok procenat hamefita je uglavnom prouzrokovan letnjom fizičkom sušom staništa, a procenat geofita i terofita je visok. Fanerofite u kvantitativnom pogledu dominiraju i određuju fizionomiju zajednice, fitoklimu i floristički sastav prizemnog sprata biljaka.

„Nakon analiza i komparativnih studija svih zajednica munike u Jugoistočnoj Evropi, s jedne strane i njihove komparacije sa šumama crnog i belog bora u brdskom i gorskom pojasu na dolomitima, serpenitima i krečnjacima, postaje sasvim jasno da sve svetle četinarske šume jugoistočne i južne Evrope pripadaju Redu *Pinetalia Heldreichii-nigrae*, Lkšić 1970, odnosno Klasi *Erico-Pinetea* Horvat“ (BLEČIĆ i LAKUŠIĆ 1969).

2. Sinteza mikorize munike pod kontrolisanim uslovima

2.1. Uvod

Borovi obligatno rastu u simbiozi sa ektomikoriznim gljivama - obligatni su mutualisti (SMITH i READ 1997; READ 1998). *Pinus heldreichii* Christ. -munika, kao tercijalni relikat i subendemit, predstavlja jedan od najinteresantnijih elemenata dendroflora Balkana. Zajednice gljiva u šumama munike su slabo istražene, dok ektomikorizne zajednice munike nisu do sada opisivane, niti potvrđene. Zbog toga njihovo proučavanje i opisivanje ima u prvom redu karakter fundamentalnog istraživanja.

Zbog svoje ekološke plastičnosti munika može da se koristi za pošumljavanje ekstremnih terena. U tom smislu pažnju zavređuju ektomikorizne gljive koje opstaju baš na ovakvim staništima.

Cilj ovog istraživanja je da se kroz oglede sinteze pokaže da su pojedine vrste gljiva koje plodonose u šumama munike njeni mikorizni simbionti. S obzirom da se većina ektomikoriznih gljiva odlikuje niskim stepenom specifičnosti prema domaćinu u ogledima sinteze su korišćeni i izolati gljiva poreklom iz drugih šumskih ekosistema.

Neophodan uslov za sprovođenje oglada sinteze mikorize predstavljaju čiste kulture ektomikoriznih gljiva. S toga je prvi zadatak u ovom istraživanju bio izolacija ektomikoriznih bazidiomiceta u čiste kulture i formiranje mikoteke. Čiste kulture imaju značaja jer mogu da posluže za proučavanje ekologije gljiva u uslovima *in vitro*⁵, kao i za inokulaciju sadnica četinara i lišćara u rasadničkoj proizvodnji⁶. Poznato je da izolacija ektomikoriznih gljiva u čiste kulture za većinu vrsta povezana sa brojnim poteškoćama i problemima. Većina ovih vrsta na hranljivim podlogama ima specifične zahteve, i odlikuje se sporim rastom. Poznato je takođe da mnoge vrste ektomikoriznih gljiva nikada nisu izolovane u kulture (NYGREN, 2008; TEDERSOO *et al.*, 2010). Pokazalo se tokom rada da mnoge od vrsta, i nakon uspešne izolacije brzo propadaju- ne budu sačuvane u čistoj

⁵ poglavlje 5

⁶ poglavlje 6

kulturi. Da bi se potvrdio identitet dobijenih kultura, ITS region rDNK je sekvenciran upotrebom prajmera ITS1F i ITS4B, a dobijene sekvence su poređene sa bazama podataka UNITE (KOLJALG *et al.*, 2005) i NCBI banke gena (BENSON *et al.*, 2005.), što je opisano u poglavlju 3.

U oglecima sinteze testirano je nekoliko različitih metoda inokulacije klijavaca munike, što je trebalo da obezbedi formiranje simbioze, kao i da pomogne u izboru optimalnog metoda inokulacije sadnica u rasadničkoj proizvodnji sadnica četinarara.

U skladu sa iskustvima stečenim tokom ovih istraživanja, koncipiran je dalji rad koji se odnosio na:

1. Proučavanje ektomikoriznih zajednica munike na osnovu populacija gljiva prisutnih na korenovima munike iz prirodnih populacija (poglavlje 4)
2. inokulaciju sadnica crnog bora u uslovima rasadničke proizvodnje (poglavlje 6).

2.2. Materijal i metod

2.2.1. Izolacija ektomikoriznih bazidiomikota

U periodu 2005-2010, sporokarpi pretpostavljeno mikoriznih gljiva prikupljeni su sa različitih lokaliteta u Crnoj Gori. Izvršena je taksonomska identifikacija prikupljenih plodonosnih tela. Da bi se dobile čiste kulture gljiva, izvršena je izolacija iz sporokarpa na Modifikovanoj Melin-Norkrans hranljivoj podlozi (MMN) (MARX, 1969), sa dodatkom 50 ppm antibiotika Streptomycin (Galenika, Srbija), Ampicillin (Panfarma, Srbija) i 5 ppm Benomyl-a (Zorka, Srbija). Kulture su inkubirane na 22 °C u periodu od 10-40 dana zavisno od vrste. Dobijeni izolati presejani su na neselektivnu MMN podlogu, a zatim i u epruvete sa MMN podlogom. Kulture su održavane presejavanjem na svaka 3-4 meseca (PARLADE *et al.*, 1996; RINCON *et al.*, 1999).

Modifikovana Melin-Norkransova (MMN) hranljiva podloga priprema se prema sledećoj recepturi (MARX, 1969).

		AINSWORTH, 1993	MARX (1969)
CaCl ₂	1%	5 ml	0,05g
NaCl	1%	2.5 ml	0,025
KH ₂ PO ₄		0.5 g	0.5 g
(NH ₄) ₂ HPO ₄		0.25 g	0.25 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O		0.15 g	0.15 g
FeCl ₃	1%	1.2 ml	1.2 ml
malc ekstrakt		2 g	3 g
glukoza/saharoza		5 g	10 g
ekstrakt kvasca		1 g	/
Tiamin HCl		/	100 µ
agar		15 g	15 g
destilovana voda		do1000 ml	do1000 ml

2.2.2. Biljni materijal

Seme *P. heldreichii* sakupljano je u prirodnim šumskim sastojinama munike na lokalitetima Kučka Korita i Kastrat u nekoliko uzastopnih godina (tabela 2). Seme je, posle izdvajanja iz šišarica i čišćenja čuvano na +4 °C i po potrebi korišćeno za setvu ili naklijavanje za ogleda sinteze mikorize.

Tabela 2. Lokaliteti i vreme sakupljanja semena *P. heldreichii* korišćenog tokom istraživanja.

lokalitet	datum sakupljanja	nadmorska visina	N	E
Kastrat	10.09. 2006.	≈1300mnv	42°34'	019°29'
	03.09.2008.			
Korita	05.09.2006.	≈1200 mnv	42°28'	019°30'
	28.08.2007.			
	03.09. 2008.			

Tretman semena pre setve podrazumevao je u svim ogledima potapanje semena u vodu tokom noći, i površinsku sterilizaciju potapanjem u 3% H₂O₂ u trajanju od 20-25 minuta. Posle toga seme je ispirano vodom, prosušeno i sejano.

2.2.3. Inokulacija sadnica

U tabeli 3 dat je pregled izolata mikoriznih gljiva korišćenih u ogedima sinteze mikorize, sa primenjenim tehnikama sinteze mikorize, i vremenom inokulacije.

Tabela 3. Izolati korišćeni u ogedima sinteze mikorize sa *P. heldreichii*, primenjeni metodi inokulacije i vreme inokulacije

br	vrsta/izolat	oznaka izolata	domaćin	tip inokuluma/inokulacije			
				nesterilno			ster
				suspenzija micelij 2007	suspenzija spora 2007	vermikult. inokul. 2008	micelij 2009
1	<i>Amanita</i> sp.	AG	<i>Pinus halepensis</i>	+			
2	<i>Amanita crocea</i> (Quél.)Singer	26 (AC)	<i>Fagus moesiaca</i>			+	
3	<i>Amanita muscari</i> (L.)Lam.	24 (AM)	<i>Picea abies</i>				+
4	<i>Inocybe</i> sp.	IG	<i>Pinus halepensis</i>	+			
5	<i>Hebeloma sinapizans</i> (Fr.)Sacc.	36 (HM)	<i>Pinus heldreichii</i>	+		+	
6	<i>Tricholoma batchii</i> Gulden	12 (TBK)	<i>Pinus heldreichii</i>	+		+	
7	<i>Tricholoma imbricatum</i> (Fr.)Kumm	3 (TIK)	<i>Pinus heldreichii</i>	+			
8	<i>Tricholoma stans</i> (Fr.)Sacc.	21 (TSM 07)	<i>Pinus heldreichii</i>				+
9	<i>Boletus luridus</i> var. <i>luridus</i> Schaeff	27 (BL)	<i>Quercus cerris</i>		+	+	
10	<i>Leccinum scabrum</i> (Bull.)Gray	LSL	<i>Corylus colurna</i>	+			
11	<i>Chalciporus amarellus</i> (Quél)Bat.	8 (Ch.A)	<i>Pinus heldreichii</i>			+	
12	<i>Melanogaster odoratisimus</i>	MO	<i>Quercus</i> sp.			+	
13	<i>Pisolithus arhizus</i> (Scop.)Rauschert	1 (PT)	<i>Cedrus atlantica</i>				+
14	<i>Scloderma</i> sp.	6 (ST 08)	<i>Eucaliptus</i>				+
15	<i>Suillus colinitus</i> (Fr.)Kuntze	9 (SC)	<i>Pinus heldreichii</i>	+		+	
16	<i>Suillus granulatus</i> (L.)Rousell	2 (SGG)	<i>Pinus heldreichii</i>	+		+	
17	<i>Suillus granulatus</i> (L.)Rousell	SGK	<i>Pinus heldreichii</i>		+		
18	<i>Russula solaris</i> Ferd. & Winge	RS	<i>Fagus moesiaca</i>	+		+	
19	<i>Hydnellum</i> sp.	HYL	<i>Fagus moesiaca</i>	+			

2.2.3.1. Nesterilne tehnike inokulacije

Tokom ovih ogeda, biljke su gajene i inokulisane u laboratoriji, pod prirodnim ili veštačkim osvetljenjem, u saksijama ili kontejnerima.

2.2.3.1.1. Inokulum micelije

2.2.3.1.1.1. Vermikulitski inokulum i inokulacija sadnica

Za dobijanje vegetativnog inokuluma, micelije gljiva su gajena u tečnoj kulturi oko mesec dana ili na čvrstoj hranljivoj podlozi, a zatim je prebačena u staklene posude zapremine 0,4 -0,7 litara u kojima se nalazio vermikulit natopljen MMN hranljivom podlogom (glukoza redukovana na 2,5 g/l) do poljskog kapaciteta (dok podloga nije prekrila vermikulit, što je oko 250 cm vermikulita i oko 160 ml tečne podloge) i autoklaviran (20 min, 120°C) (RINCON *et al.*, 1999).

Vermikulitski inokulum pomešan je sa substratom koji se sastojao od mešavine treseta (Gramafloor, Nemačka) i vermikulita (1:1) u odnosu 1:4. Inokulisanim substratom su napunjene saksije zapremine 0,3 l, u koje je izvršena setva semena munike.

2.2.3.1.1.2. Suspenzija micelije i inokulacija sadnica

Micelija gljiva sa površine agar podloge, stara oko 2 meseca, homogenizovana je u laboratorijskom blenderu u sterilnoj destilovanoj vodi (PARLADE *et al.*, 2004).

Suspenzija micelije injektovana je u rizosferu klijanaca munike starih 2-3 meseca posejanih u mešavini treseta i perlita (1:1), u saksijama zapremine 0,3 l. Svaka biljka inokulirana je sa 10 ml suspenzije micelije.

2.2.3.1.2. Inokulum spora

Za inokulaciju sporama, korišćena su plodonosna tela *Melanogaster odoratisimus*, koji nije izolovan u čistoj kulturi i *Boletus luridus*. Spore *M. odoratisimus* su dobijene iz plodonosnih tela, koja su posle čišćenja (zemlje i peridiole) mlevena u laboratorijskom blenderu (CASTELLANO i MOLINA, 1989; PARLADE *et al.*, 1996).

Suspenzija spora *B. luridus* pripremana je na taj način što je kod prikupljenih plodonosnih tela sporonosni sloj sa cevčicama pažljivo je odvajan od ostalog dela plodonosnog tela i u svežem stanju (dan ili dva po sakupljanju) mešan sa destilovanom vodom i mleven u blenderu, da bi došlo do oslobađanja spora (TORES i HONRUBIA, 1994).

Koncentracija spora u suspenziji određivana je pomoću hematocitometra, i suspenzija je razblaživana da bi se dobile željene koncentracije.

Suspenzija spora injektovana je u rizosferu klijanaca munike starih 2-3 meseca posejanih u mešavini treseta i perlita (1:1) u kontejnerima. Svaka biljka inokulirana je sa 5 ml suspenzije micelije.

Pošto se pokazalo da će sadnice munike biti gajene duže od 3 meseca, vršeno je prihranjivanje sadnica sa 2g/l folijarnog đubriva Morton ijc plus NPK 19: 9: 27, (ZIKO s.a., Greece) i 0.5 g/l Fertilion Combi 2 (COMPO GmbH & Co.Kg, Germany), primenjenog dodavanjem rastvora đubriva u rizoseru biljke, pri čemu je svaka biljka primala po 10 ml rastvora, u proseku 3 puta u toku vegetacije u toku letnjih meseci (jedan put mesečno).

2.2.3.2. Sterilne tehnike inokulacije

Seme *P. heldreichii* postavljeno je na klijanje, posle potapanja u vodu tokom noći i tretmana Captan-om (Captan WP-50, Arysta Life Science, Japan), u plastičnim petri posudama i na vlažnom filter papiru, natopljenom rastvorom Captana. Seme je klijalo u periodu između 14 i 21 dan, i biljke su, po klijanju, kada je korenak bio 1-2 cm dug (maksimalno 4 cm) prebacivane u staklene posude sa inokulisanim substratom.

Substrat za inokulaciju, koji se sastojao se od oko 250 cm³ vermiculita natopljenog sa 160 ml tečne MMN podloge, autoklaviran je u zatvorenim⁷ staklenim posudama (teglama) zapremine 0,4l. Nakon toga substrat je inokulisan sa 3-4 isečka micelije iz agarne kulture ektomikoriznih gljiva, stare 30-60 dana.

U inokulisani supstrat su pažljivo postavljeni klijavci munike, sa korenkom od 1-2 cm, a retko do 4 cm.

Ogled je postavljen u periodu od 26. 05. do 02. 06. 2009, a završen 15.09.2009.

U ovom ogledu korišćene su gljive: *P. arbizus*, *S. granulatus*, *Scleroderma* sp. i *T.stans*

⁷ zatvorene posude: zatvorene sa poklopcem, koji je probušen, a zatim zatvoren komadom vate

Ogledi sinteze mikorize pod aseptičnim uslovima obavljani su u klima komori GC 300 (Korea), u kontrolisanim uslovima temperature i svetlosti u Fitopatološkoj laboratoriji Šumarskog fakulteta u Beogradu.

2. 2. 4. Praćenje mikorizacije

Mikorizirani korenovi sadnica su prikupljeni u periodu od najmanje 4 -6 meseca do 2 godine gajenja i pažljivo oprani od substrata. Formirane mikorizne strukture posmatrane su pod binokularnom lupom (Biooptica XTL-2400D i Zeis Discovery V12- uvećanja 40-90x). Pravljeni su ručni poprečni i uzdužni preseki na kojima je pod stereomikroskopom (Zeis Axioskop 2 plus, Leica DMLS) posmatrano prisustvo Hartigove mreže (uvećanje 200-1000x). Preseci su posmatrani u vodi ili bojani Chlorazol crnom E bojom i Toulidine plavom bojom, kao i Pamučno plavom, IKI i Melzerovim reagensom. Deo korenova prtetodno je obezbojavan (10% KOH) pre bojenja, radi lakšeg uočavanja prisustva Hartigove mreže.

Beležene su generalne morfološke karakteristike mikorize: boja omotača, porast micelije izvan omotača, prisustvo rizomorfi/micelijalnih traka, kao i razvijenost Hartigove mreže (RINCON *et al.*, 1999).

Ove karakteristike ocenjene su na sledeći način:

Razvijenost Hartigove mreže:

- + Hartigova mreža razvijena u spoljnjem sloju ćelija korteksa,
- ++ Hartigova mreža razvijena u prvom i drugom sloju ćelija korteksa,
- +++ Hartigova mreža razvijena u prvom do trećem sloju ćelija korteksa.

Porast micelije izvan omotača :

- nije zabeležen
- + retak
- ++ obilan
- +++ vrlo obilan

Rizomorfe/micelijalne trake:

- nisu zabeležene
- + retke
- ++ obilne
- +++ vrlo obilne

2.3. Rezultati istraživanja

2.3.1. Izolacija gljiva u čiste kulture

Lista izolata ektomikoriznih gljiva koji su dobijeni iz plodonosnih tela i korišćeni na neki način tokom istraživanja navedena je u tabeli 4. Ova zbirka sadržala je 44 kulture pretpostavljeno ektomikoriznih gljiva.

Tabela 4. Kulture ektomikoriznih gljiva, dobijene iz plodonosnih tela sakupljenih u Crnoj Gori u periodu 2005-2010.

	vrsta gljive	izolat	biljka domaćin	datum sakupljanja	lokalitet
AGARICALES					
<i>Amanitaceae</i>					
1	<i>Amanita caesarea</i> (Scop.)Pers.	7	<i>Castanea sativa</i>	26.10.2008.	Livari, Skadarsko jez.
2	<i>Amanita crocea</i> (Quél)Singer	26	<i>Fagus moesiaca</i>	12.07.2005.	Biogradska gora
3	<i>Amanita muscaria</i> (L.)Lam.	24 AMD-X-08	<i>Picea abies</i>	10. 2008.	Durmitor, Crno jezero
4	<i>Amanita pantherina</i> (DC)Krombh	23	<i>Quercus cerris</i>	07. 2009.	Kržanja, Kuči
5	<i>Amanita vaginata</i> (Bull) Lam.	25	<i>Pinus halepensis</i>	4. 10. 2006.	Gorica, Podgorica
<i>Cortinariaceae</i>					
6	<i>Cortinarius sp.</i>	14	<i>Pinus heldreichii</i>	23.09.2009.	Kastrat, Kuči
<i>Strophariaceae</i>					
7	<i>Hebeloma sinapizans</i> (Fr.)Sacc.	36 HsM-IX-06	<i>Pinus heldreichii</i>	27.09. 2006.	Građen, Kuči
<i>Hydnangiaceae</i>					
8	<i>Hygrophorus eburneus</i> (Bull)Fr.	19	<i>Fagus moesiaca</i>	6.10. 2009.	Građen, Kuči
9	<i>Hygrophorus marzuolus</i> (Fr.)Bres.	16	<i>Fagus moesicae</i>	06.2010.	Hrid
10	<i>Hygrophorus hipothejus</i> (Fr.) Fr.	17	<i>Pinus heldreichii</i>	10.2010.	Hum Orahovski
11	<i>Hygroporus gliocyclus</i> Fr.	18	<i>Pinus heldreichii</i>	10.2010.	Hum Orahovski
12	<i>Hygroporus sp.</i>	20 HyG1-X-09	<i>Fagus moesiaca</i>	07.2009.	Račama, Kuči

	vrsta gljive	izolat	biljka domaćin	datum sakupljanja	lokalitet
Inocybaceae					
13	<i>Inocybe</i> sp.	IG	<i>Pinus halepensis</i>	4.10.2006.	Gorica, Podgorica
Hydnangiaceae					
14	<i>Laccaria ametystina</i> Cooke	34	<i>Quercus cerris</i>	24.09.2009.	Grđjen, Kuči
15	<i>Laccaria laccata</i> (Scop.)Cooke	35	<i>Fagus moesiaca</i>	10.2010.	Hum Orahovski
Tricholomataceae					
16	<i>Tricholoma batchii</i> Gulden	22 TBG-XI-09	<i>Pinus halepensis</i>	14.11.2009.	Gorica, Podgorica
17	<i>Tricholoma batchii</i> Gulden	12 TBK-X-06	<i>Pinus heldreichii</i>	7.10.2006.	Korita, Kuči
18	<i>Tricholoma imbricatum</i> (Fr.)Kumm	3 TIK1-IX-09	<i>Pinus heldreichii</i>	27.09.2006.	Građen, Kuči
19	<i>Tricholoma imbricatum</i> (Fr.)Kumm	39 TIK2-X-10	<i>Pinus heldreichii</i>	10.2010.	Korita, Kuči
20	<i>Tricholoma stans</i> (Fr). Sacc.	21	<i>Pinus heldreichii</i>	12.10.2007.	Bindža, Kuči
21	<i>Tricholoma sulphureum</i> Kumm.	13	<i>Castanea sativa</i>	26.10.2008.	Livari, Skadarsko jez.
BOLETALES					
Boletaceae					
22	<i>Boletus luridus</i> var. <i>luridus</i> Schaeff	27 BL1-VII-09	<i>Quercus cerris</i>	07.2009.	Kržanja, Kuči
23	<i>Boletus luridus</i> var. <i>luridus</i> Schaeff. (1)	30 BL2-VII-10	<i>Quercus cerris</i>	07.2010.	Kržanja 2, Kuči
24	<i>Boletus radicans</i> Pers. : Fr	29 Brad1-X-10	<i>Quercus cerris</i>	5.10.2009.	Građen, Kuči
25	<i>Boletus satanas</i> Lenz	28 Bsat-X-10	<i>Quercus cerris</i>	3.10.2010.	Građen, Kuči
26	<i>Leccinum scabrum</i> (Bull.)Gray	LSL	<i>Corylus colurna</i>	4.09.2006.	Građen, Kuči
27	<i>Chalciporus ammarelus</i> (Quél) Bataile	8 ChA1-X-09	<i>Pinus heldreichii</i>	19.10.2009.	Korita, Kuči
28	<i>Xerocomus</i> sp. 1	31	<i>Simphoricarpus</i> sp.	07.2009.	Podgorica
29	<i>Xerocomus</i> sp. 2	32	<i>Fagus moesiaca</i> + <i>P. heldreichii</i>	07.2009.	Raçama, Kuči
30	<i>Xerocomus</i> sp. 3	33	<i>Quercus cerris</i>	07.2009.	Kržanja, Kuči
31	<i>Xerocomus rubellus</i> (Krombh.) Quél.	11 XRQ-VII-09	<i>Quercus ilex</i>	07.2009.	Podgorica

	vrsta gljive	izolat	biljka domaćin	datum sakupljanja	lokalitet
Sclerodermataceae					
32	<i>Pisolithus arhizus</i> (Scop.)Rauschert	1 SPT1-X-09	<i>Cedrus atlantica</i>	10.09.2008. 04.09.2009.	Podgorica
33	<i>Scleroderma</i> sp.	6 ScT-X-08	<i>Eucaliptus, Prunus</i>	25.10. 2008.	Tivat
Suillaceae					
34	<i>Suillus granulatus</i> (L.)Rousell	2 SGG1	<i>Pinus heldreichii</i>	24.06.2007.	Građen, Kuči
35	<i>Suillus granulatus</i> (L.)Rousell	SGK	<i>Pinus heldreichii</i>	7.10.2007.	Korita, Kuči
36	<i>Suillus granulatus</i> (L.)Rousell	38 SGH2	<i>Pinus heldreichii</i>	10. 2010.	Hum Orahovski
37	<i>Suillus collinitus</i> (Fr)Kuntze	9 ScG1	<i>Pinus heldreichii</i>	27.09.2006.	Građen, Kuči
38	<i>Suillus mediteraneus</i> (Jack&Bloom)Red.	10	<i>Pinus halepensis</i>	5.07.2009.	Crvena Glavica (Petrovac)
39	<i>Suillus</i> sp.	15	<i>Pinus peuce</i>	09. 2011.	Hrid
RUSSULALES					
Russulaceae					
40	<i>Lactarius deliciosus</i> (L.) Gray	4 LMK1-IX-09	<i>Pinus heldreichii</i>	19.09.2009.	Korita, Kuči
41	<i>Lactarius sanguifluus</i> (Paulet) Fr.	37 LMH2-X-10	<i>Pinus heldreichii</i>	10. 2010	Hum, Kuči
42	<i>Russula sanguinaria</i> (Schumach.) Rauschert	5 RSK-IX-09	<i>Pinus heldreichii</i>	19.09.2009	Korita, Kuči
43	<i>Russula solaris</i> Ferd. & Winge	RS	<i>Fagus moesiaca</i>	07. 2006.	Biogradska gora
TELEPHORALES					
Bankeraceae					
44	<i>Hydnellum</i> sp.	HYL	<i>Fagus moesiaca</i>	29.09. 2006	Lovćen

izolat- oznaka izolata na način kako su obeleženi uzorci prilikom molekularnih istraživanja

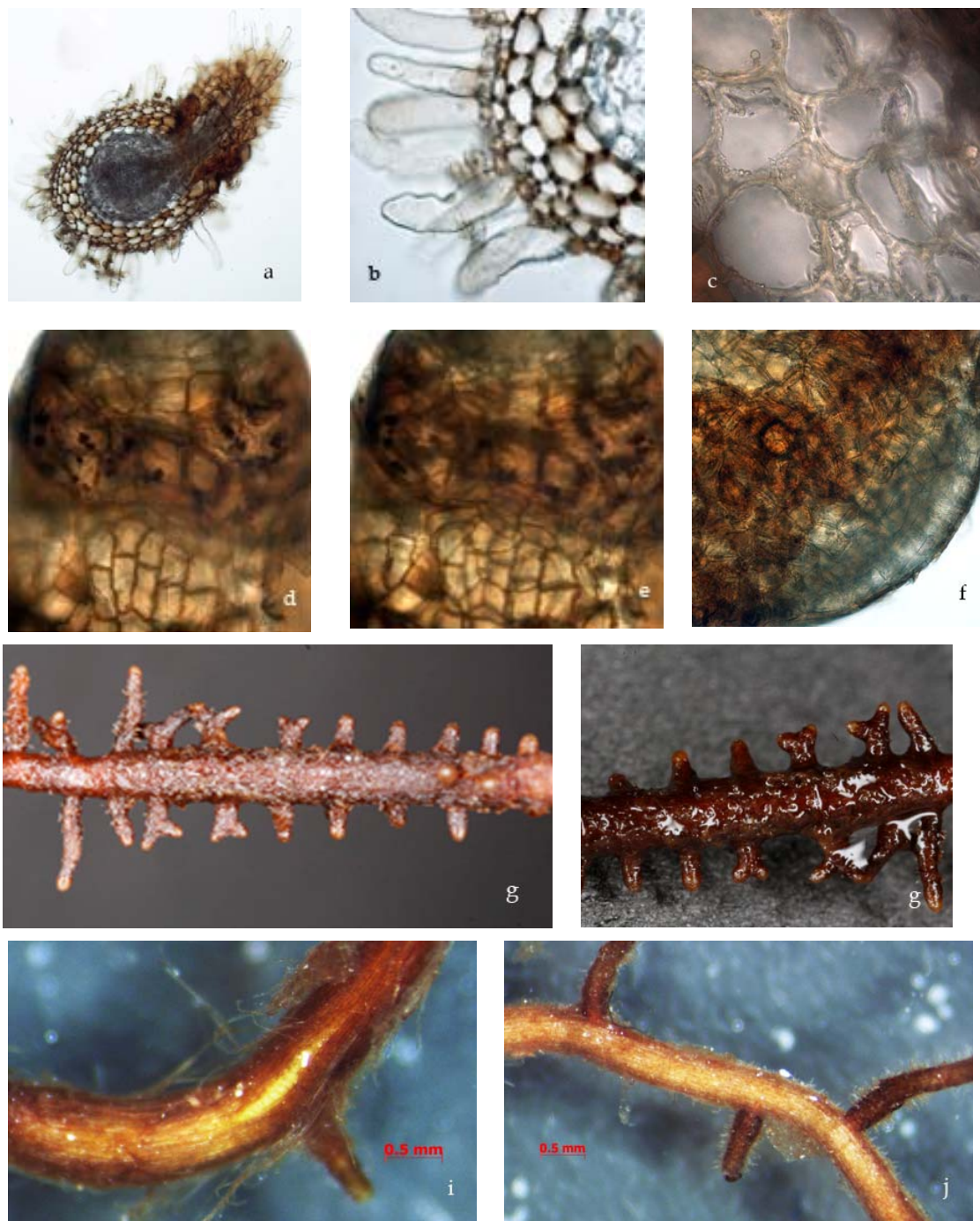
Kulture pojedinih gljiva korišćenih ovde u ogledima inokulacije su u kasnijem radu izgubljene (*Amanita vaginata*, *Leccinom*, *Hydnum*, *Inocybe*, kao i *Tricholoma stans*) i njihov identitet nije proveren molekularnim metodama istraživanja. Molekularnim istraživanjima (sekvenciranjem ITS regiona) potvrđen je, kasnije, identitet 22 kulture ektomikoriznih gljiva.

2.3.2. Sinteza mikorize

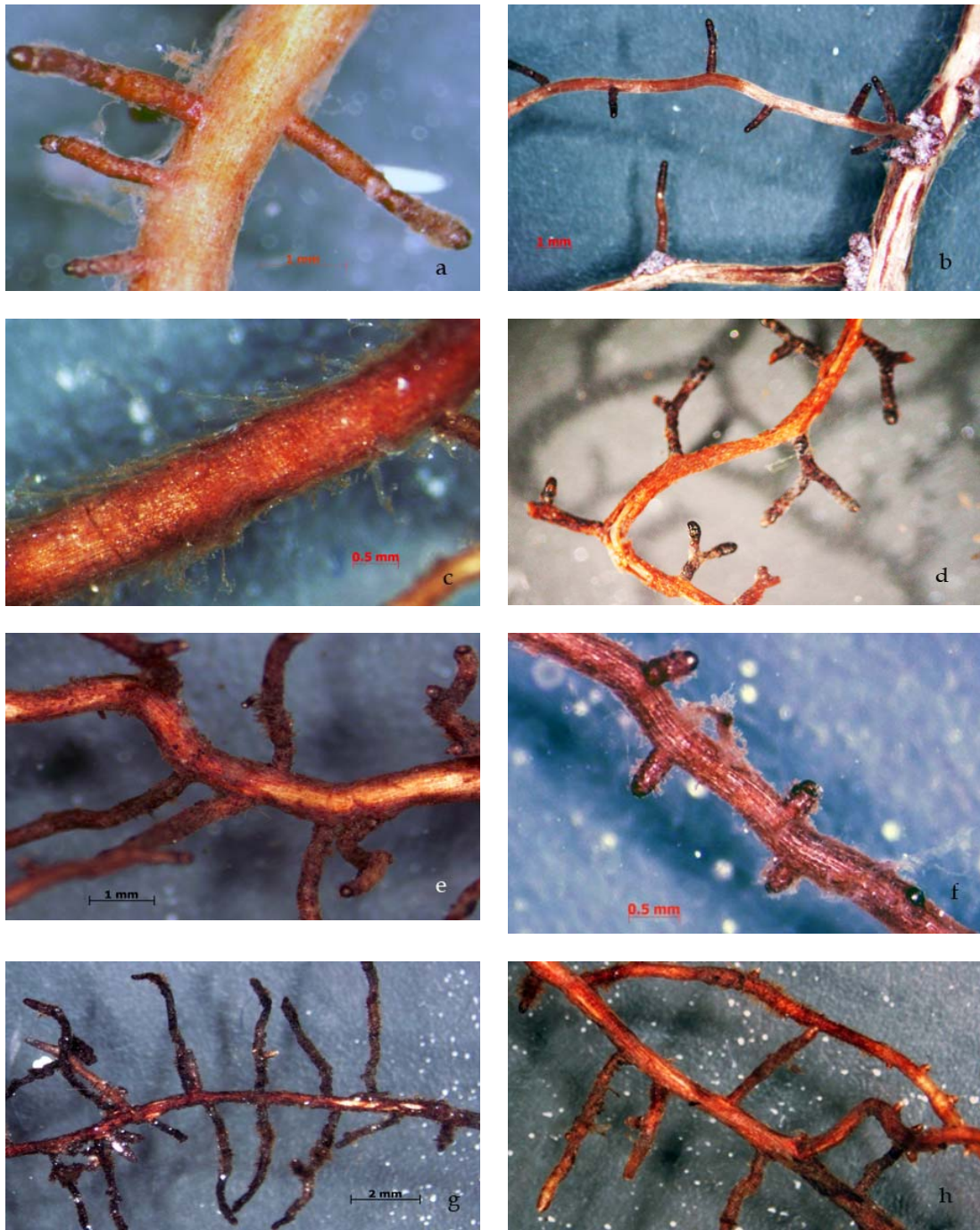
Ukupno 19 gljiva je testirano u ogledima sinteze mikorize sa munikom *in vitro*. Pokazalo se da je 18 gljiva formiralo mikorizu. Rezultati inokulacije, kao i generalne morfološke karakteristike formiranih mikoriza prikazani su u tabeli 5.

Tabela 5. Generalne morfološke karakteristike ektomikoriza formiranih sa munikom

br	vrsta/izolat	oznaka izolata	boja omotača	Micelijalni porast	Rizomorfe/trake micelije	Hartigova mreža
1	<i>Amanita sp.</i>	AG	smeđa	+	+	++
2	<i>Amanita crocea</i> (Quél.)Singer	26 (AC)	smeđe rdasta	-	-	++
3	<i>Amanita muscari</i> (L.)Lam.	24 (AMD-X-09)	belo smeđa	+	-	+
4	<i>Inocybe sp.</i>	IG	smeđa	+	-	++
5	<i>Hebeloma sinapizans</i> (Fr.)Sacc.	36 (HsM-IX-06)	crna	+	-	++
6	<i>Tricholoma batchii</i> Gulden	12 (TB)	žuto smeđa	+	+	++
7	<i>Tricholoma imbricatum</i> (Fr.)Kumm.	3 (TIK)	smeđe rdasta	+	+	++
8	<i>Tricholoma stans</i> (Fr). Sacc.	21(TSM 07)	smeđe rdasta	-	-	++
9	<i>Boletus luridus</i> var. <i>luridus</i> Schaeff.	27 (BL)	crna	+	+	++
10	<i>Leccinum scabrum</i> (Bull.)Gray	LSL	svetlo smeđa	+	-	++
11	<i>Chalciporus amarellus</i> (Quél) Bat.	8 (Ch.A)	žuto smeđa	-	-	-
12	<i>Melanogaster odoratisimus</i>	MO	bela	+++	+	++
13	<i>Pisolithus arhizus</i> (Scop.)Rauschert	1 (PT)	rdasto smeđa	++	+++	++
14	<i>Scleroderma sp.</i>	6 (ST 08)	belo-smeđa	++	+++	+++
15	<i>Suillus colinitus</i> (Fr.)Kuntze	9 (SC)	smeđe narandžast	+++	++	+
16	<i>Suillus granulatus</i> (L.)Rousell	2 (SGG)	smeđe narandžast	+++	++	+
17	<i>Suillus granulatus</i> (L.)Rousell	SGK	smeđe narandžast	+++	++	+
18	<i>Russula solaris</i> Ferd. & Winge	RS	crna	-	-	+
19	<i>Hydnellum sp.</i>	HYL	svetlo smeđa	+	+	-



Slika 4. Ektomikoriza (aseptična sinteza, posle 3 meseca) *P. heldreichii*-*P. arhizus*: a, b – poprečni presek korena, Hartigova mreža i slabo razvijen omotač (a-10x uvećanje, b-40x); i, j- spoljašnji izgled. *P. heldreichii*-*T. stans*: c-Hartigova mreža na poprečnom preseku (100 x); struktura ektomikoriznog omotača: d-prizmatična u gornjem sloju omotača (40x); f- angularna u donjem sloju omotača; g, h- spoljašnji izgled.



Slika 5. Ektomikoriza (aseptična sinteza, posle 3 meseca): a, f -*P. heldreichii*-*Scleroderma* sp; b -*P. heldreichii*-*S. granulatus*; c -*P. heldreichii*-*P. arhizus*. Ektomikorize dobijene sintezom u ne sterilnim uslovima: d- *P. heldreichii*-*P. arhizus*; e-*P. heldreichii*-*Rusula solaris*; g -*P. heldreichii*-*Suillus collinitus*; h- *P. heldreichii*-*T. imbricatum*

2.4. Diskusija

U periodu 2005-2010 sakupljen je veliki broj plodonosnih tela ektomikoriznih gljiva. Međutim, ostvaren je relativno mali broj izolacija. U početku je dolazilo do velikih zagađenja kultura. Zabeleženo je da se posebno teško izoluju gljive iz rodva *Russula*, *Lactarius*, *Laccaria*, *Inocybe*, dok npr. *Cantharellus*, uprkos brojnim pokušajima nije uopšte izolovan. Po početku primene antibiotika i fungicida procenat uspešnih inokulacija je porastao. Vrste iz roda *Boletus* su takođe teško izolovane, a kasnije ih je bilo veoma teško održati u kulturi. Zbog toga je nekoliko *Boletus* kultura izgubljeno. Izgubljeni su u toku gajenja i izolati *Leccinum scabrum*, *Inocybe* sp., *Hydnum* sp, *Tricholoma stans* i dr.

Ove probleme prepoznali su i dosadašnji istraživači, koji kao najčešće probleme koji se javljaju prilikom sinteze, kao i drugih ogleda, sa gljivama u kulturi navode kontaminaciju kultura gljiva, greške u identifikaciji kultura gljiva (prilikom izolacija), kao i nemogućnosti da se većina ektomikoriznih gljiva uzgaja u kulturi, na hranljivim podlogama (NYGREN, 2008; TEDERSOO *et al.*, 2010.)

U kasnijem radu, pokušali smo da optimizujemo kultivaciju jednog broja gljiva, gajenjem na hranljivim podlogama sa dodatkom različitih oblika azota (N), na različitim pH i na različitim temperaturama (poglavlje 5).

Pozitivni rezultati sinteze mikorize pod veštačkim uslovima potvrđuju sposobnost izolata gljiva da formiraju mikorizu sa klijavcima i sadnicama munike. Eksperimentalna sinteza mikorize je od 1920-ih godina (MELIN, 1921; 1923, *cit.* TEDERSOO *et al.*, 2010) do nedavne 2000. (PERA i ALVAREZ, 1995; TORES i HONRUBIA, 1995; RINCON *et al.*, 1999), potvrdila postojanje velikog broja mikoriznih gljiva, kao i simbiotskih partnerstava između biljke domaćina i određenih vrsta gljiva. Formiranje ektomikorize u uslovima *in vitro* predstavlja jasan dokaz da ektomikorizni odnos može da postoji između gljive i biljke (PERA i ALVAREZ, 1995; TEDERSOO *et al.*, 2010). Razvojem molekularnih metoda istraživanja, omogućeno je da ektomikorizni simbionti budu „prepoznati“ na osnovu poznavanja DNK (TEDERSOO *et al.*, 2010).

Na korenu inokulisanih klijavaca/sadnica *P. heldreichii* zabeleženo je prisustvo mikorize. Koren munike pokazuje znake mikorizacije u smislu karakterističnog grananja korenskih završetaka, zadebljavanja i/ili uvrtnja/spiralizacije neraragrananatih (prostih) vrhova korena, dok je spoljni omotač bio je u najvećem broju slučajeva slabo razvijen. Potvrda ostvarene mikorize obezbeđena je na osnovu posmatranja Hartigove mreže na poprečnim preseccima korena. Formirane mikorizne strukture, međutim, nisu bile dovoljno razvijene da bi njihovi morfo anatomski opisi mogli da imaju taksonomsko dijagnostički značaj.

Postoji veliki broj načina grananja završetaka bočnih korenova koji su posledica simbioze sa različitim vrstama gljiva. Poznavanje strukture omotača i karakteristika ekstraradikalne micelije su neophodni za determinaciju vrste mikosimbionta. Različita terminologija se koristi za opisivanje grananja, slojevite strukture omotača i ekstraradikalne micelije, što je uključeno u ključeve koji se koriste za identifikaciju gljiva na korenu domaćina (AGERER 1987-2004). Međutim, ovi elementi mogu se opisivati prilikom morfološke karakterizacije mikoriza prikupljenih u šumama (AGERER 2001, PETERSON *et al.*, 2004), kada su mikorize dobro razvijene. Istraživanja i ključevi INGLEBY *et al.* (1990) pokazuju nedovoljno izdiferencirane morfo-anatomske elemente mikorize (omotača i ekstraradikalne micelije) na korenu sadnica starih nekoliko meseci, nakon sinteze u laboratorijskim uslovima. Na to ukazuju i istraživanja RIFFLE (1973), PERA i ALVAREZ (1995), RINCON *et al.* (1999), koja formirane mikorizne strukture opisuju na osnovu generalnih morfoloških karakteristika.

Koren *P. heldreichii* inokulisan različitim izolatima pokazuje malo dihotomog grananja i slab razvoj ektomikorize. Osim toga, prisustvo nekih mikoriza zabeleženo je tek nakon dugog perioda rasta biljke i gljive u zajednici, u poređenju sa uobičajenih 1-4 meseca, što je vreme koje se navodi u literaturi (RINCON *et al.*, 1999) kao dovoljno za sintezu. Nedovoljno razvijen ektomikorizni omotač i nepotpuno formiranje malog broja mikoriznih korenova prema PERA i ALVAREZ (1995) i DAMES *et al.*(1999) sugeriše da su, u uslovima koji su vladali u eksperimentu, izolati gljiva bili manje snažni u kolonizaciji korena. Iako autori neuspeh ili slabu mikorizaciju korena domaćina objašnjavaju neodgovarajućim uslovima za uspostavljanje mikorize i slabostima korišćenih izolata gljiva, u ovom slučaju

verovatno se radi o nedovoljno dobrim uslovima za formiranje i rast korena domaćina-munike, koja je izrazita heliofita i spororastuća vrsta drveta. Nakon 4 meseca gajenja u laboratorijskim uslovima na policama sa neonskim osvetljenjem klijavci munike su rasli, ali je njihov korenov sistem bio slabo razvijen, i na njemu nije bilo zapaženo formiranje mikorize. Uslovi ovakvog osvetljenja, kao i dnevnog osvetljenja u laboratoriji, pod kojima je eksperiment prvobitno bio postavljen, nisu odgovarali municima. Poznato je da količina svetlosti direktno utiče na razvoj korena biljke, kao i da za nesmetani razvoj mikorizne simbioze neophodan uslov predstavlja nesmetan i pravilan rast i razvoj korena (SMITH i READ, 1997). Bolji razvoj korenovog sistema i formiranje mikoriznih korenova munike zapaženi su tek posle jednog perioda gajenja biljaka na otvorenom - na dnevnom svetlu. S druge strane, biljke gajene u klima komori sa adekvatnim osvetljenjem imale su posle 3 meseca (a i ranije) dobro razvijen korenov sistem, sa formiranim mikorizama. Isto tako, neki od izolata koji se u zajednici sa munikom formirali slabu mikorizu, kada su kasnije testirani sa crnim borom pokazali su veoma dobru sposobnost kolonizacije – mikorizacije korena, što svedoči o tome da je kvalitet inokuluma bio dobar.

Sinteza mikorize u čistoj kulturi dešava se pod veštačkim uslovima, koji najčešće ne odgovaraju uslovima kakvi preovlađuju u prirodi, a poteškoće u sintetisanju pojedinih mikoriza su beležili i drugi istraživači. Istraživanja PERA i ALVAREZ (1995) navode neuspeh u formiranju mikorize između dokazano ektomikoriznih simbionata, na osnovu čega se pretpostavlja da uslovi koji su vladali u ogledu nisu mogli da omoguće ekspresiju-ispoljavanje simbiotskih podudarnosti.

Neke od zabeleženih mikoriza prikazane su na slikama 4 i 5.

Morfoanatomska proučavanja mikorize nastavljena su kasnije na korenovima crnog bora mikorizovanih inokulumom spora i micelije više vrsta gljiva (ogled opisan u poglavlju 6), gde je mikoriza bila dobro formirana, kao i na uzorcima korena munike prikupljenih u prirodnim populacijama (poglavlje 5)⁸.

⁸ raspoznavanje određenih vrsta na osnovu morfo-anatomskih karakteristika odnosilo se na: načina grananja, razvijenost, teksturu i boju omotača, kao i karakteristika spoljne micelije i rizomorfi, jer se ispostavilo se da je sa postojećom opremom uprkos dugotrajnim procedurama pripreme i bojenja korena vrlo teško (gotovo ne moguće) opisati mikroskopske karakteristike prvenstveno omotača, koje su neophodne za determinaciju vrsta korišćenjem postojećih ključeva AGERER (1987-2004). Primenjeni »nivo« detaljnosti morfološkog opisivanja se, međutim, na osnovu literature može smatrati zadovoljavajućim (MENKIS *et al.*, 2005).

2.5. Zaključak

Tokom ovih istraživanja formirana je mikoteka koja je sadržala 44 kulture/izolata ektomikoriznih gljiva sa prostora Crne Gore.

Upotrebom različitih metoda inokulacije, u laboratorijskim uslovima, ostvarena je sinteza ektomikorize između munike i 18 vrsta gljiva.

In vitro mikorizna simbioza između ispitivanih vrsta gljiva i munike ranije nije bila potvrđena. Ona se međutim može smatrati očekivanom, jer je poznato da svi izolati korišćeni u ovom ogledu predstavljaju ektomikorizne vrste.

Koren *P. heldreichii* inokulisan različitim izolatima i na različite načine pokazuje nizak stepen razvoja ektomikorize.

3. Identifikacija kultura ektomikoriznih vrsta gljiva molekularnim metodama

3.1. Uvod

Do sada su se različite vrste gljiva razlikovale većinom na osnovu fenotipskih karakteristika. Razvojem molekularnih metoda istraživanja otvorene su nove mogućnosti istraživanja i aktuelizovana brojna pitanja na polju sistematike, filogenije i ekologije gljiva. Identifikacije gljiva na osnovu poznavanja DNK zasnivaju se na PCR proceduri (lančana reakcija polimeraze) tokom koje se vrši amplifikacija varijabilnih region rDNK gljive.

ITS region rDNK odlikuje se visokim stepenom polimorfizma između vrsta, ali se smatra da je visoko konzervativan unutar vrste, te zbog toga predstavlja vredan genetički marker za identifikaciju vrsta ektomikoriznih gljiva (BRUNS, 1991; BUSCOT *et al.*, 2000). ITS region rDNK "obuhvata": 3' kraj 18S gena, ITS1 region, 5,8 s gen , ITS2 region i 5' kraj 28s gena.

Za amplifikaciju ITS regiona u toku PCR reakcije upotrebljavaju se univerzalni prajmeri ITS1 i ITS4, ili prajmeri specifični za bazidiomikote ITS1-F i ITS4-b (GARDES i BRUNS, 1993).

ITS region kod ektomikoriznih gljiva ima značajnu ulogu u identifikaciji srodnih vrsta ili grupa srodnih taksona unutar vrste. Analiza ITS sekvenci kod gljiva generalno pokazuje visok nivo varijacija između vrsta, a nisku varijaciju unutar vrsta (GARDES i BRUNS, 1993; BUSCOT *et al.*, 2000).

Dosadašnja istraživanja pokazala su, takođe, da se izdvajanje vrsta na genetičkom nivou ne podudara uvek sa izdvajanjem vrsta zasnovanom na fenotipskim karakteristikama. Do ovih problema, prema BUSCOT *et al.*, (2000) dolazi iz sledećih razloga: 1) kod nekih grupa gljiva, razlike između vrsta ograničene su na mali broj (fenotipskih) karakteristika, na kojima se zasniva determinacija; 2) unutarvrstna fenotipska plastičnost često nije dovoljno poznata; 3) konvergentna evolucija izgleda da je prilično česta; 4) kriptične vrste (skriveno vrste) koje su više puta izolovane, a pri tom morfološki nisu opisane, izgleda da se javljaju u velikom broju rodova gljiva.

Na osnovu poznavanja ITS regiona, npr., detaljno su istraženi rodovi *Pisolithus*, *Sarcodon* i *Rhizopogon* (BUSCOT, 2000), pri čemu se pokazalo da je potrebno uraditi re-klasifikaciju fenotipskih vrsta u okviru ovih rodova. S druge strane, pokazalo se da na osnovu ITS regiona, kod roda *Hebeloma* ne mogu razdvojiti očigledno različite fenotipske vrste. Neki autori sada već sugerišu istraživanja na drugim regionima rDNK, kako bi se prevazišli ovi problemi. Takođe su kreirani prajmeri specifični za *Boletus-e*.

Identifikacija vrsta na osnovu ITS regiona je još uvek ograničena jer je još uvek relativno mali broj ektomikoriznih vrsta sekvenciran. Međutim podaci o ITS sekvencama ektomikoriznih gljiva se akumuliraju veoma brzo. Tokom 2000. godine raspolagalo sa sa manje od 100 sekvenci ektomikoriznih vrsta (BUSCOT *et al.*, 2000). Prema podacima iz 2005. samo u UNITE⁹ bazi podataka bilo je deponovano 758 ITS sekvenci, poreklom od 455 ektomikoriznih vrsta iz 67 rodova (KOLJALG *et al.*, 2005), dok se danas (10.06.2012.) u UNITE bazi nalazi 3888 ITS sekvenci, poreklom od 1511 vrste gljiva, iz 256 Familija. Ukupan broj sekvenci gljiva u UNITE bazi i Bazi podataka nukleotidnih sekvenci (UNITE +INSD) iznosi 258 727.

Za proučavanje varjabilnosti ITS regiona može se upotrebiri RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) metod. Smatra se da je ovaj metod lak za upotrebu i ekonomski isplativ. Tehnika za detekciju polimorfizma sastoji se u razlaganju amplifikovanog produkta restrikcionim enzimima, a rezultati razlaganja očitavaju se na gel-elektroforezi. Ovaj metod zahteva minimalnu opremu i relativno malo molekularne ekspertize, a smatra se da se za kratko vreme mogu dobiti restrikcioni obrasci (šabloni) specifični za pojedine vrste (BUSCOT *et al.*, 2000).

⁹ UNITE je baza podataka rDNK sekvenci ITS regiona prvobitno fokusirana na ektomikorizne asko- i bazidiomikote. Visokokvalitetne sekvence su dobijane (generisane) iz plodonosnih tela koja su sakupili i identifikovali stručnjaci, i koja su deponovana u javnim herbarijumima. Kad god je to bilo moguće, za sekvenciranje su korišćene *type specimens*. Za sekvencirane vrste dat je pun opis i ilustracije, što je povezano sa sekvencama. Na ovaj način obezbeđena je najveća moguća "pouzdanost" dobijenih sekvenci koja je od značaja za njihovu upotrebu u daljim istraživanjima.

Danas UNITE sadrži ITS sekvence i drugih, a ne samo ektomikoriznih gljiva, kao i gene i genetičke markere. Osim toga UNITE takođe sadrži i sve ITS sekvence gljiva koje su deponovane u Međunarodnoj Bazi podataka nukleotidnih sekvenci (International Nucleotide Sequence Databases -INSD). Smatra se da se sekvence iz obe baze mogu koristiti u svim vrstama daljih analiza.

Međutim, proučavanja varjabilnosti ITS regiona unutar vrste i između vrsta do sada su obavljena za mali broj vrsta gljiva, i smatra se da postoji mali broj podataka o varjabilnosti ITS regiona kod mikoriznih gljiva. Još uvek nije poznato u kolikoj meri dolazi do varijacija u ITS regionu ektomikoriznih gljiva posmatrano na nivou vrste u celini, ili unutar različitih regiona rasprostranjenja iste vrste, niti kakve su, uopšteno, mogućnosti identifikacije vrste upotrebom RFLP metoda (KAREN *et al.*, 1997).

Identifikaciju vrsta upotrebom ovog metoda ponekad nije moguća usled prisustva unutar-vrsnih i unutar-individualnih varijacija. Na primer, dve ITS-RFLP varijante opisane su kod dikarionih izolata *Hebeloma mesopheum* (AANEN, 1999, cit. BUSCOT *et al.*, 2000). Ova dva tipa locirana su na homologim hromozomima na različitimj nukleusima dikariona.

Princip upotrebe RFLP metode za proučavanje populacija gljiva prisutnih u korenovima domaćina zasniva se na tome da se DNK dobijena iz plodonosnih tela (ili micelijalnih kultura), prikupljenih na lokalitetu koji se istražuje, koristi u kombinaciji sa nekoliko (2 ili 3) restrikciona enzima, pri čemu se detektuju različite restrikcije. One se kasnije koriste da bi se utvrdile varijacije u svim uzorcima. Podaci se kombinuju, i tako se formirju grupe sa identičnim RFLP modelima za sve enzime (ITS-RFLP tipovi). Zbog visokog stepena varijacije u ITS sekvencama između vrsta, izgleda da mali broj enzima može biti dovoljan da razdvoji udaljene rodove i, generalno, vrste u okviru jednog roda (BUSCOT *et al.*, 2000). Nekoliko autora takođe beleži da gljive sa identičnim RFLP šemama obično imaju identične ili srodne DNK sekvence.

Ciljevi molekularnih istraživanja sprovedenih u okviru ove doktorske disertacije su:

1. da se izvrši genetička karakterizaciju pojedinih vrsta ektomikoriznih gljiva poreklom iz Crne Gore, tj. da se ektomikorizne gljive iz kultura korišćenih za sintezu mikorize kao i za mikorizaciju sadnica identifikuju na molekularnom nivou, i potvrdi njihov identitet utvrđen opisivanjem fenotipskih karakteristika;
2. da se upotrebom RFLP metode ispita stepen varijacija između vrsta u ITS regionu ektomikoriznih gljiva koje su izolovane u čiste kulture, i korišćene u drugim istraživanjima (za mikorizaciju sadnica i ispitivanje nekih fizioloških karakteristika);

3. da se formira baza dobijenih šablona razlaganja ITS regiona za ektomikorizne gljive, za čiju smo pojavu i distribuciju zainteresovani, a prvenstveno za one koje su korišćene za mikorizaciju sadnica.

Dobijeni RFLP šabloni, moći će da posluže za praćenje populacija gljiva na korenovima prethodno mikorizovanih sadnica, u rasadniku i nakon njihovog iznošenja na teren. Pretpostavka je, takođe, da će oni moći da se koriste i za identifikovanje vrsta na korenovima domaćina iz prirodnih populacija, radi određivanja populacione strukture mikoriznih zajednica.

3.2. Materijal i metode

3.2.1. Ispitivani materijal-gljive

U periodu 2005-2010, na teritoriji Crne Gore sakupljana su plodonosna tela (pečurke) ektomikoriznih gljiva iz kojih je vršena izolacija prema metodu opisanom u poglavlju br. 2. U tabeli 6. predstavljene su čiste kulture ektomikoriznih gljiva, iz kojih je urađena izolacija DNK i dalja molekularna istraživanja.

Tabela 6. Kulture ektomikoriznih gljiva, dobijene iz plodonosnih tela, korišćene za izolaciju DNK.

	vrsta gljive	izolat	biljka domaćin
AGARICALES			
<i>Amanitaceae</i>			
1*	<i>Amanita caesarea</i> (Scop.)Pers.	7	<i>Castanea sativa</i>
2	<i>Amanita crocea</i> (Quél.)Singer	26	<i>Fagus moesiaca</i>
3*	<i>Amanita muscaria</i> (L.)Lam.	24	<i>Picea abies</i>
4	<i>Amanita pantherina</i> (DC)Krombh.	23	<i>Quercus cerris</i>
5	<i>Amanita vaginata</i> (Bull) Lam.	25	<i>Pinus halepensis</i>
<i>Cortinariaceae</i>			
6*	<i>Cortinarius</i> sp.	14	<i>Pinus heldreichii</i>
<i>Hygrophoraceae</i>			
7*	<i>Hygrophorus eburneus</i> (Bull.)Fr.	19	<i>Fagus moesiaca</i>
8*	<i>Hygrophorus marzuolus</i> (Fr.) Bres.	16	<i>Fagus moesiaca</i>
9*	<i>Hygrophorus hipothejus</i> (Fr.) Fr.	17	<i>Pinus heldreichii</i>
10*	<i>Hygrophorus gliocyclus</i> Fr.	18	<i>Pinus heldreichii</i>
11*	<i>Hygroporus</i> sp.	20	<i>Fagus moesiaca</i>
<i>Strophariaceae</i>			
12*	<i>Hebeloma sinapizans</i> (Fr.)Sacc.	36	<i>Pinus heldreichii</i>
<i>Hydnangiaceae</i>			
13*	<i>Laccaria ametystina</i> Cooke	34	<i>Quercus cerris</i>
14*	<i>Laccaria laccata</i> (Scop.)Cooke	35	<i>Fagus moesiaca</i>
<i>Tricholomataceae</i>			
15*	<i>Tricholoma albobruneum</i>	22	<i>Pinus halepensis</i>

	vrsta gljive	izolat	biljka domaćin
	(Pers) Kumm.		
16*	<i>Tricholoma batchii</i> Gulden	12	<i>Pinus heldreichii</i>
17*	<i>Tricholoma imbricatum</i> (Fr.)Kumm.	3	<i>Pinus heldreichii</i>
18*	<i>Tricholoma imbricatum</i> (Fr.)Kumm	39	<i>Pinus heldreichii</i>
19	<i>Tricholoma stans</i> (Fr). Sacc.	21	<i>Pinus heldreichii</i>
20*	<i>Tricholoma sulphureum</i> Kumm.	13	<i>Castanea sativa</i>
BOLETALES			
Boletaceae			
21*	<i>Boletus luridus</i> var. <i>luridus</i> Schaeff	27	<i>Quercus cerris</i>
22*	<i>Boletus radicans</i> Pers.	29	<i>Quercus cerris</i>
23*	<i>Boletus legaliae</i> Pilat	28	<i>Quercus cerris</i>
24*	<i>Boletus luridus</i> var. <i>luridus</i> Schaeff. (1)	30	<i>Quercus cerris</i>
25*	<i>Chalciporus ammarelus</i> (Quel) Bataile	8	<i>Pinus heldreichii</i>
26	<i>Xerocomus</i> sp. 1	31	<i>Simphoricarpus</i> sp.
27	<i>Xerocomus</i> sp. 2	32	<i>Fagus moesiaca</i> + <i>Pinus heldreichii</i>
28	<i>Xerocomus</i> sp. 3	33	<i>Quercus cerris</i>
29*	<i>Xerocomus communis</i> (Bull.)Bon	11	<i>Quercus ilex</i>
Sclerodermataceae			
30*	<i>Pisolithus arhizus</i> (Scop.)Rauschert	1	<i>Cedrus atlantica</i>
31*	<i>Scleroderma</i> sp.	6	<i>Eucaliptus, Prunus</i>
Suillaceae			
32*	<i>Suillus granulatus</i> (L.)Rousell	2	<i>Pinus heldreichii</i>
33*	<i>Suillus granulatus</i> (L.)Rousell	38	<i>Pinus heldreichii</i>
34*	<i>Suillus collinitus</i> (Fr)Kuntze	9	<i>Pinus heldreichii</i>
35*	<i>Suillus mediteraneus</i> (Jack & Bloom)Red.	10	<i>Pinus halepensis</i>
36	<i>Suillus</i> sp.	15	<i>Pinus peuce</i>
RUSSULALES			
Russulaceae			
37*	<i>Lactarius deliciosus</i> (L.) Gray	4	<i>Pinus heldreichii</i>
38*	<i>Lactarius sanguifluus</i> (Paulet) Fr.	37	<i>Pinus heldreichii</i>
39*	<i>Russula sanguinaria</i> (Schumach.) Rauschert	5	<i>Pinus heldreichii</i>

*izolati poslani na sekvenciranje

3.2.2. Metode rada pri molekularnim istraživanjima

3.2.2.1. Izolacija DNK

Za izolaciju DNK, micelija gljiva je gajena na tečnoj MMN podlozi. Tečna MMN podloga pripravljena je prema recepturi iopisanoj u poglavlju 2, bez dodatka agara. pH vrednost podloge dovođena je na vrednost 5.8 dodavanjem 1M HCl (pre autoklaviranja). Tečna podloga je sterilisana u erlenmajerima zapremine 0.5-1 l, a zatim je oko 40 ml podloge razlivano u plastične čaše sa poklopcem zapremine 75 ml. Podloga je zasejavana diskom micelije prečnike 9 mm, iz kulture i Petri posude, i inkubirana na 22°C oko 2 meseca (RINCON *et al.*, 1999).

Fragmenti razvijene micelije su ispirani sterilnom destilovanom vodom i ostavljeni tokom noći (oko 24 h) u 96% etanolu. Po vađenju iz etanola i isparavanju preostale količine etanola iz uzorka micelije, ona je zamrzavana u označenim ependorf tubama od 1.5 ml. Iz pojedinih micelija, DNK je izolovana direktno, bez prethodnog smrzavanja, posle ispiranja sterilnom destilovanom vodom (uzorci 15, 16, 17, 18, 35, 37, 38, 39).

Za izolaciju DNK, korišćen je DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen Ltd., SAD), prema proceduri preporučenoj od proizvođača. Početne količine micelije, odnosno materijala iz kojega se vrši izolacija DNK, prema preporukama proizvođača treba da iznose 100 mg tkiva u svežem (vlažnom) stanju, odnosno max 20 mg tkiva u suvom stanju. Za izolaciju je korišćeno oko 40 mg prethodno zaleđene micelije. Najmanja količina micelije korišćene za izolaciju u prethodno zaleđenom stanju iznosila je 27 mg za izolat 28 (*Boletus legalie*).

Kada je za izolaciju korišćena micelija iz kulture koja nije prethodno zamrzavana (uzorci 15, 16, 17, 18, 35, 37, 38, 39), korišćeno je 120-150 mg micelije.

Sitnjenje tkiva gljive koje se vrši u prvom koraku izolacije obavljeno je direktno u AP1 puferu, upotrebom mikrotučka. Radi obezbeđivanja boljeg razlaganja ćelija, vreme inkubacije (3. korak protokola) produženo sa 10 na 20 min, na 65°C.

Prisustvo i kvalitet izolovane DNK u rastvorima dobijenim nakon izolacije-ekstrakcije DNK, proveren je elektroforezom na 1% agaroznom TBE gelu.

Količina i čistoća DNK u pojedinim uzorcima određena je upotrebom NanoVue (GE Healthcare, EU), što je poslužilo kao dodatna kontrola, da je izolacija DNK uspeła.

3.2.2.2. Lančano umnožavanje DNK u prisustvu polimeraza

ITS region rDNK je amlifikovan pomoću prajmera specifičnih za basidiomicete ITS-1F i ITS4-B (GARDES i BRUNS, 1993).

Korišćeni su oligonukleotidni prajmeri proizvođača Eurofins MWG Operon (EU).

Sekvence (5'->3') oligo nukleotidnih prajmera korišćenih za PCR reakciju su:

ITS1-F CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA (22),

ITS4-B CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG (23)

PCR reakcije izvođene su u tubama od 0.2 ml . Ukupna zapremina reakcija u tubi je iznosila 50 µl za eksperimentalne reakcije, a 20 µl za kontrolne i probne reakcije.

Za propremu PCR reakcije korišćen je Kapa Taq Ready Mix (Kapa, SAD), prema uputstvu proizvođača. Svaka reakcija od 50 µl sadržala je :

Kapa Taq Ready Mix	25 µl
Prajmer ITS1-F (10pmol/µL)	2 µl
Prajmer ITS4-B 10pmol/µL	2 µl
Uzorak izolovane DNK	0,1 ng
Sterilna ultračista voda	18,5 µl

Umnožavanje DNK u PCR mašini (termosajkleru) izvedena je prema protokolu NIETO i CARBONE (2009): inicijalna denaturacija (razgradnja) na 94°C u trajanju od 3 min, a zatim 40 ciklusa sa razgradnjom na 94° C u trajanju od 0.5 min, vezivanjem prajmera na 55° C u trajanju od 0.5 min i izduživanja na 72° C u trajanju od 1 min, što je praćeno konačnim izduživanjem na 72° C u trajanju od 10 min.

Svaki set PCR reakcija sadržao je negativnu kontrolu. Negativna kontrola je trebalo da potvrdi da prilikom izrade mastermiksa nije došlo do kontaminacije, tj. da je u uzorcima prisutna DNK proučavanih izolata (KEČA, 2005).

Nakon umnožavanja izvršena je kontrola dobijenog prinosa elektroforezom na 1,5 % TBE agaroznom gelu. Za elektroforezu je korišćeno 2 -2,5 µl PCR proizvoda koji je bojen sa 1 µl Gel Pilot Loading Dye, 5X (Qiagen Ltd., SAD). Elektroforeza je izvedena u 1 X TBE puferu i agarozni gel je bojen sa Midori green bojom (Nippon Genetics, EU). Kao kontrola korišćen je DNA molekularni marker od 100 bp (DNA ladder 100bp, Nippon

Genetics, EU). Na osnovu ovog markera može se odrediti približan broj baznih parova ispitivanog uzorka i istovremeno količina DNK u PCR proizvodu.

3.2.2.3. Sekvenciranje dobijenog PCR proizvoda

Dobijeni PCR proizvod je prečišćen upotrebom Qiagenovog kompleta za prečišćavanje (QIAquick Purification Kit, Qiagen Ltd., SAD). Kvalitet prečišćenog PCR proizvoda je ponovo kontrolisan na 1.5% agaroznom gelu, pri čemu je utvrđivana količina DNK u uzorku. Potrebno je da u uzorku prečišćenog PCR proizvoda koji se šalje na sekvenciranje bude više od 50 ng/μl DNK. U uzorcima su, poređenjem sa standardom¹⁰ na osnovu vizuelne procene, izmerene vrednosti koje su se kretale u intervalu između 70 i 200 ng/μl.

Prečišćen PCR proizvod je isparen na sobnoj temperature u laminarnoj komori (36-48 časova) i poslat na sekvenciranje u Macrogen Inc. (Seul, Koreja), gde je za sekvencioniranje korišćen automatski sekvencer ABI 3730 XL (Applied Biosystems, SAD). Sekvenciranje je obavljeno u oba smera.

Na sekvenciranje je poslato 33 uzorka prečišćenog PCR proizvoda (ovi uzorci obeleženi su sa * u tabeli 6).

3.2.2.4. RFLP razlaganje PCR proizvoda enzimima i analiza razlike u dužini fragmenata dobijenih razlaganjem

PCR proizvod je radi raspoznavanja i identifikacije vrsta razlagan restrikcionim enzimima: *Alu* I, *Hinf*I, *Mbo*I and *Bsu*R (Hae III), *Eco* RI i *Rsa* I (Fermentas, EU).

Za RFLP analizu odabrano je 6 različitih restrikcionih enzima, koji su, na osnovu podataka dostupnih iz literature, učestalije korišćeni za razlaganje ITS regiona kod ektomikoriznih gljiva (KAREN *et al.*, 1997; GOMES *et al.*, 1999; EL KARKOURI 2002, 2006; HORTON *et al.*, 1998)

¹⁰ DNA lader 100 bp (Nipon Genetics, EU)

Za RFLP analizu korišćen je neznatno modifikovan protokol EL KARKOURI (2002).

Svaka od reakcija razlaganja sadržala je:

- 15 µl amplifikovanog ITS proizvoda
- 1 µl (10 u) enzima
- 2 µl sterilne ultračiste vode.

Pripremljene reakcije su inkubirane na 37 °C u trajanju od 12 časova. Produkti razlaganja (RFLP šeme) su razdvojene elektroforezom na 2% agaroznom gelu. Elektroforeza je izvođena u 1 X TBE puferu, na 70 V. Agarozni gel je bojen sa Midori green (Nippon Genetics, EU). Za određivanje veličine fragmenata dobijenih razlaganjem korišćen je molekularni marker od 100 bp (DNA ladder, Nippon Genetics, EU).

3.2.2.5. Korišćeni softverski paketi

Prilikom obrade podataka dobijenih nakon elektroforeze i sekvenciranja korišćeni su različiti softverski programi i paketi.

Za snimanje gelova dobijenih elektroforezom korišćen je program Quantum ST4 (Vilber Lourmat). On je korišćen za snimanje i analizu gelova bojenih Midori green bojom, pri analizi fragmenata dobijenih RFLP razlaganjem, kao i svim drugim analizama snimljenog materijala.

Program BioEdit verzija 7.0.5.2 (HALL, 1999) korišćen je prilikom obrade sekvenci

Za utvrđivanje identiteta ITS regiona rDNA dobijene sekvence poređene su sa bazama podataka Banke Gena Američkog nacionalnog centra za biotehnoške informacije (BENSON *et al.*, 2005) i UNITE baza podataka ITS rDNK sekvenci za gljive (KOLJALG *et al.*, 2005), upotrebom BLAST oruđa (Basic Local Alignment Search Tool, ALTSCHUL *et al.*, 1990).

Izolat (takson) je određen na nivou vrste, ukoliko podudarnost sa ITS sekvencama u bazama podataka iznosila 98-100%, a na nivou roda ukoliko podudarnost varira između 90 i 97% (MENKIS *et al.*, 2005; NIETO i CARBONE, 2009).

3.3. Rezultati istraživanja

Izolacija jedarne DNK izvršena je iz 39 mićelijalnih kultura pretpostavljeno ektomikoriznih gljiva. Nakon provere elektroforezom, utvrđeno je da je u ovim uzorcima bila prisutna DNK.

Medjutim PCR reakcija prilikom korišćenja prajmera specifičnih za bazidiomicete, ITS1-F i ITS4-B, nije dala rezultate za 7 izolata: *Amanita vaginata* (25), *Tricholoma stans* (21), *Xerochomus* sp.1 (31), *Xerochomus* sp.2 (32), *Xerochomus* sp.3 (33) i *Suilus* sp. (15).

Dalja istraživanja nastavljena su sa 33 izolata ektomikoriznih gljiva.

3.3.1. Analiza dobijenih sekvenci

Rezultati dobijeni sekvenciranjem potvrdili su identitet 2/3 (22 od 33) uzoraka poslatih na analizu. Dobre sekvence su obrađene i poslate u NCBI GenBank.

Dužina dobijenih sekvenci iznosila je 735-840 bp.

U tabeli 7 prikazani su ovi izolati, sa pristupni brojevima sekvenci u Banci Gena (GB), njihovim dužinama i najbliže identifikovanim vrstama na osnovu BLASTA u Banci Gena i UNITE bazi podataka.

Tabela 7. Kulture gljiva čije su sekvence deponovane u NCBI Banku Gena (GenBank-GB), sa pristupnim brojevima sekvenci u Banci Gena i njihovim dužinama, kao i najbliže identifikovanim vrstama na osnovu BLASTA u Banci Gena (GB) i UNITE (U) bazi podataka.

br.	Kultura gljive (izolat)	ITS sekvenca		BLAST analiza NCBI (GB) i Unite (U) baza			
		pristupni broj u GB	DS (bp)	pristupni broj i vrsta		Query %*	I %
5	<i>Russula sanguinaria</i> isolate RSK-IX-09	JQ685712	750	GB	JF908649.1 <i>Russula sanguinea</i>	86	99
				U	UDB011190 <i>Russula sanguinea</i>	721/724	99
24	<i>Amanita muscaria</i> isolate AMD-X-08	JQ685713	733	GB	JF899546.1 <i>Amanita muscaria</i>	99	99
				U	UDB002439 <i>Amanita muscaria</i>	716/727	98
30	<i>Boletus luridus</i> var. <i>luridus</i> isolate BL2-VII-10	JQ685714	734	GB	AY278766.1 <i>Boletus luridus</i>	93	99
				U	UDB000077 <i>Boletus luridus</i>	681/692	98
27	<i>Boletus luridus</i> var. <i>luridus</i> isolate BL1-VII-09	JQ685715	750	GB	AY278766.1 <i>Boletus luridus</i>	91	99
				U	UDB000077 <i>Boletus luridus</i>	664/675	98

br.	Kultura gljive (izolat)	ITS sekvenca		BLAST analiza NCBI (GB) i Unite (U) baza			
		pristupni broj u GB	DS (bp)	pristupni broj i vrsta		Query %*	I %
29	<i>Boletus radicans</i> isolate Brad1-X-10	JQ685716	822	GB	EF530923.1 <i>Boletus coniferarum</i>	97	90
				U	UDB003224 <i>Boletus radicans</i>	690/711	97
28	<i>Boletus satanas</i> isolate Bsat-X-10	JQ685717	804	GB	DQ534567.1 <i>Boletus satanas</i> s	95	98
				U	UDB000418 <i>Boletus satanas</i>	804/804	100
8	<i>Chalciporus amarellus</i> isolate ChA1-X-09	JQ685718	841	GB	EU685111.1 <i>Chalciporus rubinellus</i>	89	88
					AF335457.1 <i>Chalciporus piperatus</i>	97	83
				U	UDB000423 <i>Chalciporus amarellus</i>	761/816	93
7, 13	<i>Hypholoma fasciculare</i> isolate HyFC1-X-08	JQ685719	817	GB	FJ430716.1 <i>Hypholoma fasciculare</i>	96	99
				U	UDB011502 <i>Hypholoma fasciculare</i>	775/779	97
36	<i>Hebeloma sinapizans</i> isolate HsM-IX-06	JQ685720	754	GB	FJ845404.1 <i>Hebeloma mesophaeum</i>	99	95
					EF218766.1 Uncultured ectomycorrhiza (<i>Hebeloma</i>)	99	95
				U	UDB011834 <i>Hebeloma radicosum</i>	715/754	94
20	<i>Hygrophorus</i> sp. HyG1-X-09	JQ685721	764	GB	AY463486.1 <i>Hygrophorus discoxanthus</i>	97	97
				U	UDB000554 <i>Hygrophorus discoxanthus</i>	680/700	97
4	<i>Lactarius deliciosus</i> isolate LMK1-IX-09	JQ685722	793	GB	FJ858744.1 <i>Lactarius deliciosus</i>	100	99
				U	UDB011514 <i>Lactarius deliciosus</i>	788/793	99
37	<i>Lactarius sanguifluus</i> isolate LMH2-X-10	JQ685723	830	GB	AY953420.1 <i>Lactarius vinosus</i>	99	98
				U	UDB011504 <i>Lactarius sanguifluus</i>	826/830	99
1	<i>Pisolithus arhizus</i> isolate SPT1-X-09	JQ685724	611	GB	FM_213365.1 <i>Pisolithus arhizus</i>	100	98
				U	UDB009013 <i>Pisolithus arhizus</i>	608/611	99
11	<i>Xerocomus rubellus</i> isolate XRQ-VII-09	JQ685725	840	GB	EF644119.1 <i>Xerocomus rubellus</i>	87	99
				U	UDB000444 <i>Xerocomus communis</i>	820/840	97
6	<i>Scleroderma</i> sp. ScT-X-08	JQ685726	759	GB	HM237174.1 <i>Scleroderma aurantium</i>	89	99
					FR731648.1 Uncultured ectomycorrhizal fungus genomic DNA	97	99
				U	UDB011607 <i>Scleroderma verrucosum</i>	404/450	89
2	<i>Suillus granulatus</i> isolate SGG1	JQ685727	802	GB	AY898617 <i>Suillus granulatus</i>	99	99
				U	UDB000650 <i>Suillus granulatus</i>	637/642	99
38	<i>Suillus granulatus</i> isolate SGH2	JQ685728	704	GB	AJ272410.1 <i>Suillus granulatus</i>	96	99
				U	UDB011905 <i>Suillus collinitus</i>	637/646	98
22	<i>Tricholoma batschii</i> isolate TBG-XI-09	JQ685729	766	GB	DQ822835.1 Uncultured <i>Tricholoma</i>	97	98
				U	UDB011579 <i>Tricholoma batschii</i>	756/766	98
12	<i>Tricholoma batschii</i> isolate TBK-X-06	JQ685730	752	GB	DQ822835.1 Unculture <i>Tricholoma</i>	100	98
					AY573541.1 <i>Tricholoma subannulatum</i>	87	99
				U	UDB011127 <i>Tricholoma stans</i>	733/738	99
					UDB011587 <i>Tricholoma batschii</i>	730/736	99

br.	Kultura gljive (izolat)	ITS sekvenca		BLAST analiza NCBI (GB) i Unite (U) baza			
		pristupni broj u GB	DS (bp)	pristupni broj i vrsta		Query %*	I %
3	Tricholoma imbricatum isolate TIK1-IX-09	Q685731	758	GB	FJ845444.1 Tricholoma vaccinum	99	97
				U	UDB011627 Tricholoma imbricatum	756/758	99
29	Tricholoma imbricatum isolate TIK2-X-10	JQ685732	796	GB	FJ845444.1 Tricholoma vaccinum	100	97
				U	UDB011627 Tricholoma imbricatum	796/797	99
9	Suillus collinitus isolate ScG1	JQ685733	735	GB	DQ440570.1 Suillus collinitus	100	98
				U	UDB011905 Suillus collinitus	602/608	99

* baza UNITE - identičnost u bp u odnosu na najbližu deponovanu sekvencu

Sekvenciranjem nije potvrđen identitet sledećih kultura:

Kulture 7 i 13 pripadaju vrsti *Hypholoma fasciculare*, a ne *A. caesarea* i *T. sulphureum*, što bi odgovaralo materijalu iz kojeg je rađena izolacija. Pretpostavka je da je do kontaminacije došlo još prilikom izolacije, jer su sve tri vrste prikupljeni na istom lokalitetu i u isto vreme. Obe kulture odlikovale su se brzim rastom, što, prema DAZA *et al.*, (2006), nije karakteristika vrste *A. caesarea*.

Najbliža identifikovana vrsta na osnovu BLAST-a u NCBI Banci Gena za izolat 14 (određen kao *Cortinarius* sp.) je *Gymnopilus turficola* (Fam. *Cortinariaceae*) ([AF 325669.1](#)), sa 93% identičnosti (Query 83 %). Vrlo je verovatno da ova kultura i sekvenca odgovaraju plodonosnom telu iz kojeg je rađena izolacija, i da se radi o pogrešnoj identifikaciji vrste, koja bi na osnovu naknadne revizije herbarskog materijala mogla biti *Gymnopilus sapineus* (a i *G. liquiritae*). Međutim, konačnu identifikaciju neophodna je detaljnija analiza herbarskog materijala. Dobijena sekvenca može biti deponovana u banku gena sa derterminacijom na nivou vrste, kao što je urađeno za *Hygrophorus* (izolat 19).

Izolat 26 određen je kao *Pleurotus pulmonarius* ([AY 450349.1](#), sa 99 % identičnosti, Query 93%), izolat 34 kao *Irpex lacteus* ([EU273517.1](#), identičnost 99%), a izolat 20 može biti iz roda *Bjerkandera* (*Bjerkandera adustus* [AY089741.1](#), identičnost 87%).

Izolat 23 nije determinisan, dok je izolat 16 određen kao *Tricholoma batchii* ([UDB000696](#) *Tricholoma fracticum*, [UDB001412](#) *Tricholoma batschii*), što ne odgovara polaznom materijalu.

Izolati 17 i 18 nemaju srodnih sekvenci u bankama gena (najbliže su sa GQ 1544475.1-Uncultured ectomycorrhizal fungus clone). Na osnovu izgleda plodonosnih tela obe vrste su determinisane kao *Hygroporus*. Mada postoji sumnja da ITS region nije idealan genetički marker za vrste iz roda *Hygroporus*, kao i za neke druge srodne rodove (AGERER) u bankama gena deponovane su sekvence za *H. glyociclus* i *H. hipothejus*. Najverovatnije je da je i ovde došlo do greške prilikom izolovanja gljiva u kulture, kao što je slučaj i sa *A. ceasarea*. Sekvence ove dve vrste su vrlo slične, i ovi izolati imaju identične šeme razlaganja.

3.3.2. Analiza fragmenata dobijena ITS-RFLP razlaganjem

ITS region 33 izolata ektomikoriznih gljiva razlagan je upotrebom 6 restrikcionih enzima. Dužine restrikcionih fragmenata amlifikovanog ITS rDNK regiona za izolate reda Boletales, posle digestije endonukleazama *Alu I*, *Hinf I*, *Hae III*, *Mbo I*, *EcoRI* i *RsaI*, prikazane su u tabeli 8.

Tabela 8. Dužina restrikcionih fragmenata (bp) amlifikovanog ITS rDNK regiona za izolate reda Boletales, posle digestije restrikcionim enzimima *Alu I*, *Hinf I*, *Hae III*, *Mbo I*, *EcoRI* i *Rsa I*.
(-razlaganje enzimima nije rađeno)

izol	Restrikcioni enzim					
	<i>Alu I</i>	<i>Hinf I</i>	<i>Hae III</i>	<i>Mbo I</i>	<i>EcoRI</i>	<i>Rsa I</i>
<i>Sclerodermataceae</i>						
<i>Scleroderma</i>						
1	560/180	280/130	750	290/190/150	860	720
<i>Pisolithus</i>						
6	420/310	303/195	330/200/150	290/110/100	840	750
<i>Boletaceae</i>						
<i>Suillus</i>						
2	680/120	210/120	460/250	280/240	750	750
9	680/120	210/120	460/250	-	740/450	750
10	610/520/220	340/210/130	750/460/250	560/280/240	850/480/390	700
38	-	205/120	460/250	280/240/130	740	-
<i>Xerocomus</i>						
11	-	380/280/190	300/200/180	390/290/200	480/360	-
<i>Chalciporus</i>						
8	570/250	340/215/140/100	310/250/180/130	-	520/400	600/290
<i>Boletus</i>						
27	-	380/350	250/180	-	850	800
28	-	380/350	600/150	-	900	800
29	-	380/240/200	300/130	-	900	860
30	-	380/350	250/180	-	850	820

ITS region *P. arhizus* (1) razlažu enzimi *Alu* I, *Hinf* I i *Mbo* I, a ne razlažu *Hae* III, *Eco*RI i *Rsa* I.

ITS region *Scleroderma* sp.(6) razlažu *Alu* I, *Hinf*I, *Hae* III i *Mbo* I, a ne razlažu *Eco* RI i *Rsa* I.

ITS region ispitivanih *Suillus* izolata (2, 9, 10, 38) na karakterističan način razlažu enzimi *Alu* I, *Hinf*I, *Hae* III (*Bsu* R) i *Mbo* I. Enzim *Rsa* I ne razlaže ITS region ispitivanih *Suillus* izolata. U slučaju upotrebe enzima *Eco* RI, na gelu se detektuju linije koje pripadaju ne razloženom PCR produktu, ali i kod pojedinih izolata se zapažaju i produkti razlaganja. U daljim istraživanjima, treba pokušati razlaganje sa produženim vremenom izlaganja enzimu *Eco* RI

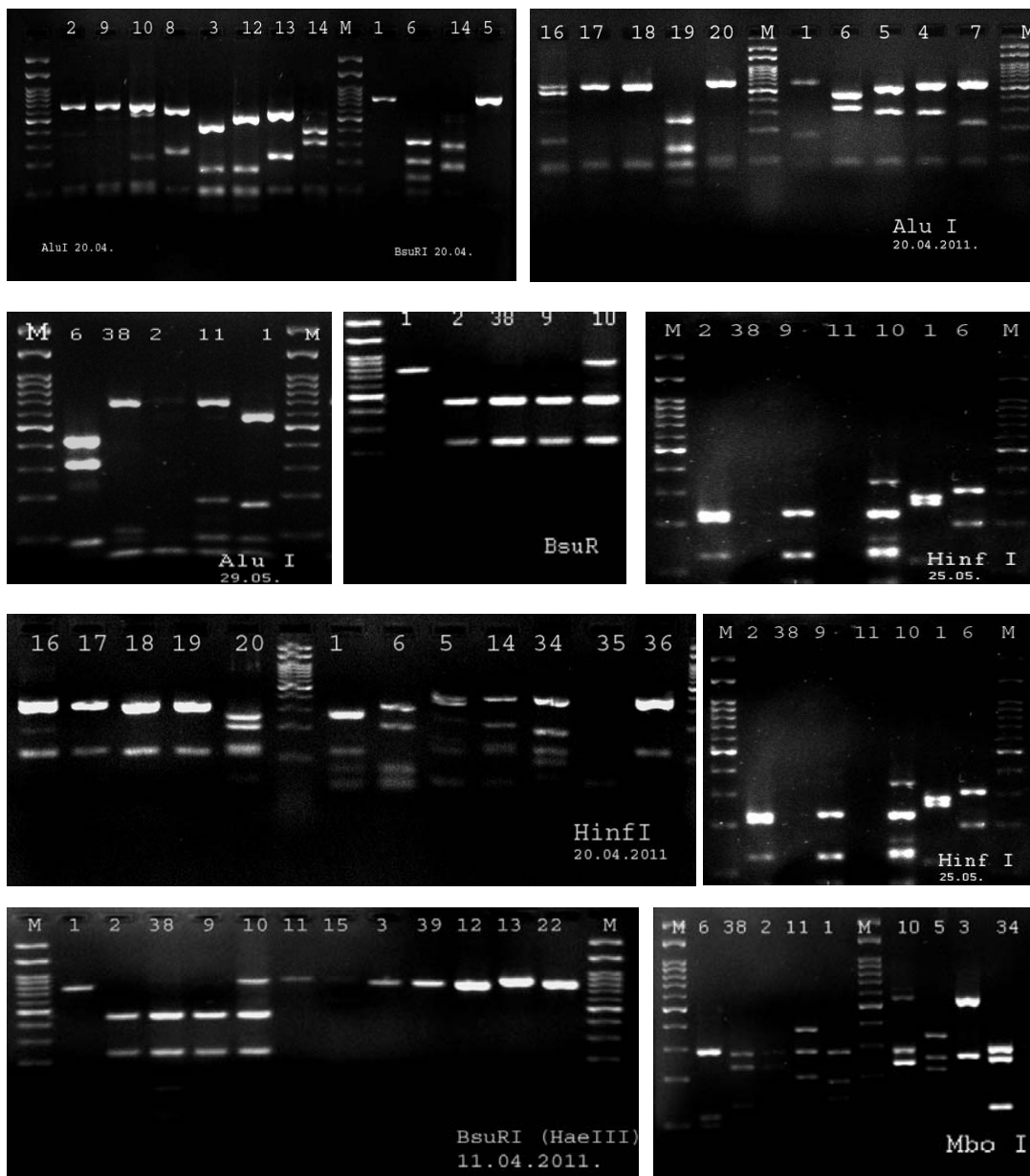
ITS region kod izolata 2, 9 i 38 razlaže se na fragmente jednakih dužina. Kod izolata 10 postoji razlika kada se vrši razlaganje sa enzimima *Alu* I i *Hinf*I, dok se u slučajevima razlaganja sa *Mbo* I i *Hae* III najverovatnije radi o nepotpuno razloženom produktu (gornja crta) i produktima razlaganja, što su rezultati koji odgovaraju i izolatima 2, 9 i 38.

Rezultati razlaganja ITS regiona izolata 11 razlikuju se od ostalih iz ove grupe, što je i očekivano, jer ovaj izolat pripada rodu *Xerochomus*.

ITS region izolata iz roda *Boletus* razlažu na fragmente enzimi *Hinf*I i *Hae* III, dok ga *Rsa* I i *Eco* RI ne razlažu. ITS region vrste iz roda *Boletus* nije razlagan enzimima *Alu* I i *Mbo* I. Izolati 27 i 30. Izgleda da bi se enzim *Hae* III mogao upotrebiti za razdvajanje nekih vrsta u okviru roda *Boletus*, pa čak i *Hinf*I, koji razdvaja izolat 29 od ostala 3 *Boletus* izolata (27, 28, 30).

ITS region izolata 8, koji pripada rodu *Chalciporus* razlaže se na drugačiji način od *Boletus* izolata, i mnogo više nalik na ITS region izolata 11 (*Xerocomus*).

Dužine restrikcionih fragmenata amlifikovanog ITS rDNK regiona za izolate reda Russulales, posle digestije endonukleazama *Alu* I, *Hinf*I, *Hae* III, *Mbo* I, *Eco* RI i *Rsa* I, prikazane su u tabeli 9.



Slika 6. RFLP razlaganje amplifikovanog ITS rDNK regiona za različite izolate ektomikoriznih gljiva sa restrikcionim enzimima *Alu I* (12 h, 37 °C), *BsuR I* (*Hae III*) (12 h, 37 °C), *Hinf I* (12 h, 37 °C) i *Mbo I* (12 h, 37 °C). Oznake izolata: 1. *Pisolithus arhizus*, 2. *Suillus granulatus* (SGG1), 3. *Tricholoma imbricatum* (TIK -IX-09), 4. *Lactarius deliciosus*, 5. *Russula sanguinaria*, 6. *Scleroderma* sp., 7. *Hypholoma fasciculare*, 8. *Chalciporus amarellus*, 9. *Suillus collinitus* (ScG1), 10. *Suillus mediteranensis*, 11. *Xerocomus rubellus*, 12. *Tricholoma batchii* (TBK-X-06), 20. *Hygroporus* sp., 22. *Tricholoma batchii* (TBG -IX-09), 36. *Hebeloma sinapizans*, 38. *Suillus granulatus* (SGH2) 39. *Tricholoma imbricatum* (TIK2-X-10).

Tabela 9. Dužina restrikcionih fragmenata (bp) amlifikovanog ITS rDNK regiona za izolate iz reda Russulales posle digestije restrikcionim enzimima *Alu* I, *Hinf*I, *Hae* III, *Mbo* I, *Eco* RI i *Rsa* I (- razlaganje enzimima nije rađeno)

Izol	restrikcioni enzim					
	<i>Alu</i> I	<i>Hinf</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Mbo</i> I	<i>Eco</i> RI	<i>Rsa</i> I
<i>Russulaceae</i>						
<i>Russula</i>						
5	485/295	450 (400) /350/150	750	340/250/220	525/340	720/510
<i>Lactarius</i>						
4	520/290	400/290/120	500/320	-	520/360	730/290
37	-	-	500/320	-	850	-

ITS region izolata *Russula*-e ne razlaže jedino enzim *Hae* III. Svi ispitivani enzimi razlažu ITS region *Lactarius*-a. *Mbo* I nije korišćen za ispitivanje razlaganja kod *Lactarius*-a.

Vrste iz rodova *Lactarius* i *Russula* su međusobno srodne, i prilikom razlaganja sa *Alu* I, *Hinf*I i *Eco* RI daju iste šeme razlaganja: njihov ITS region deli se na iste fragmente. Za njihovo međusobno razlikovanje na osnovu do sada dobijenih rezultata može da ima značaja enzim *Hae* III.

Dužine restrikcionih fragmenata amlifikovanog ITS rDNK regiona za izolate reda *Agaricales*, posle digestije endonukleazama *Alu* I, *Hinf* I, *Hae* III, *Mbo* I, *Eco* RI i *Rsa* I prikazane su u tabeli 10. Međutim, identitet izolata 16, 17, 18, 19, 20, 23, 26, 36, 34, 35, 7, 13, 14 nije potvrđen sekvencioniranjem PCR proizvoda. Zbog toga su ovde prikazani, rezultati za *Tricholoma* vrste i pojedinačne izolate 19- *Hygrophorus*, 24-*Amanita*, 36 – *Hebeloma*. Sekvenciranjem ITS regiona određeni su izolati 14- *Gymnopilus*, a 7 i 13 – *Hypholoma fassiculare*.

Tabela 10. Dužina restrikcionih fragmenata (bp) amlifikovanog ITS rDNK regiona za izolate iz reda Agaricales posle digestije endonukleazama *Alu* I, *Hinf*I, *Hae* III, *Mbo* I, *Eco* RI i *Rsa* I (- razlaganje enzimima nije rađeno)

Izol	restrikcioni enzim					
	<i>Alu</i> I	<i>Hinf</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Mbo</i> I	<i>Eco</i> RI	<i>Rsa</i> I
<i>Tricholomataceae</i>						
<i>Tricholoma</i>						
3	430/170	400/370/120	810	520/260	500/380	700
12	490/170	400/370/120	790	-	480/380	695
22	-	400/370/120	790	-	825	695
39	-	400/370/120	810	-	810	700

Izol	restrikcioni enzim					
	<i>Alu</i> I	<i>Hinf</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Mbo</i> I	<i>Eco</i> RI	<i>Rsa</i> I
<i>Hygrophoraceae</i>						
<i>Hygrophorus</i>						
19	280/140	350/300/130	580/180	-	460/330	680
<i>Amanitaceae</i>						
<i>Amanita</i>						
24	-	-	720	-	840	-
<i>Strophariaceae</i>						
<i>Hebeloma</i>						
36		345/120	520/275	-	820	800
<i>Hypholoma</i>						
7	575/240	330/215/165/120	800	-	470/380	690
13	570/235	320/210/165/120	830	-	480/380	690
<i>Gymnopilus</i>						
14	400/330	408/215/135	300/180	-	-	-

ITS region izolata iz „grupe“ *Tricholoma* razlažu na isti način restrikcioni enzimi *Alu*I, *Hinf*I, *Mbo* I i *Eco* RI. Kako je kod 2 izolata došlo do razlaganja sa enzimom *Eco*RI, a kod dva nije, pretpostavka je da treba pokušati razlaganje ovim enzimom sa produženim vremenom izlaganja. Enzimi *Hae* III i *Rsa* I ne razlažu ITS region izolata iz grupe *Tricholoma*.

ITS region *Gymnopilus* izolata (14) razlažu svi testirani restrikcioni enzimi (*Alu* I, *Hinf*I i *Hae* III), *Hebeloma* (36) razlažu *Hinf*I i *Hae* III, dok prilikom primene enzima *Eco* RI i *Rsa* I ne dolazi do razlaganja. Izolate 7 i 13, koji su posle sekvenciranja determinisani kao *Hypholoma fasciculare*, razlažu *Alu* I, *Hinf*I i *Eco* RI, a ne razlažu *Hae* III i *Rsa* I.

Posle primene *Hae* III i *Eco* RI enzima nije došlo do razlaganja ITS regiona kod vrste *A. muscaria*. U radu sa ovom vrstom primenjena su samo ova dva restrikciona enzima.

3.4. Diskusija

Korišćenjem molekularnih metoda i sekvenciranjem PCR proizvoda potvrđen je identitet 22 kulture gljiva, i 22 ITS sekvence su obrađene i prijavljene u Banku Gena Američkog centra za biotehnoške informacije.

Kao što je ranije rečeno, ne postoji dovoljan broj podataka- ITS sekvenci za gljive. Pokazalo se da upoređivanje isključivo baze podataka NCBI ne omogućava identifikaciju svih obrađenih vrsta. Identifikacija je za pojedine vrste moguća u kombinaciji sa UNITE molekularnom bazom podataka za identifikaciju gljiva.

BLAST-om NCBI i UNITE banke gena jasno i bez razlika određeno je 8 izolata: *Russula sanguinaria* RSK-IX-09, *Amanita muscaria* AMD-X-08, *Boletus luridus* var. *luridus* BL2-VII-10, *Boletus luridus* var. *luridus* BL1-VII-09, *Boletus satanas* Bsat-X-10, *Hypholoma fasciculare* HyFC1-X-08, *Lactarius deliciosus* LMK1-IX-09, *Pisolithus arhizus* SPT1-X-09.

Kod ostalih izolata javljaju se izvesna odstupanja (2-7%) - rezultati se ne podudaraju. Kroz diskusiju koja sledi pokušaćemo, između ostalog, da ukažemo na razlike između ove dve baze i prednosti koje svaka od njih pruža, kao i na još uvek nerazrešene probleme u taksonomiji gljiva.

Prilikom poređenja rezultata dobijenih BLASTovanjem "naših" sekvenci ektomikoriznih gljiva (dobijenih iz micelija u kulturi ili iz završetaka korena), u bazama GenBank i UNITE, ukoliko postoji razlika, prednost dajemo rezultatima dobijenim iz UNITE baze podataka. Osnovni koncept ove baze, definisane kao *molekularna baza podataka za identifikaciju gljiva*, zasnovan je na pouzdanosti deponovanih sekvenci, koje vode poreklo iz plodonosnih tela determinisanih od strane stručnjaka.

Sa druge strane, NCBI Banka Gena omogućuje uvid u mnogo veći broj sekvenci i često može da ponudi odgovore tamo gde ih UNITE nema.

Kada se govori o geografskom poreklu do sada sekvenciranih gljiva, treba imati u vidu da je većina sekvenci deponovanih u UNITE bazi poreklom iz severne Evrope (iz baltičkih zemalja), dok su nalazi sa juga Evrope malobrojni, i vezuju se uglavnom za Italiju.

Slično je i sa NCBI Bankom Gena, u kojoj su, prema poreklu nama geografski (ekološki- u smislu mediteranskih i suvih staništa) najbliži nalazi iz Italije, Španije i Francuske.

Na osnovu pregledanih baza podataka (12.06.2012) može se smatrati da ovi rezultati (22 sekvence) predstavljaju prvu karakterizaciju ITS regiona za gljive iz 12 rodova iz regiona jugoistočne Evrope, tako da svaki rad na ovom polju predstavlja doprinos upoznavanju bogatstva vrsta gljiva na planetarnom i lokalnom nivou.

Ektomikorizne gljive ispoljavaju velike varijacije u nizu fizioloških i ekoloških osobina tako da ispitivanje svakog pojedinačnog izolata može da bude vredno, i da omogući ispoljavanje određenih specifičnosti (CAIRNEY, 1999). Zbog toga je i na molekularnom nivou iz određenih rodova istraženo po nekoliko izolata.

Ispitivana su 3 *Suillus* izolata, poreklom od gljiva prikupljenih u šumama munike, sa geografski relativno bliskih lokaliteta. Kao polazište, pretpostavljeno je da dva izolata pripadaju vrsti *S. granulatus* (SGG1 i SGH2) a jedan vrsti *S. collinitus* (ScG1). Pregled bliskih sekvenci dobijenih BLASTom u bazama podataka pokazao je da je, kao što navode MANIAN *et al.* (2001), divergencija između *S. granulatus* i *S. collinitus*, na osnovu DNK sekvenci veoma niska, što dopušta da se *S. collinitus* i *S. granullatus* tretiraju kao veoma srodne vrste. Morfološka (fenotipska) sličnost ove dve vrste, kao i činjenica da su obe vrste prikupljene na istom staništu (SGG1 i ScG1) na kome se, kako izgleda, *S. granulatus* javlja često a *S. collinitus* dosta ređe potvrđuje ovu pretpostavku. Kod izolata SgH2, najbliža sekvenca u UNITE bazi pripada vrsti *S. collinitus*, dok najbliža sekvenca u NCBI bazi pripada vrsti *S. granulatus*.

Prema MANIAN *et al.* (2001), između *Suillus* vrsta ITS region je jasno divergentan, a *S. granulatus*, koji je „filogenetski“ podeljen u tri grupe, pokazuje veliku unutarvrstu diferencijaciju, u zavisnosti od geografskog porekla.

Potencijal različitih izolata (strejnova) *S. collinitus* i *S. granulatus* u Španiji za mikorizaciju sadnica proučavali su RUIZ –DIEZ *et al.* (2006) i RINCON *et al.* (2007). U tu svrhu, ovi strejnovi su i genetički određeni, a uvidom u druge sekvence iz banke gena, zapaža se njihova velika srodnost sa izolatom ScG1, kao i sa izolatima SgH2 i SGG1 .

ITS sekvenca poreklom od izolata *S. mediterraneensis* (Jacquet. & J. Blum) Redeuilh poreklom iz šume alepskog bora (sa primorja) zahteva dodatnu analizu i obradu do objavljivanja. Ona odstupa od objavljene *S. mediterraneensis* sekvence u NCBI, i bliža je vrstama *S. granulatus* i *S. collinitus*. Ovaj izolat takođe pokazuje različite obrasce razlaganja prilikom upotrebe 5 različitih restrikcionih enzima u odnosu na druge *Suillus* izolate. *S. mediterraneensis* je vrsta koja je relativno skoro izdvojena na osnovu morfoloških-fenotipskih karakteristika, i prema nekim autorima sporna.

Sekvencirano je 4 izolata iz roda *Tricholoma* (2 vrste). Vrste *T. albobrueum* i *T. batschii*, te *T. imbricatum* i *T. stans* takođe nisu dovoljno jasno razdvojene na osnovu morfoloških karakteristika, što izgleda da pokazuju i analize na molekularnom nivou. *T. batschii* i *T. albobruneum* su u literaturi negde sinonimizirane (ROUX, 2006, www.indexfungorum.org), dok ih drugi autori izdvajaju u posebne vrste. *T. stans* je beležena u Crnoj Gori retko, na istim lokalitetima na kojima se *T. imbricatum* frekventno i obilno javlja. U Banci Gena nema sekvenci koje se odnose na *T. imbricatum* i *T. batschii*, već su u tabeli 7 predstavljeni najbliži nalazi *Tricholoma*, koji su geografski vezani za Severnu Ameriku. Nalazi *T. imbricatum* i drugih *Tricholoma* vrsta u UNITE bazi odnose se na nalaze iz Severne Evrope, osim jednog nalaza *T. batchii*, koji je iz Hrvatske¹¹.

Suillus i *Tricholoma* vrste javljaju se kao česte u šumama munike u Crnoj Gori, i pretpostavlja se da su značajni simbionti ovoga bora.

Ispitivana su takođe 4 izolata *Boletus*-a. Dva izolata *Boletus luridus* sakupljena u dve uzastopne godine, na geografskoj udaljenosti od oko 2 km, pokazuju međusobne razlike. Rezultati sekvenciranja pokazali su da je vrsta na osnovu fenotipskih karakteristika određena kao *Boletus legalii* (PERIĆ, 2011), (tabela 6), zapravo *B. satanas*. Pogrešna determinacija vrste posledica je varijabilnostin makroskopskih karakteristika vrste, ali i nedovoljno jasne razlike u mikroskopskim strukturama i bazidija i bazidiospora.

Rod *Boletus*, kao velik, značajan i opšte poznat rod ektomikoriznih gljiva, širokog rasprostranjenja, pa čak i velike ekonomske vrednosti u UNITE bazi “ima deponovane”

¹¹ Naš izolat *Tricholoma batchii* TBK-X-06 pokazuje malo višu identičnost (99%) sa izolatom iz Švedske, nego (98%) sa izolatom iz Hrvatske, mada to u ovom slučaju nema naročitog značaja. To pokazuje da je vrsta stabilnog genotipa (ITS-a) u Evropi.

sekvence za 30 vrsta - ukupno 72 sekvence. (U Index fungorum nalazi se preko 2420 vrsta *Boletusa*, od kojih su mnoge sinonimizirane, ili je njihova taksonomska pozicija promjenjena, ali se svakako može računati da se danas radi sa najmanje nekoliko stotina vrsta iz roda *Boletus*.) U UNITE bazi deponovano je na primer, 3 *Boletus radicans* sekvence, i 5 sekvenci koje pripadaju vrsti *B. legalie*. *B. satanas* zastupljen je sa 9 sekvenci, od kojih se 7 podudaraju 100% sa našom Bsai-X-10. Radi poređenja navodimo i podatak da se u GenBank nalazi se samo 3 *B. satanas* sekvence, koje se sa našom podudaraju sa oko 95%.

Izolat ChA1-X-09- *Chalciporus amarellus* ne pokazuje dovoljan stepen identičnosti sa drugim *C. amarellus* sekvencama. U GenBank deponovano je ukupno 5 *Chalciporus* sekvenci, od kojih ni jedna nije *C. amarellus*. U UNITE bazi ima samo 13 *Chalciporus* sekvenci, od čega su 2 sekvence *C. amarellus*, oba poreklom iz Italije, koje su međusobno vrlo različite. U mikoteci na BTFu u Podgorici nalazi se veći broj izolata *C. amarellus*, poreklom iz šuma munike, ali sa različitih lokaliteta, koji su zabeleženi kao ista vrsta. Za ove izolate treba nastaviti istraživanja na molekularnom nivou.

Vrste *X. rubellus* i *X. communis* su prema MUÑOZ (2005) sinonimizirane. *X. rubellus* (XRQ-VII-09) se i u našoj kolekciji prvobitno vodio kao *X. communis*, ali je kasnije prihvaćena nomenklatura sugerisana od Muñoz-a¹². Na ovom primeru želimo da skrenemo pažnju na pojavu sinonima kod velikog broja vrsta gljiva, koja negde može da dovede do zabune i teškoća u pravilnom povezivanju vrsta sa njihovim sekvencama. Problem je takođe, što nije uobičajen princip da se iza navođenja imena vrste u bazi unosi i ime autora koji je vrstu kreirao, kao što je to inače uobičajeno u navođenju u nauci. Verovatno će buduće molekularna istraživanja, moći da daju preciznije odgovore na brojna pitanja iz taksonomije gljive.

Izolat *Lactarius sanguifluus* LMH2-X-10 potvrđen je na osnovu UNITE sekvence, koju ovde, zbog gore navedenog, smatramo merodavnom.

Izolat *Hygrophorus* sp. HyG1-X-09 nije određen na molekularnom nivou. Broj sekvenciranih *Hygrophorus* vrsta u UNITE bazi iznosi oko 30 (većinom sa jednom a

¹² Prema Index fungorum, ove dve vrste vode se kao različite

maksimalno sa 3 sekvence). To je vrlo malo, s obzirom da su u Index fungorum zabeležene 922 vrste roda *Hygrophorus*.

U bazama podataka nismo našli potvrdu ni za *Hebeloma sinapizans*, veoma rasprostranjenu u šumama bukve, u submediteranskom pojasu Crne Gore. Ona je često nalažena na lokalitetima gde se munika i bukva javljaju zajedno. Njoj najbliža sekvenca predstavlja neidentifikovanu gljivu izolovanu iz korena breze (*B. papirifera*).

Zanimljiva su i sledeća zapažanja u smislu “ekološke sličnosti” i interpretacije rezultata:

Scleroderma sp. koju smo izolovali u kulturi nije identifikovana ni molekularnim metodama¹³, ali je njoj najbliža sekvenca neidentifikovane vrste izolovane iz korena *Eucalyptus*-a iz Zambije (TEDERSOO *et.al*, Mol, Ecol 20). U Gradskom parku u Tivtu, gde je ova *Scleroderma* sp. sakupljena, *Eucalyptus* je jedna od najzastupljenijih vrsta drveća, pa se može pretpostaviti da je gljiva tu dospela sa sadnim materijalom.

Izolati *R. sanguinaria* i *L. semisanguifluis* beleže najveću sličnost sa neidentifikovanim gljivama izolovanim iz korena *P. pinaster* u Španiji¹⁴. Može se pretpostaviti da u vreme kada je rađena izolacija gljiva iz korena *P. pinaster* u bazi nisu bile deponevane sekvence iz plodonosnih tela sa kojima bi se izvršilo poređenje i identifikovale vrste iz korena. Danas, su međutim ove sekvence poznate, čime neidentifikovane vrste iz korena bivaju identifikovane. Može se takođe uočiti veća identičnost sekvenci poreklom geografski bliskih područja i sličnih ekoloških uslova (submediteranski i mediteranski klimat, borovi), što je slučaj i sa izolatom *P. arbizus*, koji pokazuje najveću sličnost sa izolatima iz Španije i Italije.

Dobijene restrikcione šeme (rezultati ITS-RFLP analize) za određene izolate ektomikoriznih gljiva grupisali smo i prikazali prema srodnosti (Tabele 8, 9, 10). Može se reći da se na nivou roda zapažaju određene pravilnosti u cepanju ITS regiona. Dobijene rezultate mogli smo da uporedimo sa ranije publikovanim rezultatima za nekoliko *Pisolithus*

¹³ Plodonosno telo bilo je mlado i bez formiranih spora, pa nikakva determinacija, osim ona na nivou roda, nije bila moguća. Ovakva plodonosna tela su zgodna za dobijanje kulture.

¹⁴ Druge sekvence, koje se navode u tabeli 7 potvrđuju identitet naših kultura.

arhizus i *Suillus* izolata (vrsta). U literaturi nisu pronađeni podaci sa kojima bi se većina drugih restrikcioni šema mogla uporediti. Iako se nekoliko timova (KAREN *et al.*, 1997; GOMES *et al.*, 2002; WALLANDER *et al.*, 2006) bavilo ovakvim istraživanjima, pokrivajući relativno veliki broj vrsta gljiva, u istraživanjima su korišćene druge vrste gljiva (mada neke od njih iz istih rodova), kao i u nekim slučajevima, drugi restrikcioni enzimi.

Iako je utvrđeno da ITS region rDNK pokazuje visok nivo polimorfizma između vrsta, dok su unutarvrstne varijacije vrlo ograničene, smatra se da je malo toga poznato o varjabilnosti ITS regiona među ektomikoriznim gljivama. Nije dovoljno jasno da li se varijacije u ITS regionu javljaju u odnosu na pojavu vrsta u različitim geografski udaljenim područjima rasprostranjenja, niti kakve su mogućnosti za identifikaciju vrste upotrebom RFLP metoda (KAREN *et al.*, 1997). Generalni zaključci ne mogu da budu izvedeni zbog malog broja analiziranih rodova i vrsta.

Međutim, izvesno je da ITS RFLP analiza može da se koristi kao metod za razlikovanje između izolata gljiva na nivou vrste. Većina korišćenih restrikcioni enzima razdvojila je, na osnovu različite dužine fragmenata, ispitivane izolata u odgovarajuće rodove (14 rodova).

Restrikcija sa *Alu* I omogućila je razlikovanje vrsta iz rodova *Scleroderma*, *Pisolithus*, *Chalciporus*, *Hygroporus*, *Hypholoma* i *Gymnopillus*, kao i *Suillus* i *Tricholoma*, u kojima je korišćen veći broj izolata, koji su se grupisali – razdvajali po istim šemama. Predstavnike reda *Rusulales* (*Rusula* i *Lactarius*) karakteriše zasebna šema razlaganja, ali se *Rusula* i *Lactarius* ne mogu međusobno razlikovati upotrebom ovog enzima.

Restrikcija sa *Hinf* I omogućila je razlikovanje na nivou roda za *Pisolithus*, *Scleroderma*, *Suillus*, *Xerocomus*, *Chalciporus*, *Boletus*, *Tricholoma*, *Hygroporus*, *Amanita*, *Hebeloma*, *Hypholoma*, *Gymnopilus*, dok se restrikcioni obrasci za *Russulales* (*Russula* i *Lactarius*) vrlo slični. Ovaj enzim razdvaja sve ispitivane izolate, osim što za *Russula*-u i *Lactarius* to nije sasvim očigledno.

Restrikcija sa *Hae* III razdvaja manji broj izolata. *Hae* III na karakterističan način razlaže ITS region izolata iz rodova *Pisolithus*, *Suillus*, *Xerocomus*, *Chalciporus*, *Lactarius*, *Hygrophorus*, *Hebelomu* i *Gymnopilus*. U okviru roda *Boletus* uočavaju se razlike između

vrsta. Upotreba ovog enzima omogućava razlikovanje u okviru reda *Russulales*, jer se ITS region *Russula* ne cepa. Do restrikcije ne dolazi takođe kod *Scleroderma*, *Tricholoma*, *Amanita*, *Hypholoma*.

Mbo I je primenjen na manji broj izolata, pri čemu je restrikcija zabeležena u svim reakcijama. Na osnovu obavljenih analiza, mogu se razlikovati *Scleroderma*, *Pisolithus*, *Suillus*, *Xerochomus*, *Russula* i *Tricholoma* šabloni.

Po primeni *Eco* RI zabeležen je manji broj restrikcija: kod vrsta iz rodova *Xerochomus*, *Chalciporus*, *Russulales* (*Russula* i *Lactarius* bez razlike), *Tricholoma*, *Hygroporus* i *Hypholoma*.

Rsa I je bio uspešan u fragmentaciji ITS regiona jedino kod vrsta iz rodova *Chalciporus*, *Russula* i *Lactarius*.

Iako su rezultati o "efikasnosti" restrikcionih enzima za razlikovanje različitih izolata ektomikoriznih gljiva ovde predstavljeni (zbog preglednosti) navođenjem imena roda, njih treba vezivati isključivo za analizirane vrste. Diskusija koja sledi treba da pokaže da ih je zapravo najispravnije vezivati isključivo za određeni izolat.

Restrikcioni obrazac - šema dobijena za izolat *P. arhizus* u ovom istraživanju odudara od rezultata koji su za *Pisolithus* izolate dobili GOMES *et al.* (2002). GOMES *et al.* (2002) primenili su *Alu* I, *Hae* III, *Hpa* II i *Hinf*I na 2 *P. arhizus* izolata različitog porekla i pri tome dobili različite restrikcione obrasce. Prema navedenim autorima, na osnovu ove i studije GOMES *et al.* (1999) izolati poreklom iz Brazila čine grupu koja je jasno odvojena od izolata sakupljenih u SADu i Francuskoj (JUNGHAUS *et al.*, 1998., cit GOMES *et al.*, 2002). Unutarvrstne varijacije kod *P. arhizus* izolata zabeležili su takođe FARMER i SYLVIA (cit. JEFFRIES i DODD, 2000), što govori u prilog tvrdnji da ovi taksoni predstavljaju kompleks vrsta.

Tri izolata *Suillus* (2, 9, 38) korišćena u ovom istraživanju pokazuju, može se reći, istu restrikcioni obrazac- šemu, i potvrđuju da je, kako tvrde i MANIAN *et al.* (2001) divergencija između *S. granulatus* i *S. collinitus* niska. Ovo su takođe pokazali i rezultati sekvenciranja. Naše ITS-RFLP šeme za ispitivane *Suillus* izolate razlikuju se od nekih ranije objavljenih šema (KAREN *et al.*, 1998; EL KARKOURI *et al.*, 2002, 2006; WALLENDER *et al.*,

2003; GOMES *et al.*, 2002, HORTON *et al.*, 1998) za *S. granulatus*, *S. collinitus* i još nekoliko *Suillus* vrsta (*S. brevipes*, *S. luteus*, *S. bovinus*, *S. variagatus*). Prema MANIAN *et al.* (2001), između *Suillus* vrsta ITS region je jasno divergentan, a *S. granulatus*, koji je filogenetski podeljen u tri grupe, pokazuje veliku unutarvrstu diferencijaciju, u zavisnosti od geografskog porekla, što možda može da predstavlja osnov objašnjenja za dobijene razlike. Treba imati u vidu da je ovom prilikom korišćen materijal iz geografskog regiona i sa domaćina o kojem ranije nije bilo podataka ove vrste. Takođe je očigledno da je neophodan veći broj izolata iste vrste koji bi omogućio detaljniju analizu i upoznavanje restrikcioni obrazaca ne samo za *Suillus* i *Pisolithus*, nego i za ostale izolate.

ITS RFLP šeme predstavljene u ovom radu mogu da se iskoriste kao markeri za identifikaciju i monitoring gljiva u budućim programima kontrolisane mikorizacije sadnica (EL KAKOURI 2002, GOMES *et al.*, 2002). Dobijene restrikcione šeme predstavljaju takođe oruđe za dijagnostiku ektomikoriznih gljive u uzorcima korena prikupljenim u šumskim ekosistemima (GOMES *et al.*, 2002; ERLAND *et al.*, 1997; PRISCH *et al.*, 1999; DAHLBERG *et al.*, 1997; HORTON i BRUNS, 1998) mada je, s obzirom na veliku raznovrsnost vrsta koja se javljaju na uzorcima korena prikupljenim u prirodnim populacijama ovaj metod manje efikasan.

Prema GOMES *et al.* (2002), ITS- RFLP je dobar za proučavanje populacione heterogenosti u ekosistemu.

Predstavljeni šabloni mogu da posluže za prepoznavanje i praćenje ciljanih (tačno određenih, znanih) vrsta u uzorcima korena, i zbog toga je konstatacija GOMES *et al.* (2002), u smislu mogućnosti da se uoči populaciona heterogenost ispravna, ali ostaje nerešen problem krajnje determinacije svih vrsta koje se u populaciji javljaju.

Sledi nekoliko primera upotrebe ITS-RFLP metoda u determinaciji ektomikoriznih gljiva sa korena prikupljenih u prirodnim populacijama.

ERLAND *et al.* (1997) su primenili *Hinf*I u digestiji ITS regiona *Tylospora fibrillosa*, pri čemu su dobili ITS –RFLP obrazac koji je omogućio da se ova vrsta razlikuje od velikog broja drugih bazidiomikota. Na korenovima smrče prikupljenim u šumama u južnoj Švedskoj, mikoriza je pokazivala generalne morfološke karakteristike *T. fibrillosa*, i ITS je

uspešno amplifikovan iz 93% uzoraka korena. U ovim uzorcima zabeleženo je 5 različitih RFLP šema, a *T. fibrillosa* potvrđena u 21% korena, što je pokazalo da ona ima određeni ekološki značaj u ovim šumama. Preostala 4 RFLP obrasca pripadaju nepozatim simbiotskim gljivama i zastupljena su na 27, 20, 11 i 3% analiziranih korenova. Smatra se da ovi rezultati ne bi mogli lako da budu dobijeni na osnovu isključivo morfološkog opisivanja (morfofajpinga) mikorize, jer svih 5 vrsta obrazuju slične mikorizne strukture, tako da upotreba ITS-RFLP molekularne metode omogućava brzu determinaciju mikoriznih simbionata.

PRITSCH *et al.* (1997) koristili su PCR-RFLP za identifikaciju ektomikoriznih gljiva iz 16 morfortipova mikorize iz 60-godišnjih šuma crne jove. Poređenjem sa RFLP obrascima dobijenim iz plodonosnih tela prikupljenih na tom lokalitet identifikovano je 8 tipova mikorize, dok je 8 ostalo neidentifikovano. Identifikovana su 4 ECM tipa koja su imala identične obrasce sa obrascima dobijenim iz odgovarajućih plodonosnih tela nađenih na lokalitetu. Ona su pokazivala veliku unutarvrstu stabilnost na osnovu analize DNK iz plodonosnih tela sa različitih lokaliteta, nađenih na geografskoj udaljenosti od oko 300 km. Nasuprot tome, unutarvrstne varijacije su se javile kod plodonosnih tela *Paxillus rubicundulus* sa različitih lokaliteta.

DAHLBERG *et al.* (1997), na osnovu proučavanja diverziteta vrsta u zrelih smrčevim sastojinama u Švedskoj, smatraju da ITS-RFLP analiza unapređuje izdvajanje različitih morfortipova mikorize. Njihova studija ističe činjenicu da askomicete naseljavaju oko 20% mikoriznih korenova, a da za njih još uvek nema specifičnih prajmera.

Koristeći uzorke korena sakupljenog iz mešovitih šuma *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.)Franco i *Pinus muricata* D.Don HORTON i BRUNS (1998) su upotrebili kombinaciju morfološke karakterizacije (morfofajpinga) i PCR- RFLP metoda da pokažu da su najčešće ektomikorizne gljive bile u zajednici sa oba domaćina. 74% biomase ektomikoriziranih korenova je bilo kolonizovano sa vrstama iz familija *Telephoraceae* i *Russulaceae*.

3.5. Zaključak

U NCBI Banku Gena deponavane su 22 sekvence gljiva, od kojih je 20 pripada mikoriznim vrstama. Ovim sekvencama, posle ponovnog ispitivanja herbarskog materijala, moći će da se pridruži i sekvenca saprobne *Ginnophilus* vrste.

Prvi put su genetički okarakterisane gljive iz 11 ektomikoriznih rodova (i jedan saprobni) iz regiona jugoistočne Evrope.

Dobijeni su restrikcioni šabloni za 25 vrste ektomikoriznih gljiva, upotrebom 3- 6 različita restrikciona enzima.

Dobijeni RFLP šabloni poslužiće za identifikaciju ovih vrsta u korenovima sadnica, primenjenih u programima kontrolisane mikorizacije sadnica u rasadniku ili na terenu, kao i u uzorcima korena prikupljenim u prirodnim populacijama.

Neophodno je nastaviti započeta istraživanja i u njih uključiti veći broj izolata, istih, kao i vrsta koje prethodno nisu istraživane.

4. Karakterizacija ektomikoriznih zajednica munike na osnovu morfološke analize korena i molekularnih metoda istraživanja

4.1. Uvod

Karakterizacija ektomikoriznih zajednica označava prepoznavanje partnera u zajednici. Ranija istraživanja oslanjala su se na beleženje, determinaciju i brojanju sporokarpa ektomikoriznih gljiva, i uobičajen način procene ekološkog značaja i diverziteta ektomikoriznih gljiva u ekosistemima je bio procena frekventnosti i obilnosti plodonošenja. Zbog važnosti faktora spoljašnje sredine u aktiviranju polne reprodukcije gljiva, kao i nepravilnosti plodonošenja kod velikog broja vrsta, ovakva karakterizacija zajednica gljiva zahteva dugotrajan i višegodišnji monitoring. Prisustvo plodonosnih tela predstavlja indikator prisustva gljive u zemljištu, ali odsustvo plodonosnih tela na nekom lokalitetu znači malo. U umerenim temperaturnim zonama je preporučeno da minimalan period posmatranja neophodan da se dobije odgovarajuća slika o strukturi zajednica gljiva iznosi 3-8 godina, zavisno od veličine lokaliteta koji se prati. U uslovima aridne i semi-aridne klime plodonošenje je još više sporadično, i kao rezultat, ovakvo istraživanje je vrlo teško, ili virtuelno nemoguće izvesti (GARDES i BRUNS, 1996).

Istraživanja takođe pokazuju da brojanje sporokarpa ne obezbeđuje odgovarajuće informacije o populacijama gljiva koje naseljavaju mikorizovane korenove (GARDENS i BRUNS, 1996). Oslanjajući se isključivo na prisustvo sporokarpa, može da se dobije iskrivljena slika naročito o kvantitativnom učešću pojedinih vrsta u populaciji. Da bi se razumelo funkcionisanje ekosistema, neophodno je obratiti pažnja na gljive koje dominiraju populacijom na vrhovima korena domaćina (GARDENS i BRUNS, 1996). Postojali su brojni pokušaji da se razviju alternativne metode za identifikovanje gljiva na osnovu vegetativnih struktura. One su podrazumevale izolaciju gljive i njeno određivanje na osnovu osobina dobijene kulture ili na osnovu biohemijskih reakcija, kao i morfološko-anatomske opisivanje. Najčešći problemi koji su se javljali prilikom ovih istraživanja ektomikorize odnosili su se na: ne dovoljno jasnu definiciju ektomikorize, kontaminaciju kultura gljiva,

greške u identifikaciji korenova i gljiva, nemogućnosti da se većina ektomikoriznih gljiva uzgaja u kulturi na hranljivim podlogama, kao i nemogućnost da se pretpostavi stvarna »veličina« podzemnog diverziteta gljiva (TEDERSOO *et al.*, 2010).

Identifikacija tipova mikorize na osnovu morfološke analize korenova (tzv. *morphotyping*) prikupljenih u prirodnim populacijama, daje preciznije informacije o kvantitativnom prisustvu određenih vrsta u ekosistemu. Početkom 1990-ih, razvoj molekularnih metoda istraživanja omogućio je determinaciju prisustva ektomikoriznih gljiva u korenu domaćina, što značajno doprinosi poznavanju stvarnog diverziteta ektomikoriznih gljiva. Njihova upotreba doprinela je relativnom prevazilaženje problema kultivacije gljiva i tako suštinski unapredila identifikaciju ektomikoriznih gljiva *in situ* (TEDERSOO *et al.*, 2010).

Za istraživanje diverziteta gljiva i strukture ektomikorizne zajednice u šumi munike primenjen je molekularni metod koji je zasnovan na PCR reakciji, praćen sekvenciranjem PCR proizvoda, u kombinaciji sa morfotajpingom. Polazne ektomikorizne strukture neophodno je prvo opisati (morfološko-anatomsko opisivanje –morfotajping), a zatim izvršiti izolaciju DNK iz različitih »tipova« mikoriza. Sledi PCR reakcija, praćena sekvenciranjem PCR proizvoda. Ovaj metod koristi se za identifikaciju gljiva iz mikorize zato što su za njegovu primenu dovoljni pojedinačni uzorci male veličine, a metod može da bude usmeren prema taksonomski veoma različitim gljivama.

Cilj ovog istraživanja bio je da se istraži do sada nepoznata ektomikorizna zajednica munike, identifikacijom vrsta razvijenih na korenu. Ovakva vrsta istraživanja do sada nije vršena ni u drugim šumskim ekosistemima kod nas.

4.2. Materijal i metod

4.2.1. Istraživani lokaliteti

4.2.1.1. Lokalitet Sovrh

Na lokalitetu Sovrh zajednica munike razvijena je na istaknutom planinskom grebenu, sa gotovo potpuno nerazvijenim zemljištem, delom na krečnjačkom siparu, a delom na terenu sačinjenom od većih ili manjih blokova krečnjaka, mestimično sa slabo razvijenim zemljištem i travnatim pokrivačem. Nagib terena je generalno veći od 100% (45°). Ovo je izrazito kserotermno stanište, sa nerazvijenim ili vrlo slabo razvijenim zemljištem u pukotinama između stena. Šuma munike razvijena na ovom terenu je pionirskog karaktera.

Lokalitet Sovrh reprezentuje jedno od tipičnih staništa munike, na krečnjačkim planinskim grebenima velikog nagiba (preko 45-60°). Ekstremnije varujante staništa munike podrazumevaju terene još strmijeg nagiba i na jedrim krečnjačkim stenama, na kojima je uzorkovanje korena praktično nemoguće. Uzimanje uzoraka korena i u ovakvim uslovima izuzetno je otežano s obzirom da je zemljište izuzetno kamenito i sa malim učešćem sitnijih frakcija kamena u površinskim slojevima. U isto vreme, munika formira jak koren kod kojeg je odmah izražen rast vertikalno na dole, i slabo grananje (odvajanje i malih bočnih grana korena) u zoni od nekoliko -20 cm ispod površine zemljišta. Učešće sitnije frakcije kamena izraženo je na siparima, gde ima izuzetno malo organske komponente zemljišta (tu ima mrvljenog krečnjačkog žuto-smeđeg praha). Na sitno terasastom terenu strmih padina dolazi do formiranja smeđeg šumskog zemljišta, koje se deponuje između krupnijih komada kamena, ili između stena. To su inicijalne faze formiranja zemljišta. Ove terase su najčešće zatravnjene, a do akumulacije četina dolazi samo mestimično, i u maloj količini, usled spiranja.

Površina na kojoj su sakupljeni uzorci u ovom istraživanju ima oblik široke trake dužine oko 1500-2000 m i širine 50-100 m.

Smatramo da ovaj lokalitet zauzima graničnu poziciju između mediteranske i prokletijske varijante šume munike.

4.2.1.2. Lokalitet Kastrat

Na ovom lokalitetu munika raste na manje ili više zaravnjenom platou sa padinama nagiba do 30 %, sa dobro razvijenim zemljištem (smeđe zemljište na krečnjacima). Na delovima zemljište nije razvijeno i veoma je skeletno. Ova šuma ima karakter klimazonalne zajednice munike. Ovo je takođe jedno od tipičnih staništa na kome se, zavisno od sezone, javlja manje ili više obilno plodonošenje gljiva. Lokalitet Kastrat je geografski bliže moru, ali kao i lokalitet Sovrh, ima graničnu poziciju između mediteranske i prokletijske varijante šume munike.

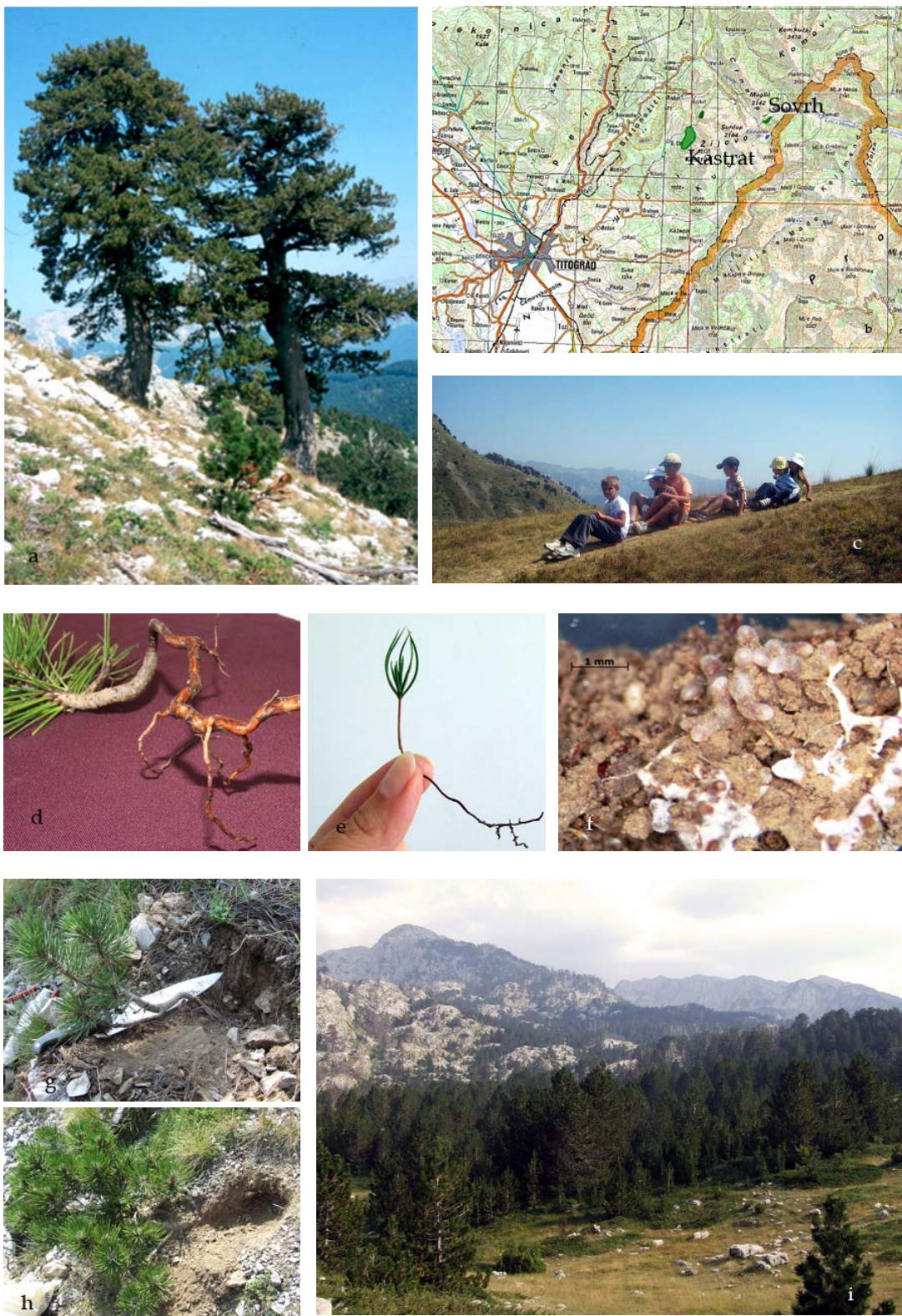
4.2.2. Prikupljanje ektomikoriznih uzoraka

Uzorci korena munike sakupljeni su na lokalitetima Sovrh (Lokalitet 1) i Kastrat (Lokalitet 2). Sakupljeni su vrhovi korena većinom sa malih stabala (iz podmladka munike), sa dubine oko 10, ređe do 20 cm. To su najviši bočni korenovi koji polaze sa glavnog korena. Ovi korenovi prostiru se kroz tanak sloj zemlje između kamenja. Veličina uzoraka korena do koje se moglo doći bila je relativno mala u odnosu na ukupnu masu razvijenog korena. Zbog toga podatke o obilnosti pojavljivanja pojedinih vrsta u zajednici treba uzeti sa rezervom.

Na lokalitetu Sovrh uzeti su uzorci sa 35 pojedinačnih stabala munike, pri čemu se pazilo da međusobna udaljenost između stabala bude najmanje 20 m. Kada je to bilo moguće, osim korena uzet je uzorak okolne zemlje. Na lokalitetu Kastrat uzorci su uzeti sa 14 stabala.

Uzorci zemljišta i korena (zemljišni uzorci) čuvani su u plastičnim vrećama na +4 °C do momenta pripreme, ne duže od 3 nedelje. Preporučuje se kratkotrajno čuvanje uzoraka korena na +4 °C, ne duže od 3 nedelje pre zamrzavanja na -20 °C radi očuvanja kvaliteta DNK i njene lakše izolacije (MENKIS i VASAITIS, 2011.)

Uzorci su potapani u vodu nekoliko sati pre pranja zato što je zemlja bila suva i rastresita. Velike uzorke zemlje potrebno je sejati, da bi se izdvojili korenovi.



Slika 7. Istraživani lokaliteti (b) i uzimanje uzoraka: a, c, g, h- Lokalitet Sovrh, i-lokalitet Kastrat; d, e, f- uzorci korena

Relativna zastupljenost određenih taksonomskih grupa (rodova) u zajednici odnosi se na čestinu pojavljivanja određene gljive u populaciji. Ona je računata kao odnos ukupnog broja stabala sa određenim morfotipom i ukupnog broja istraživanih stabala (HORTON i BRUNS, 2001), što je prikazano u tabeli 15, kolone 3 i 9.

U odnosu na zastupljenost određenog morfotipa u pojedinačom uzorku korena, određena je relativna zastupljenost morfotipa (BRUNS, 1995) kao:

A-minorna komponenta < 10% svih vrhova korena

B-minorno kodominantna 10-50 % svih vrhova korena

C-većinski kodominantna 50-90% svih vrhova korena

D-dominantna komponenta > 90% svih vrhova korena, što je prikazano u tabeli 15, kolone 4-7 i 10-13.

Frekventnost pojavljivanja određenog taksona u populaciji na osnovu rezultata sekvenciranja prikazana je kao broj sekvenci određenog taksona u odnosu na ukupan broj dobijenih sekvenci za lokalitet (tabela 12 i tabela 13, kolona 9). Za određivanje kvantitativne zastupljenosti određenih taksona na korenu domaćina relevantni su podaci prikazani u tabeli 15.

4.2.3. Morfološko – anatomska karakterizacija korena munike iz prirodnih populacija

Korenovi su pažljivo oprani. Iz svakog uzorka korena izdvojeno je 20-50 (prosečno oko 30-35) mikoriziranih vrhova korenova. Ektomikorizni korenovi su identifikovani na osnovu prisustva omotača, eksternalnih hifa ili rizomorfi i odsustva korenskih dlaka. Morfotipovi su izdvajani i grupisani na osnovu tipa grananja, oblika, boje, teksture, prisustva/odsustva okolnih hifa i rizomorfi, i dodeljena su im deskriptivna imena (RINCON *et al.*, 2001, MENKIS *et al.*, 2005). Za opisivanje makroskopskih karakteristika korišćene su binokularne lupe Biooptica XTL 2400D I Zeiss Discovery .V12 (45-90 X uvećanje. Deo proučavanog materijala je fotografisan.

Procenjena je procentualna zastupljenost pojedinih morfotipova u uzorku korena.

Vrhovi korena za svaki od izdvojenih morfotipova odvajani su u tube od 1,5 ml. Iz svake tube izdvajan je kao reprezent po jedan vrh korena i korišćen za molekularnu analizu.

4.2.4. Molekularna analiza (iztolacija DNK, PCR amplifikacija i sekvenciranje)

Ekstrakcija DNK obavljena je prema CTAB protokolu za ekstrakciju.

Pojedinačni vrhovi korena stavljeni su u tube od 1,5 ml u 0,6 ml 3% CTAB pufera i mrvljeni pomoću mikro tučka. Nakon toga, uzorci su inkubirani na 65 °C u trajanju od 1h. U tube je zatim dodato po 0,6 ml hloroforma (ili hloroform:isoamil 24:1) i centrifugirano 15 minuta na 13 K. Po centrifugiranju, gornja faza je prebačena u novu 1,5 ml tubu. Precipitacija je izvršena sa dvostrukom zapreminom (oko 1 ml) izopropanola. Uzorci su ostavljeni na -20° C minimalno 30 minuta. Nakon centrifugiranja (15 min na 13 K), supernatant (tečnost) je odstranjen iz tube, a DNK je ispran sa 70% etanolom (0,2 ml), osušen i rastvoren u 0,3 ml sterilne ultračiste vode.

Za PCR reakciju su korišćeni prajmer specifičan za gljive- ITS1-F i univerzalni prajmer ITS4. PCR reakcija je izvedena u Applied Biosystem Gene Amp PCR System 2700 thermal cycler. Inicijalna denaturacija DNK obavljena je na 95 °C u trajanju od 5 min. Sledilo je 35 amplifikacionih ciklusa: denaturacija na 95 °C u trajanju od 30 s, aniling (otpuštanja/vezivanja prajmera) na 55 °C za 30 s, i ekstenzije (izduživanja) na 72 °C u trajanju od 45 s. Završno izduživanje DNK lanca obezbeđeno je na 72 °C u trajanju od 7 min.

Radi optimizacije PCR reakcije, korišćene su različite količine DNK po reakciji: 1 µl ekstrakovane DNK/15 µl reakcije, 10 puta razblažena DNK, ili 20 puta razblažena DNK, kao 1 µl DNK/ 15 µl reakcije.

PCR reakcija od 15 µl je sadržala 1 µl DNK (ekstrakovane ili razblažene), 1,5 µl Dream Taq Green Buffer-a (Fermentas, EU), 1,5 µl dNTP, po 0,3 µl oba prajmera, 0,45 µl MgCl₂, 0,08 µl polimeraze (Dream Taq DNA polimerase, Fermentas, EU) i 9,87 µl sterilne ultračiste H₂O.

PCR proizvod je razdvajan na 1% agaroznom gelu, koji je bojen gel zelenom bojom (Gel Green Nucleic Acid Stain, Biotum Inc.) i posmatran pod UV svetlom.

Ukoliko je po uzorku bila zabeležena samo jedna traka DNK (što potvrđuje da je sav DNK u uzorku poreklom samo iz jednog "izvora"-organizma) i ukoliko je jačina signala (debljina trake) bila dobra, PCR proizvod je korišćen za sekvenciranje.

Ukoliko je samo jedna DNK traka bila prisutna u uzorku, ali je bila slaba ili teško vidljiva, rasblažen PCR proizvod je korišćen za reamplifikaciju sa univerzalnim prajmerima ITS1 (umesto ITS1-F) i ITS4, i dobijeni PCR proizvod, sa dobrim trakama, je korišćen za sekvenciranje.

PCR proizvodi koji su imali veći broj traka, ponovo su razdvajani na 1,5% agaroznom gelu. Iz gela su vađeni isecci traka, upotrebom nastavaka za pipete, ili isecanjem. DNK izdvojen iz traka je reamplifikovan upotrebom univerzalnih prajmera ITS1 (umesto ITS1-F) i ITS4, i dobijeni PCR proizvodi (kada bi bila dobijena samo jedna traka¹⁵), su korišćeni za sekvenciranje.

Za uzorke koji nisu dali rezultate upotrebom prethodno opisanog metoda, primenjen je pristup ugnježdenog (nested) PCR-a. Za prvu PCR reakciju korišćeni su prajmeri NLC2 i NSA3. Uslovi PCR reakcije su bili isti kao u reakciji sa prajmerima ITS1 i ITS4, osim što je temperatura anilinga (vezivanja prajmera) bila 68°C. Druga PCR reakcija je izvedena sa prajmerima ITS1F i ITS4 (PERSSON *et al.*, 2009).

Posle ove reakcije pojedini uzorci su izdvojeni za sekvenciranje na isti način kao što je prethodno opisano. Drugi uzorci razdvajani su na agaroznom gelu, reamplifikovani sa prajmerima ITS1 i ITS4, i korišćeni za sekvenciranje.

PCR proizvod je prečišćen i pripremljen za sekvenciranje. Čišćenje PCR proizvoda obavljeno je sa enzimima Exonuclease I (Fermentas, EU) i Skrimp Alkaline Phosphatase (SAP, Fermentas EU), prema uputstvu proizvođača (Exonuclease I-1µl/10µl PCR proizvoda i SAP-2 µl/10 µl PCR proizvoda).

PCR proizvod je sekvenciran u jednom pravcu, korišćenjem prajmera ITS4. Sekvenciranje je obavljeno u Macrogen Inc, Seoul, Korea.

¹⁵ Ponekad je bilo potrebno ponoviti razdvajanje na gelu 2 puta, da bi se dobile čiste trake. Za dobro razdvajanje, potrebna je dugotrajna elektroforeza (10-12 h i slabiji napon 100-120 V)

Oko 380 uzoraka DNK iz 263 korenska završetka je sekvencirano sa lokaliteta Sovrh i oko 150 uzoraka DNK iz 72 uzorka korena sa lokaliteta Kastrat je poslato na sekvenciranje.

Ova istraživanja obavljena su u laboratoriji Odseka za šumsku mikologiju i fitopatologiju Fakulteta za prirodne resurse i poljoprivredne nauke u Upsali, Švedska (Faculty of Natural resources and Agricultural Sciences, Department of Forest Mycology and Plant Pathology, Uppsala).

4.2.5. Korišćeni softverski paketi

Sekvence su manuelno uređene, i analizirane upotrebom softvera SeqMan version 5.01 iz programskog paketa DNASTAR (DNASTAR, Madison, WI, USA) i softvera BioEdit version 7.0.5.2 (Hall, 1999).

Za identifikaciju ITS rDNK sekvenci korišćene su baze podataka GenBank (BENSON *et al.*, 2005) i UNITE (KOLJALG *et al.*, 2005). Kriterijum na osnovu kojeg je donošena odluka o taksonu ili rodu kome pripada određena sekvenca je bio među- i unutarvrstna sličnost ITS sekvence sa sekvencama deponovanim u ove dve baze. Za svaki takson je u ovom slučaju neophodan poseban pristup, jer se širina varijacija ITS regiona razlikuje od vrste do vrste, ili od roda do roda. U većini slučajeva prihvaćeno je da takson određen na nivou vrste, ukoliko podudarnost sa ITS sekvencama u bazama podataka iznosila 98-100%, a na nivou roda ukoliko podudarnost varira između 90 i 97% (MENKIS *et al.*, 2005, NIETO i CARBONE, 2009).

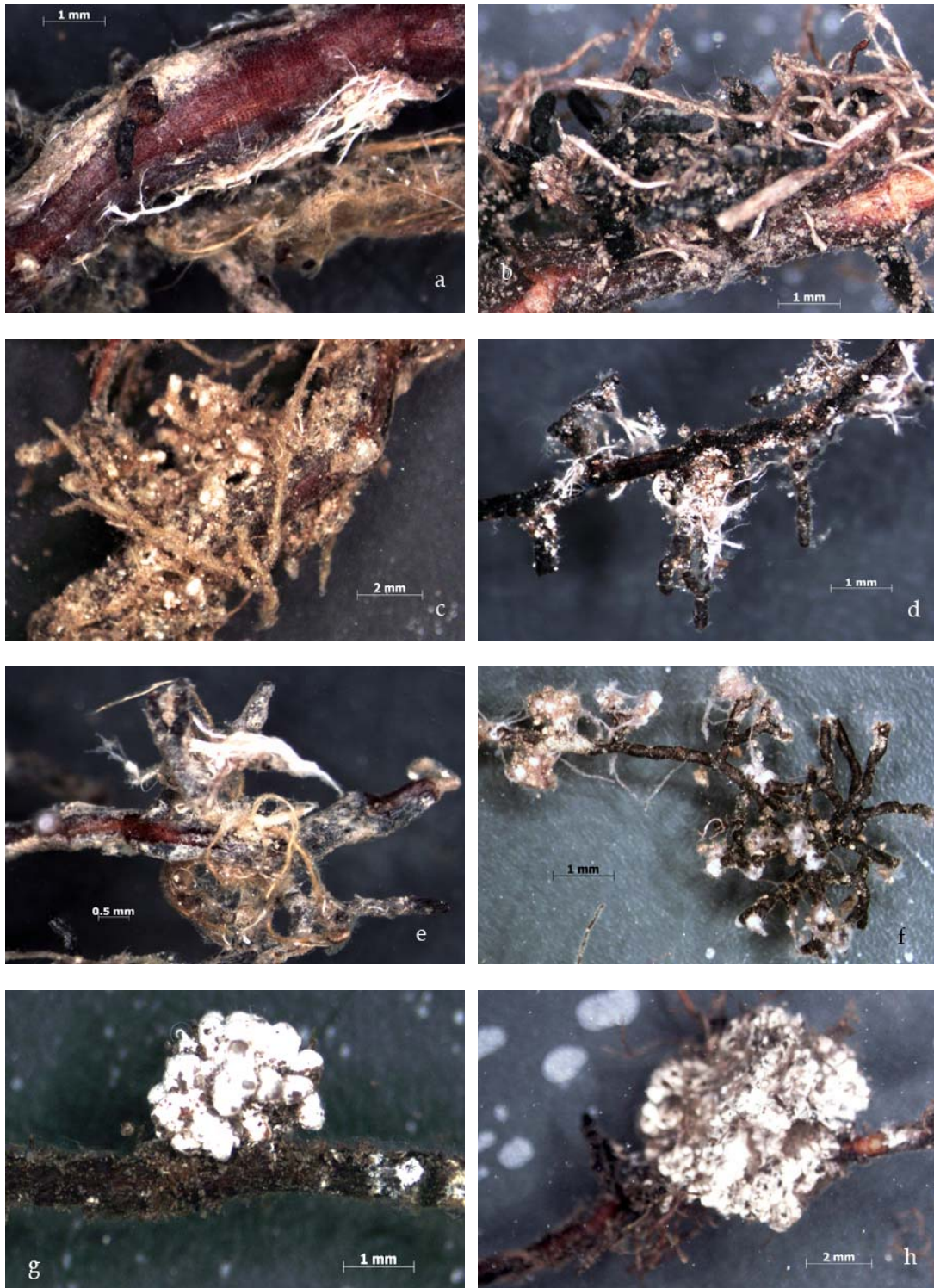
4.3. Rezultati istraživanja

Prikupljeni uzorci korena, zbog karakteristika rasta korena munike, bili su relativno mali (između 20 i 100 cm korena po stablu). Sakupljeni su na dubini do 20 cm zemljišta. Analizirano je preko 900 korenskih završetaka sa lokaliteta Sovrh i preko 400 korenskih završetaka sa lokaliteta Kastrat, koji su predstavljali subuzorak od ukupno sakupljenih korenova, kojih je u glavnom uzorku bilo 1-5 puta više.

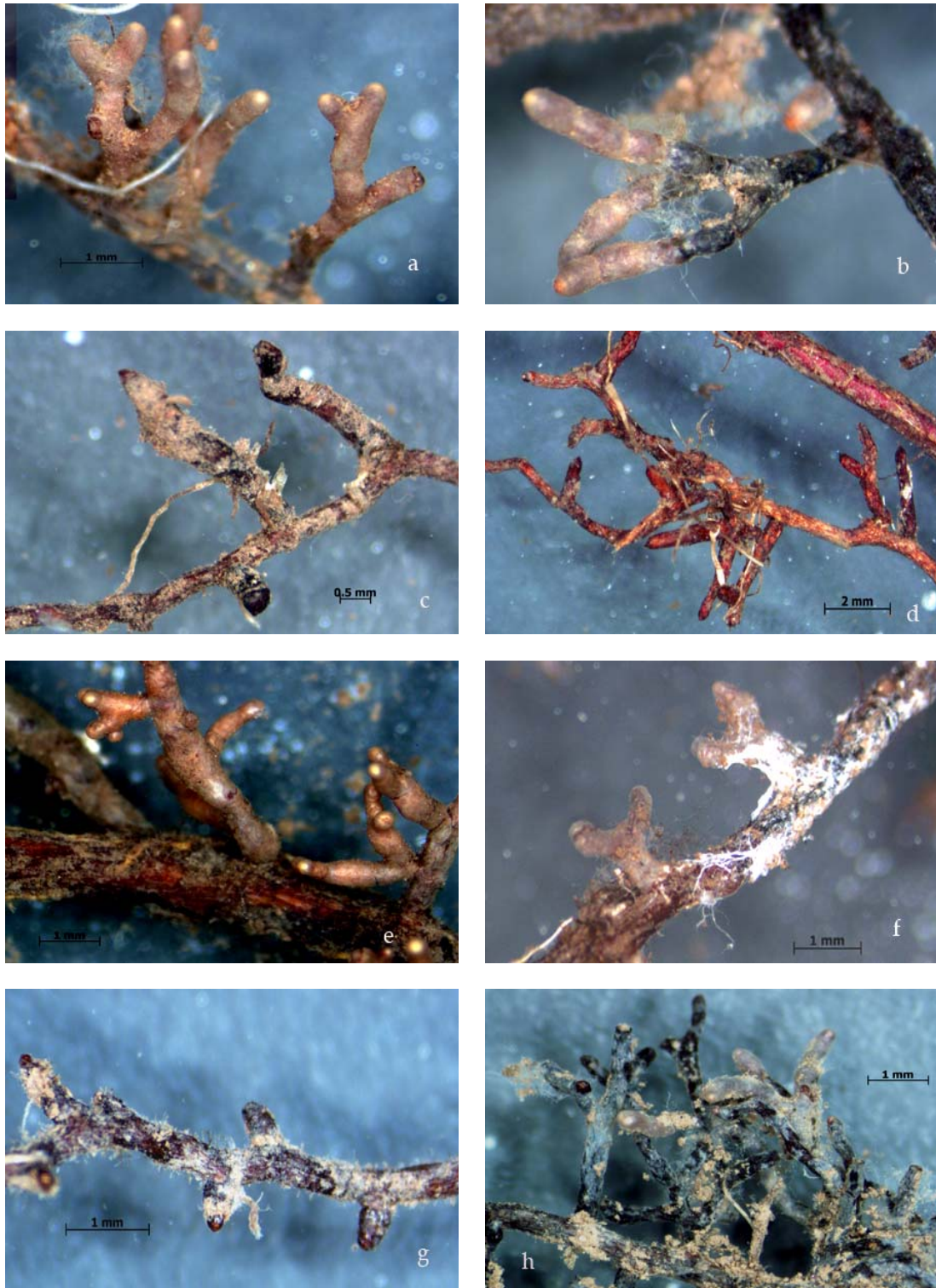
Na uzorcima korena munike izdvojeno je 11 jasno različitih morfotipova (i nekoliko prelazni među-varijanti), iz kojih izolovano 120 taksona gljiva. Kao ECM određeno je 29 taksona, koje su podeljene u 9 taksonomskih grupa. Do ovih 9 taksonomskih grupa, 6 dominira u zajednici, i predstavljeno je različitim morfotipovima.

Tabela 11. Opis dominantnih ektomikoriznih morfotipova na osnovu spoljnih morfoloških karakteristika na lokalitetima Sovrh i Kastrat

morfo-tip	morfologija, boja i površina omotača	emaniraj uće hife	rizomorfe	lokalitet
A - KB	Koraloidni, sa gustim belim omotačem	prisutne, česte	prisutne, tamne, česte	Sovrh
B	Beli višestruko razgranati na dugim drškama	ne	nedostaju	Sovrh
C	Dihotomo razgranati, dugi, sa tankim crnim omotačem	ne	nedostaju	Sovrh, Kastrat
D-KC	Crni, višestruko razgranati u većim ili manjim grupama, gotovo koraloidni	povremen o prisutne	povremene	Sovrh
E	Pravi, nerazgranati, nabrekli, crvenkasti, glatki; parcijalno sa belom micelijom	ne	nedostaju	Sovrh, Kastrat
F	Nerazgranati, zakrivljeni do tortuozno uvijeni gotovo glatki, sa parcijalno razvijenom micelijom	parcijalno prisutne	nedostaju	Sovrh, Kastrat
G	Nerazgranati, dugi, sa tankim crnim omotačem	ne	nedostaju	Sovrh, Kastrat
H	Nerazgranati, dugi, cik-cak izlomljeni, skoro glatki, sa komadićima zemlje	ne	nedostaju	Sovrh, Kastrat
I	Dihotomo višestruko razgranati pod pravim tupim uglom, na kratkoj dršci, sa ili bez vunastog omotača	guste, vunaste, delom nedostaju	većinom prisutne, smeđe	Sovrh
J	crni, dugi, dihotomo razgranati	obilne bele, guste	retko	Sovrh, Kastrat
K-Amph	Dihotomo razgranati, beli ili žuti	obilne, belo-žuto smeđe	obilne, narandasto-smeđe do smeđe	Sovrh, Kastrat



Slika 8. Mikoriza na korenu munike u uzorcima iz prirodnih populacija. Različiti morfortipovi a, c, e- morfortip K (Amph.); b -morfortip D; d -morfortip J; f -morfortipovi I i D; g, h- morfortip A (KB)



Slika 9. Mikoriza na korenu munike u uzorcima iz prirodnih populacija. Različiti morfortipovi a, -morfortip D (LK); b, h- morfortip C; c, g -morfortip F; d -morfortip E.

Tabela 12. Taksoni gljiva sekvencirani iz korena *Pinus heldreichii* sa lokaliteta Sovrh na osnovu najbliže identifikovanih sekvenci iz baza podataka Banke Gena (GenBank) ili UNITE

br.	oznaka	dužina (bp)	najbliže identifikovana vrsta na osnovu BLAST a GenBank i UNITE		pokrivenost (Query)*	identičnost %	ba	frekvencija
1	11-1	560	AJ272410	Suillus granulatus	100	99	GB	13/334
2	11-2	616	AJ272409	Suillus granulatus	100	92	GB	5/334
3	11-3	630	<u>GU016620.1</u>	Suillus bovinus	99	99	GB	4/334
4	11-4	815	<u>JF908761.1</u>	Rhizopogon rocabrunae	97	96	GB	22/334
5	11-5	651	<u>UDB011504</u>	Lactarius sanguifluus	644/644*	100	U	5/337
6	11-6	629	UDB011653	Tricholoma terreum	611/612	99	U	4/337
7	11-7	655	HQ201354.1	Inocybe laetior	91	97	GB	2/337
8	11-8	641	<u>JF908157.1</u>	Inocybe pseudodestructa	99	90	GB	1/337
9	11-9	641	<u>JF908062.1</u>	Hygrocybe persistens	100	99	GB	1/337
10	11-10	515	JN943932	Amphinema byssoides	100	100	GB	1/334
11	11-11	542	<u>JN943914.1</u>	Amphinema sp.	98	99	GB	12/334
12	11-12	643	JN943914	Amphinema sp.	99	82	GB	3/334
13	11-13	580	<u>FJ552806.1</u>	Uncultured Amphinema	100	91	GB	4/334
14	11-14	427	<u>FJ210731.1</u>	Uncultured Cortinarius	99	99	GB	3/334
15	11-15	518	<u>UDB003300</u>	Tomentella fuscocinerea	498/518	97	U	4/334
16	11-16	595	<u>UDB003309</u>	Tomentella cinerascens	539/566	95	U	3/334
17	11-17	604	UDB000260	Tomentella galzinii	538/553	97	U	1/334
18	11-18	641	<u>HQ204743.1</u>	Uncult. Tomentella clon	98	96	GB	3/334
19	11-20	571	<u>UDB003323</u>	Tomentella	536/565	94	U	3/334
20	11-21	652	<u>UDB000029</u>	Pseudotomentella tristis	520/562	92	U	1/334
22	11-22	579	<u>EU668260.1</u>	Uncultured Sebacina	99	99	GB	5/334
23	11-23	548	FJ792845	Uncultured Sebacina	99	99	GB	1/334
24	11-24	528	<u>DQ069001.1</u>	Wilcoxina rehmii	99	99	GB	6/334
25	11-25	571	<u>GU327400.1</u>	Uncultured Wilcoxina	99	99	GB	10/334
26	11-26	511	<u>GU004209.1</u>	Cadophora malorum	99	100	GB	8/334
27	11-27	499	<u>AY664503.1</u>	Cadophora sp.	99	100	GB	2/334
28	11-28	458	AY729938	Lunulospora curvula	99	98	GB	2/334
29	11-29	506	<u>UDB003074</u>	Lachnum brevopilosum	89	96	U	2/334
30	11-30	468	HM036602	Neonectria macrodidyma	99	99	GB	2/334
31	11-31	429	GU479904	Neonectria radicola	99	99	GB	1/334
32	11-32	457	<u>JF735314.1</u>	Neonectria ramulariae	99	99	GB	1/334
33	11-33	457	UDB011457	Sclerotinia tuberosa	436/452	96	U	1/334
34	11-34	517	<u>GU566258.1</u>	Davidiella tassiana	99	99	GB	1/334
35	11-35	521	<u>EU918706.1</u>	Chaetomium globosum	99	99	GB	1/334
36	11-36	486	HQ829070.1	Coniochaeta sp.	99	99	GB	1/334

br.	oznaka	dužina (bp)	najbliže identifikovana vrsta na osnovu BLAST a GenBank i UNITE		pokrivenost (Query)*	identičnost %	ba	frekvencija
37	11-37	291	FR839631.1	<i>Pichia pastoris</i>	100	94	GB	1/334
38	11-38	450	AB470835.1	<i>Dothiorella gregaria</i>	100	99	GB	2/337
39	11-39	528	HM589356	<i>Phoma</i> sp.	100	98	GB	1/334
40	11-40	452	GU004210.1	<i>Phoma herbarum</i>	99	99	GB	2/334
41	11-41	467	DQ093752.1	<i>Chalara microchona</i>	99	98	GB	1/334
42	11-42	495	HQ115727.1	<i>Cladosporium langeronii</i>	99	98	GB	6/334
43	11-43	511	JN650537.1	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	100	100	GB	2/334
44	11-44	482	JN033481.1	<i>Cladosporium perangustum</i>	99	99 %	GB	1/334
45	11-45	464	EF679388.1	<i>Cladosporium spinulosum</i>	99	99	GB	1/334
46	11-46	458	HQ829067.1	<i>Cladosporium</i> sp.	100	99	GB	6/334
47	11-47	501	AY373928	<i>Penicillium restrictum</i>	100	99	GB	5/334
48	11-48	462	GU092963.1	<i>Penicillium arenicola</i>	99	87	GB	2/334
49	11-49	504	HQ607929.1	<i>Penicillium canescens</i>	99	99	GB	1/334
50	11-50	518	HQ442348.1	<i>Penicillium roqueforti</i>	99	99	GB	1/334
51	11-51	389	DQ093771	<i>Tetracladium maxilliforme</i>	97	94	GB	1/334
52	11-52	473	FJ205463.1	<i>Tetracladium marchalianum</i>	98	97	GB	1/334
53	11-53	531	EU883432.1	<i>Tetracladium furcatum</i>	99	99	GB	1/334
54	11-54	465	GU055653.1	<i>Tetracladium</i> sp	99	99	GB	1/334
55	11-55	460	GU327474	Uncultured <i>Tetracladium</i>	100	99	GB	1/334
56	11-56	425	EU344982.1	<i>Claviceps purpurea</i>	98	99	GB	1/334
57	11-57	515	EU886744	<i>Simplicillium lamellicola</i>	99	99	GB	1/334
58	11-58	489	JF440584541	<i>Aureobasidium pullulans</i>	100	92	GB	1/334
59	11-59	573	HQ631063.1	<i>Exophiala</i> sp.	99	95	GB	2/334
60	11-60	300	EF060894	<i>Saccharomycetales</i> sp.	99	91	GB	1/334
61	11-61	482	HQ115661	<i>Geomyces pannorum</i>	100	99	GB	10/334
62	11-62	570	JF439489.1	<i>Mortierella</i> sp.	99	99	GB	1/334
63	11-63	559	HQ637326	<i>Mortierella</i> sp	100	94	GB	1/334
64	11-64	367	FM178369.1	<i>Metschnikowia agaves</i>	98	90	GB	8/334
65	11-65	502	DQ490623.1	<i>Hemimycena gracilis</i>	96	94	GB	1/334
66	11-66	572	JF340282.1	<i>Fomitopsis pinicola</i>	100	98	GB	1/334
67	11-67	648	UDB011433	<i>Panellus serotinus</i>	641/642	99	U	2/334
68	11-68	669	GQ892801.1	<i>Strobilurus esculentus</i>	99	98	GB	
69	11-69		AY302527.1	<i>Wallemia muriae</i>	96	96	GB	1/334
70	11-70	560	AF145324.1	<i>Cryptococcus aerius</i>	100	99	GB	3/334

br.	oznaka	dužina (bp)	najbliže identifikovana vrsta na osnovu BLAST a GenBank i UNITE		pokrivenost (Query)*	identičnost %	ba	frekvencija
71	11-71	584	FR717868.1	Cryptococcus macerans	97	97	GB	1/334
72	11-72	460	HQ445477	Uncultured fungus clone	99	96	GB	2/334
73	11-73	466	GU122898	Uncultured fungus clone	96	89	GB	1/334
74	11-74	463	GQ921746	Uncultured fungus clone	100	99	GB	1/334
75	11-75	544	GQ921791.1	Uncultured fungus clone	92	99	GB	1/334
76	11-76	455	AY805600	Ascomycete sp.	96	95	GB	1/334
77	11-77	469	HQ649827	Pleosporales sp.	100	99	GB	1/334
78	11-78	399	EF619741	Uncultured Pleosporales	100	96	GB	1/334
79	11-79	514	HM208715	Pyrenochaeta sp	100	97	GB	1/334
80	11-80	395	AF476985	Ectomycorrhizal root tip	100	100	GB	1/334
81	11-81	567	B636468	Uncult. ectomycorrhizal f.	99	95	GB	1/334
82	11-82	526	AB636468.1	Uncult. ectomycorrhizal f.	99	98	GB	1/334
83	11-83	469	EU326174	Uncult.ectomycorrhiza (Helotiales)	99	98	GB	1/334
84	11-84	488	JF748081.1	Uncultured Helotiales	100	99	GB	1/334
85	11-85	452	AY345353.1	Ectomycorrhizal isolate (Helotiales)	100	96	GB	1/334
86	11-86	498	FJ378851.1	Uncultured Helotiales	100	99	GB	(2)/334
87	11-87	510	DQ182461.1	Uncult. sordariomycete	98	99	GB	8/334
88	11-88	496	DQ182427.1	Uncultured Helotiales	100	96	GB	6/334
89	11-89	546	DQ182444	Uncultured ascomycete	99	98	GB	1/334
90	11-90	365	FM177652.1	Uncult. compost fungus	100	100	GB	13/334
91	11-91	367	EU754984.1	Uncult. Saccharomycetales	100	99	GB	1/334
92	11-92	568	FJ553582	Uncult. Agaricomycetes	99	99	GB	1/334
93	11-93	526	DQ672274	Uncult. soil basidiomycete	96	94	GB	1/334
94	11-94	469	AM901765	Uncult. basidiomycete	100	94	GB	1/334
95	11-95	658	AM901732	Uncultured basidiomycete	100	99	GB	2/334
Neidentifikovane sekvence								
1	11-155	330	FJ824641	Uncultured Ascomycota	97	96	GB	1/334
2	11-156	623	EF635664	Uncultured fungus clone	84	90	GB	
3	11-157	498	DQ309137	Uncultured fungus isolate	71	89	GB	2/334
4	11-158	468	DQ182449	Uncultured ascomycete	96	89	GB	1/334
5	11-159	618	UDB003048	Trichopezizella relicina	5e-37	zak	U	1/334
6	11-160	637	EF635819	Uncultured fungus clone	35	92	GB	1/334
7	11-161	585	FR682335	Uncult. fungus DNA	97	87	GB	1/334
8	11-162	500	UDB000989	Trichophaea gregaria	e-117	zak	U	1/334
9	11-163	554	JF440621.1	Trichophaea hybrida	94	79	GB	1/334

br.	oznaka	dužina (bp)	najbliže identifikovana vrsta na osnovu BLAST a GenBank i UNITE		pokrivenost (Query)*	identičnost %	ba	frekvencija
10	11-164	523	UDB003037	Crocicreas furvum	0.0	zak	U	1/334
			UDB003071	Pyrenopeziza millegrana	0.0	zak	U	1/334
11	11-165	534	UDB003038	Mollisia benesuada	1e-77	zak	U	1/334
12	11-166		EF635808.1	Uncultured fungus clone	92	99	GB	1/334
13	11-167	515	HQ115717.1	Devriesia sp.	75	86	GB	1/334
14	11-168	499	HQ115717.1	Devriesia sp	77	86	GB	1/334
15	11-169	472	HM044593	Uncult. Pyronematacea	100	81	GB	1/334
16	11-170	626	EF635664.1	Uncultured fungus clone	86	90	GB	1/334
17	11-171	499	JF748081.1	Uncultured Helotiales	98	77	GB	1/334
18	11-172	492	GU055726	Uncult. Helotiales clone	99	90	GB	1/334
19	11-173	505	FJ554104.1	Uncult. Pezizomycotina	64	83	GB	1/334
20	11-174	530	AY664503	Cadophora sp.	76	89	GB	1/334
21	11-175	652	DQ494379.1	Vermispora fusarina	41	76	GB	1/334
22	11-176	667	JF519259.1	Uncultured Alatospora	82	70	GB	1/334
23	11-177	619	EU041818.1	Veronaea japonica	87	94	GB	1/334
24	11-178	485	FR839631.1	Pichia pastoris	81	90	GB	1/334
25	11-179	503	JN225916	Diaporthales sp.	73	83	GB	1/334
26	11-181	569	EU883432.1	Tetracladium furcatum	96	92	GB	1/334
27	11-182	471	AB478857	Rhodotorula arctica	85	89	GB	1/334
28	11-183	573	FJ210642.1	Sporobolomyces sp.	91	81	GB	1/334
29	11-184	456	HQ211502.1	Uncult. Cryptococcus	96	86	GB	1/334
30	11-185	566	FN550902.1	Inocybe	40	89	GB	1/334
31	11-186	536	JN133918.1	Amphinema sp.	99	83	GB	1/334
32	11-187	544	GU998316.1	Uncultured Dermocybe	87	82	GB	1/334
33	11-188	614	FN391358.1	Uncultured fungus	71	81	GB	1/334
34	11-189	646	GQ512172.1	Uncultured fungus	10	80	GB	1/334

* za podatke iz Unite nije data već identičnost izražena kao broj baznih parova, ba- baza podataka, frekvencija- frekvencija pojavljivanja u ukupnom broju obrađenih sekvenci; zak- zaključane sekvence u UNITE bazi, u koloni pokrivenost kod zaključanih sekvenci prikazana E value.

Tabela 13. Taksoni gljiva sekvencirani iz korena *Pinus heldreichii* sa lokaliteta Kastrat, na osnovu najbliže identifikovanih sekvenci iz baza podataka Banke Gena (GenBank) ili UNITE

br	oznak a	du. (bp)	najbliže identifikovana vrsta na osnovu BLAST a GenBank i UNITE	pokriv.* (Query)	I %	BP	frekv.	
1	11-96	683	<u>UDB011205</u>	Russula firmula	570/571	99	U	3/128
2	11-97	645	<u>UDB001634</u>	Russula sanguinea	623/627	99	U	1/128
3	11-98	492	<u>JN944008.1</u>	Russula laricina s	99	99	GB	1/128
4	11-99	494	<u>UDB011333</u>	Russula nauseosa	454/489	92	U	2/128
5	11-100	657	<u>AF249289.1</u>	Lactarius sanguifluus	100	100	GB	2/128
6	11-101	644	<u>UDB000923</u>	Lactarius sanguifluus	<u>0.0</u>	90	U	1/128
7	11-102	613	<u>UDB000664</u>	Suillus sp. (variegatus)	491/510	96	U	1/128
8	11-103	526	<u>JN943914.1</u>	Amphinema sp. 8	99	99	GB	16/128
9	11-105	530	<u>JN943925.1</u>	Amphinema sp. 7	98	97	GB	1/128
10	11-106	511	<u>JN943898.1</u>	Amphinema sp. 3	100	91	GB	1/128
11	11-107	524	<u>FN565232.1</u>	Uncult. Atheliaceae	100	97	GB	4/128
12	11-108	488	<u>AF272917.1</u>	Tomentella badia	98	96	GB	2/128
13	11-109	636	<u>JF419515.1</u>	Uncult. Tomentella	99	96	GB	1/128
14	11-110	708	<u>EU668254.1</u>	Unc.	99	96	GB	1/128
15			<u>UDB000029</u>	Pseudotomentella	Pseudotomentella tristis	558/593	94	
	11-111	542	<u>DQ520095.1</u>	Sebacina incrustans	100	99	GB	2/128
16	11-112	558	<u>HQ154273.1</u>	Uncultured Sebacina	100	99	GB	2/128
17	11-113	529	<u>HM190136.1</u>	Phialocephala fortinii	99	99	GB	4/128
18	11-114	466	<u>EU103612.1</u>	Phialocephala helvetica	100	99	GB	8/128
19	11-115	488	<u>UDB003074</u>	Lachnum brevipilosum	<u>0.0</u>	zak	U	1/128
20			<u>FJ440910.1</u>	Uncult. Lachnum	99	99	GB	
	11-116	475	<u>UDB003073</u>	Albotricha acutipila	<u>0.0</u>	zak	U	1/128
21	11-117	500	<u>AF444292.1</u>	Rhodotorula pinicola	100	99	GB	1/128
22	11-118	498	<u>AY302527.1</u>	Wallemia muriae	98	99	GB	1/128
23	11-119	667	<u>EU400587.1</u>	Malassezia restricta	99	99	GB	7/128
24	11-120	741	<u>AJ437693.1</u>	Malassezia globosa	94	98	GB	1/128
25	11-121	544	<u>JN622200.1</u>	Cryptococcus magnus	99	100	GB	1/128
26	11-122	441	<u>HQ909095.1</u>	Cryptococcus flavescens	99	99	GB	2/128
27	11-123	559	<u>AY038836.1</u>	Mrakia sp	100	99	GB	2/128
28	11-124	486	<u>JN689348.1</u>	Aspergillus versicolor	99	99	GB	1/128
29	11-125	472	<u>JN650537.1</u>	Cladosporium cladosporioides	99	100	GB	1/128
30	11-126	449	<u>HQ871874.1</u>	Cladophialophora chaetospira	100	91	GB	1/128
31	11-127	501	<u>DQ068981.1</u>	Uncultured Chalara	100	96	GB	1/128

br	oznak a	du. (bp)	najbliže identifikovana vrsta na osnovu BLAST a GenBank i UNITE	pokriv.* (Query)	I %	BP	frekv.	
32	11-128	484	HQ540688.1	Davidiellaceae sp.	100	99	GB	1/128
33	11-129	175	EU343337.1	Davidiella tassiana	98	90	GB	1/128
34	11-130	518	GU327463.1	Uncultured Exophiala	99	96	GB	1/128
35	11-131	561	AY213652.1	Exophiala salmonis	99	96	GB	1/128
36	11-132	549	GU566300.1	Fusarium sp.	100	99	GB	1/128
37	11-133	472	FJ441013.1	Fusarium redolens	100	100	GB	1/128
38	11-134	476	HM214449.1	Neonectria macrodidyma	100	99	GB	4/128
39	11-135	509	HQ738282.1	Penicillium sp.	97	90	GB	1/128
40	11-136	541	GQ169323.1	Sagenomella humicola	97	99	GB	1/128
41	11-137	579	HM176575.1	Trichoderma atroviride	99	100	GB	2/128
42	11-138	573	HQ630362.1	Mortierella elongata	100	90	GB	1/128
43	11-139	627	AB636451.1	Uncult. Tricholoma	99	99	GB	3/128
44	11-140	610	JF519051.1	Unc. Tricholomataceae	99	95	GB	1/128
45	11-141	544	FJ210731.1	Uncult. Cortinarius	99	95	GB	1/128
46	11-142	605	HM021161.1	Uncult. Cantharellaceae	93	98	GB	1/128
47	11-143	362	FM177652.1	Uncult. compost fungus	100	100	GB	6/128
48	11-144	464	DQ182427.1	Uncultured Helotiales	99	99	GB	2/128
49			UDB003048	Trichopezizella relicina	e-141	zak	U	
	11-145	495	HQ211892.1	Uncult. sordariomyceta	99	96	GB	1/128
50	11-146	476	JF519272.1	Uncult. Trichocladium	99	100	GB	1/128
51	11-147	487	GU055705.1	Uncult. Tetracladium	100	98	GB	1/128
52	11-148	583	JF691234.1	Uncult. Trechisporales	99	96	GB	1/128
53	11-149	507	HQ211892.1	Uncult. sordariomyceta	100	97	GB	1/128
54	11-150	449	DQ182449.1	Uncultured ascomycete	100	95	GB	1/128
55	11-151	500	FJ553268.1	Uncult. Herpotrichiellaceae	99	93	GB	1/128
56	11-152	503	JF449746.1	Uncult. Auriculariales	98	92	GB	1/128

br	oznak a	du. (bp)	najbliže identifikovana vrsta na osnovu BLAST a GenBank i UNITE	pokriv.* (Query)	I %	BP	frekv.	
57	11-153	560	JF519497.1	Uncul.Leptodontidium	100	87	GB	1/128
58	11-154	539	EF635664.1	Uncult. fungus clone	96	92	GB	1/128
neidentifikovane sekvence								
1	11-190	557	UDB003005	Niptera dilutella	1e-83	zak	U	1/128
			GQ219956.1	Uncult. Cadophora	94	88	GB	
2	11-191	581	EU784342.1	Hygrocybe psittacina	100	86	GB	4/128
3	11-192	548	UDB011726	Russula atroglauc	106/112	94	U	1/128
4	11-193	557	HQ871874.1	Cladophialophora chaetospira	98	93	GB	1/128
5	11-194	523	UDB011577	Clavulinopsis corniculata	466/514	90	U	1/128

Tabela 14. Broj dobijenih sekvenci i vrsta gljiva dobijen iz korena munike nakon ekstrakcije DNK sa lokaliteta Sovrh i Kastrat.

	Lokalitet Sovrh		Lokalitet Kastrat	
	broj sekvenci	broj vrsta	broj sekvenci	broj vrsta
ektomikorizne gljive	143	29	54	21
neektomikorizne Basidiomikota	10	6	16	8
neektomikorizne Ascomycota	77	27	19	14
Zigomycota	0	0	1	1
identifikovane u Banci gena	57	24	21	13
neidentifikovane	47	34	17	12
ukupno	323	120	123	69

Izolacijom iz pojedinačnih vrhova korena izolovano je 1-4 taksona gljiva, što u proseku iznosi 1,34 takson na lokalitetu Sovrh, i 1,97 takson na lokalitetu Kastrat po jednom vrhu korena.

Izolacijom iz korena munike prikupljenog na lokalitetu Sovrh izolovano je 119 taksona gljiva. Do toga su 29 taksona ektomikorizni. Na ovom, kao i na ovakvom tipu staništa do sada nije zabeležena fruktifikacija gljiva. Ostale izolovane gljive predstavljaju epifite korena, ili gljive koje se uobičajeno javljaju u rizosferi.

Rezultati sprovedenih istraživanja pokazuju da u sastav ektomikoriznih zajednica munike na lokalitetu Sovrh¹⁶ čine vrste iz rodova *Suillus* (3 taksona), *Rhizopogon* (1 takson), *Amphinema* (5 taksona), *Tomentela* (5), *Pseudotomentella* (1), *Willcoxina* (2 taksona), *Sebacine* (2 taksona), *Lactarius* (1 taxon), *Tricholoma* (1 taxon), *Inocybe* (2 taksona). Mikorizne su verovatno i neke vrste iz grupe “identifikovane u Banci Gena (GenBank)”, kao i neke od neidentifikovanih vrsta bliske sa askomikotama (*Pezizales*, Pleosporales).

Suillus taksoni javljaju se na 10/35 (0,296) stabala, većinom (6¹⁷) kao minorno kodominantna komponenta zajednice, ili kao većinski kodominantna komponenta zajednice pojedinačnih korenova (4).

Rhizopogon sp. se javlja na 10/35 (0,296) stabala, kao većinski kodominantna (6), dominantna (1), ili minorno kodominantna (3) komponentna zajednice.

Amphinema taxoni (5¹⁸) javljaju se na 18/35 (više od 50%) stabala, kao većinski kodominantna (9), dominantna (1) ili minorno kodominantna (7) komponenta zajednice

Willcoxinia taksoni javljaju se na 11/35 stabala, a *Tomentella* na 10/35 stabala. *Lactarius*, *Sebacine*, *Tricholoma* i *Inocybe* taxoni javljaju se na po dva stabla. Sve ove gljive javljaju se kao minorno kodominantne osim *Sebacine* i *Inocybe* koje se javljaju kao minorne.

U grupi identičnih sa neidentifikovanim sekvencama iz Banke Gena, veliki broj neidentifikovanih sekvenci koje se nalaze u Banci Gena izolovano je iz mikoriznih korenova iz različitih domaćina, ali iz veoma sličnih ekoloških uslova, kao što je suvi mediteranski klimat na krečnjacima, ili manje često hladni visokoplaninski klimati siromašni u hranljivim materijama.

U grupi neidentifikovanih vrsta prisutne su sekvence Ascomycota (prvih 17 neidentifikovanih, koje izgleda da mogu da predstavljaju sekvence ektomikoriznih vrsta. One pokazuju relativnu bliskost sa sekvencama nekih pretpostavljeno ektomikoriznih *Pyrenemataceae* i *Pezizaceae*-a.

¹⁶ sipar, jako kamenito zemljište, preko 90% učešće skelet, i bez akumuliranog sloja četina-stelje

¹⁷ broj u zagradi je broj stabala na kojima je *Suillus* određen kao minorno kodominantan.

¹⁸ 4 *Amphinema* i 1 *Cortinarius* taxon

Na lokalitetu Kastrat dominiraju *Amphinema* (4) taksoni, a osim njih ektomikoriznu zajednice u čine *Tomentella* (2), *Pseudotomentella* (1), *Sebacine* (2), *Suillus* (1), *Russula* (3), *Lactarius* (3), kao i neidentifikovani *Tricholoma* (2), *Cortinarius* (1) i *Chantarellaceae* taksoni (1).

Amphinema taxoni (4) javljaju se na 10/14 (0,71) stabala, kao kodominantna komponenta zajednice.

Tomentella taxoni (2) javljaju se na 3/14 (0,265) stabala kao minorno kodominantna ili minorna komponenta zajednice, dok se *Sebacine* (2) javlja na 2/14 stabala, kao minorno kodominantna komponenta uzorka korena. Osim toga *Lactarius* (3), *Russula* (3), *Tricholoma* (3) taksoni su zabeleženi na po 3/14 stabala kao minorno kodominantna ili minorna komponenta zajednice, a *Chantarellaceae* (1) na 1/14, kao minorna komponenta zajednice.

Na lokalitetu Kastrat, u grupi identičnih sa neidentifikovanim sekvencama iz Banke Gena, ima 6 potencijalno ektomikoriznih vrsta, a među neidentifikovanim vrstama se nalaze 4 takve sekvence.

Tabela 15. Zastupljenost morfortipa, u odnosu na lokalitet i obilnost javljanja pojedinih morfortipova u pojedinačnim uzorcima korena na lokalitetima Sovrh i Kastrat (A-minorna komponenta u uzorku, B-minorno kodominantna, C -većinski kodominantna, D-dominantna komponenta)

morfortip	Lokalitet Sovrh						Lokalitet Kastrat					
	N sq	zastup.	obilnost u uzorku				N sq	frek.	obilnost u uzorku			
			A	B	C	D			A	B	C	D
<i>Suillus</i>	22	10/35	-	6	4	-	1	1/14	1	-	-	-
<i>Rhizopogon</i>	20	10/35	-	3	6	1	-	-	-	-	-	-
<i>Amphinema</i>	23	18/35	1	7	9	1	5	10/14	-	-	10	-
<i>Tomentella</i>	5	10/35	1	8	1	-	2	3/14	1	2	-	-
<i>Pseudotomentela</i>	1	1/35	1	-	-	-	1	2/14	-	2	-	-
<i>Willcoxina</i>	5	11/35	4	7	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sebacina</i>	2	2/35	2	-	-	-	2	-	-	-	-	-
<i>Lactarius</i>	1	3/35	-	3	-	-	3	3/14	1	2	-	-
<i>Russula</i>	-	-	-	-	-	-	3	3/14	2	1	-	-
<i>Tricholoma</i>	1	2/35	-	2	-	-	2	3/14	2	1	-	-
<i>Inocybe</i>	2	2/35	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cortinarius</i>	-	-	-	-	-	-	1	1/14	1	-	-	-
<i>Chantarellaceae</i>	-	-	-	-	-	-	1	1/14	1	-	-	-

4.4. Diskusija

Dosadašnjim istraživanjima u šumama munike je na osnovu prikupljanja plodonosnih tela, zabeležen je 21 takson pretpostavljeno ektomikoriznih gljiva. To su od Ascomycota *Peziza nivalis*, a od Basidiomycota: *Cortinarius vitelinus*, *Hebeloma radicosum*, *Hygrophorus glyocyclus*, *H. hypothejus*, *Laccaria amethystina*, *Tricholoma batschii*, *T. imbricatum*, *T. terreum* (3), *Scleroderma bovista*, *Chroogomphus rutilus*, *Rhizopogon roseolus* (syn. *R. vulgare*), *Suillus collinitus*, *S. granulatus*, *Clavulina rugosa*, *Gomphus clavatus*, *Lactarius deliciosus*, *L. sanguifluus*, *L. semisanguifluus*, *Russula sanguinaria*, *Thelephora atra*, *T. penicillata* i *T. terrestris*.

Molekularna analiza korena dala je precizne i nove informacije o sastavu ektomikorizne zajednice munike na dva lokaliteta i omogućila je da se dokumentuje podzemni diverzitet ektomikoriznih zajednica munike na nivou vrste, ili grupe vrsta u okviru roda. Ovo je urađeno na dva lokaliteta, koji se značajno razlikuju u razvijenosti zemljišta.

Kombinacija morfoloških i molekularnih tehnika može da omogući dobar uvid u ektomikorizne zajednice. Morfološka proučavanja verovatno podcenjuju diverzitet ektomikoriznih zajednica, što je potvrđeno i ovim istraživanjima, jer su iz pojedinačnih vrhova korena izolovane 1-4 gljive, od toga 1-2 ektomikorizne vrste. Osim toga iz 11 jasno odvojenih morfotipova, od kojih 2-3 dominiraju ektomikoriznim zajednicama, izolovano je, na lokalitetu Kastrat, najmanje 29 ektomikoriznih taksona. Osim toga, pojedini taksoni gljiva (*Rhizopogon*, *Suillus*, *Tricholoma*) izolovani su iz različitih mikoriznih morfotipova.

Istraživanja MENKIS *et al.* (2005) takođe potvrđuju da se u jednom vrhu korena sadnica belog bora ili smrče nalazi više taksona gljiva, kao i da pojedinačni taksoni gljiva mogu da budu izolovani iz različitih mikoriznih morfotipova. Zbog sličnosti u morfologiji kod različitih taksona gljiva, upotreba morfo-anatomskog opisivanja (morfotajping) i molekularnih metoda može dovesti do kontradiktornih rezultata u determinaciji ektomikoriznog diverziteta gljiva kod borova (MENKIS *et al.*, 2005; NIETO i CARBONE, 2009).

Iako morfološka karakterizacija verovatno podcenjuje diverzitet ektomikoriza smatra se da ona omogućava uvid u retke morfotipove koji mogu da se ispuste ili ne amplifikuju molekularnim metodama, dok molekularna analiza većinom određuje tačnost morfotajpinga i obezbeđuje uvid u varijacije unutar i između morfotipova. Slabo kolonizovani vrhovi korena sa tankim omotačem su problematični kako za morfološko opisivanje, tako i za molekularnu amplifikaciju. Na osnovu molekularne analize oni, ipak, mogu da se potvrde (BRUNS *et al.*, 2002).

Na kraju, treba imati u vidu da, iako molekularna analiza povećava mogućnost razdvajanja za određene morfotipove i pruža uvid u veliki broj taksona prisutnih na korenu, veliki broj opisanih morfotipova, još uvek nije identifikovan na molekularom nivou. (TEDERSOO *et al.*, 2010).

Na ekstremno kserotermnom staništima, sa inicijalnim fazama razvoja zemljišta, koje predstavlja lokalitet Sovrh, do sada nije zabeležena fruktifikacija gljiva osim pojave nekih *Pezizales* u rano prolećnom aspektu u vreme topljenja snega, na siparištima u visokoplaninskom pojasu bukve (Perić B., usmena komunikacija). Na ovakvom staništu munika ima karakter pionirske šumske zajednice (BLEČIĆ i LAKUŠIĆ, 1969).

Zbog toga podaci dobijeni analizom korena munike sa ovih staništa predstavljaju nove podatke sa aspekta upoznavanja mikoriznih zajednica munike, a u širem kontekstu to predstavlja upoznavanja pionirskih i ekstremno kserotermnih mikoriznih zajednica na krečnjacima. S obzirom na reliktni i (sub) endemični karakter munike, od zajednice simbiotskih gljiva takođe se mogu očekivati nekakve specifičnosti u smislu sastava vrsta.

Lokalitet Kastrat predstavlja klimatogenu zajednicu munike, na relativno zaravnjenom platou (sa padinama nagiba do 30 %, sa dobro razvijenim zemljištem -smeđe zemljište na krečnjacima). Međutim, razvijenost zemljišta lokalno dosta varira. Na lokalitetu Kastrat obrađen je manji broj uzoraka (14 stabala), sa ciljem da se utvrdi da li postoji razlika u sastavu i strukturi ektomikorizne zajednice u odnosu na lokalitet Sovrh.

Ektomikorizne zajednice munike na dva lokaliteta sa prvenstveno različito razvijenim zemljištem se razlikuju po sastavu i strukturi.

Osnovna razlika između ove dve zajednice je što na lokalitetu Kastrat na uzorcima korena nisu zabeleženi morfotipovi karakteristični za *Rhizopogon* i *Suillus*, čije prisustvo je značajno u uzorcima sa lokaliteta Sovrh. *Willcoxina*, kao ni *Inocybe* taksoni nisu zabeležene na lokalitetu Kastrat, a javljaju se *Russula* i *Cantarellaceae*, koje na Sovrhu nisu zabeležene. Procentualno učešće *Tricholoma* i *Lactarius* taksona u ektomikoriznoj zajednici veće je na lokalitetu Kastrat.

Istraživanja na ovom, ili sličnim lokalitetima treba nastaviti radi dobijanja potpunije slike o ektomikoriznim zajednicama u ovim ekosistemima. Postavlja se takođe pitanje o ektomikoriznim zajednicama koje se javljaju na *Juniperus nana* u ovim šumskim ekosistemima, i njihovoj ulozi i značaju za muniku.

Diverzitet gljiva može biti razmatran na nekoliko različitih nivoa. Na globalnom nivou, procenjuje se da ima 5000-6000 vrsta ECM gljiva (TEDERSON *et al.*, 2010, poglavlje 1). Na nivou pojedinačne vrste drveta, TRAPPE (cit. BURNS, 1995) procenjuje da *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco formira ektomikorize sa preko 2000 vrsta gljiva u prirodnim zajednicama. Ovako veliki broj ECM simbionata je kod duglazije posledica velikog geografskog rasprostranjenja, kao i velikog broja različitih šumskih zajednica u kojima se duglazija javlja. Kada se šumska zajednica posmatra na lokalnom nivou, smatra se da je diverzitet vrsta i dalje visok kada se broj vrsta kreće od 13-35 za površine oko 0,1 ha.

Dosadašnja istraživanja diverziteta ektomikoriznih gljiva u monodominantnim šumama borova, na malim površinama (oko 0,1-0,15 ha) pokazuju da se broj ektomikoriznih gljiva kreće između 13-35.

U 55 godina staroj kulturi *Pinus sylvestris* zabeleženo je 13 vrsta ektomikoriznih gljiva (RICHARDSON, 1970, cit. BURNS, 1995), a 34-35 vrsta u 16-20 god starim plantažama *Pinus taeda* L. (CIBULA i OVERBO, 1988, cit. BURNS, 1995) na osnovu nedeljnog praćenja pojave plodonosnih tela u više uzastopnih godina. U prirodnim šumama *Pinus banksiana* Lamb. zabeleženo je 34 vrste izolacijom iz mikoriznih korenova (DANIELSON, 1984, cit BURNS, 1995), dok je u prirodnim šumama *Pinus muricata* D.Don

na osnovu PCR iz mikoriznih korenova i praćenja pojave plodonosnih tela, zabeleženo 23 vrste (GARDES i BRUNS, 1996).

LANDERWEERT *et al.* (2005) su na korenu 2-3 godišnjih *P. sylvestris*, koji raste na peščanim nasipima izolovali 11 ECM taksona, dok su NIETO i CARBONE (2009) iz ektomikorize 5 godina starog *Pinus pinaster* Aiton izolovali 2 askomicete i 15 basidiomiceta (kao najfrekventnija zabeležena je *Tomentella subliliacina*).

U šumama *Pinus albicaulis* Engelm., koji formira gornju granicu šume u ekosistemu Jelouston u Severnoj Americi, na osnovu pojave sporokarpa zabeleženo je 32 taksona, dok je na korenu zrelih stabala potvrđeno prisustvo 19 ECM taksona (MOHATT *et al.*, 2008). Na mladim biljkama *P. albicaulis* sa 3 različita staništa (posle požara ili bez požara) TRUSTY (2009) beleži 6 dominantnih ECM morfotipova i 22 taksona ektomikoriznih gljiva, analizom preko 22000 korenskih vrhova.

BRUNS (1995) smatra da je broj ektomikoriznih gljiva koje se javljaju u ovim zajednicama borova verovatno veći, a da do pogrešne procene dolazi zbog toga što su, da bi se izvršio uvid u pojavu nadzemnih fruktifikacija, neophodne česte posete lokalitetu u toku više godina, dok veliki broj ektomikoriznih vrsta ni ne obrazuje nadzemna plodonosna tela. U slučajevima kada se radi uzorkovanje mikoriznih korenova, iako se na terenu pokrije relativno široka površina, za uzorak se uzima relativno mala zapremina zemljišta. Osim toga, nezahvalno je porediti broj vrsta na različitim lokalitetima, usled različite veličine ispitivanog područja, metoda uzimanja uzoraka, kao i broja uzoraka. Ipak, smatra BRUNS (1995), i ukoliko se procena zasniva na ovim "minimalnim brojevima", radi se o visokom diverzitetu na maloj površini. Ovaj broj vrsta je utoliko više impresivan jer na osnovu nadzemnog plodonošenja obično izgleda da su monodominantne zajednice borova (kao i monokulture) siromašne vrstama gljiva.

Na osnovu analize vrhova korena, ektomikorizna zajednica munike na lokalitetu Sovrh izgrađena je od *Suillus*-a, *Rhizopogon*-a, *Amphinema*-e, *Tomentella*-e, *Willcoxina*-e i *Sebacina*-e kao dominantnih i kodominantnih komponenti, dok su *Lactarius*, *Tricholoma*, *Inocybe*, kao i neke od neidentifikovanih vrsta bliske sa askomicetama (Pezizales i

Pleosporales), u zajednici prisutne kao minorne. Na lokalitetu Kastrat dominiraju *Amphinema* (5) taksoni, dok ektomikoriznu zajednicu čine *Tomentella* (2), *Pseudotomentella* (1), *Sebacine* (2), *Suillus* (1), *Russula* (3), *Lactarius* (3), kao i neidentifikovani *Tricholoma* (2), *Cortinarius* (1) i *Chantarellaceae* taksoni (1).

Istraživanja strukture ekzomikorizne zajednice u šumama *P. teada* (PARRENT, 2006) pokazuju da u sastav ovih zajednica ulazi 8 dominantnih taksona, i veliki broj taksona koji pokazuju veoma nisku brojnost (obilnost prisustva). TRUSTY (2009) u šumama *P. albicaulis* beleži 6 dominantnih ektomikoriznih morfotipova, a NIETO & CARBONE (2009) ukupno 15 ektomikoriznih morfotipova u juvenilnim zajednicama *P. pinaster*. U šumama hibridne smrče (*Picea engelmannii* Pary ex Engelm. × *Picea glauca* (Moench) Voss) u Britanskoj Kolumbiji, na staništima posle čiste seče, kao i posle požara determinisano je 6 dominantnih morfotipova, iz kojih je identifikovano 22 genotipa.

Na staništima različitih vrsta borova, na vrlo udaljenim lokalitetima javlja se iznenađujuća podudarnost ektomikoriznih taksona detektovanih na vrhovima korena mladih biljaka na inicijalnim, nerazvijenim zemljištima, siromašnim hranljivim materijama, posle požara ili nekog drugog poremećaja u ekosistemu. To su vrste: *Amphinema*, *Wilcoxina*, *Pseudotomentella*, zatim *Rhizopogon* i *Suillus*, kao i ponegde *Cenococcum*. Usled toga može se pretpostaviti da su ove vrste prilagođene ovakvim stanišnim uslovima, a prema TRUSTY (2009) njihova pojava kod različitih vrsta domaćina sugeriše potencijalnu ekološku nišu koju one naseljavaju.

Ovakav sastav vrsta odgovara mikoriznoj zajednici munike na lokalitetu Sovrh, i dobrim delom na lokalitetu Kastrat. Takođe treba imati u vidu da je trenutno požar glavni i relativno čest faktor poremećaja i ugrožavanja munike u Crnoj Gori (mada uzorci korena nisu sakupljeni na lokalitetima koji su bili zahvaćeni požarom).

Svaka od komponenti ektomikorizne zajednice ima svoju ulogu u zajednici. Borovi su obligatno mikorizni, što znači da se je prisustvo mikoriznih gljiva neophodno za njihovu ishranu.

Suillus granulatus je vrsta koja je na osnovu učestalosti javljanja i obilnosti fruktifikacije izrazito dominantna u šumama munike u Crnoj Gori, te je njen nalaz i

determinacija u uzorcima korena očekivan. Međutim, istraživanja drugih autora pokazuju da se neke vrste koje su inače u šumama česte, kao što je *Suillus pungens* u šumi *P. muricata* (GARDES i BRUNS, 1996), vrlo retko detektuju na mikoriznim korenovima. Na osnovu pojave plodonosnih tela *Suillus tomentosus* i *Russula* sp. dominiraju u šumama *P. banksiana*, ali na osnovu posmatranja mikorize i morfotajpinga DANIELSON (1984, cit. GARDES i BRUNS, 1996) procenjuje da ektomikoriza koju obrazuje *Suillus* ne prelazi 5%¹⁹. Rezultate slične ovom dobili smo na lokalitetu 2 (Kastrat), gde je *Suillus granulatus* izolovan samo jednom, iz 72 uzorka korena. Na osnovu morfološke analize korena sa ovog lokaliteta, u uzorcima korena nije zabeležen isti morfotip koji odgovara *Suillus*-u na lokalitetu Sovrh. Za razliku od lokaliteta Sovrh, gde nije beležena pojava plodonosnih tela *Suillus*-a, na lokalitetu Kastrat plodonošenje *Suillus*-a je veoma obilno u određenim vremenskim prilikama. Pojava plodonosnih tela *Suillus*-a je veoma obilna takođe u delu zajednice gde je pokrivenost terena klekom preko 75%, a zemljište manje razvijeno.

S obzirom da *Rhizopogon* i *Suillus* imaju dosta sličnu morfološko-anatomsku strukturu, i da su u uzorcima korena zastupljene različito stare i razvijene mikorize, iz kojih su izolovane obe vrste (*Rhizopogon* i *Suillus*), može se desiti da je prisustvo *Suillus*-a na ovom lokalitetu, u smislu obilnosti pojavljivanja u uzorku na osnovu rasprostranjenosti morfotipova, u pojedinačnim uzorcima (tabela 15) precenjeno na štetu *Rhizopogona*. Međutim, veliki broj identifikovanih sekvenci ove vrste (20) i frekventnost pojavljivanja na lokalitetu (10/35) nedvosmisleno ukazuju da ova vrsta predstavlja značajnu komponentu ektomikoriznih zajednica munike u ekstremno kserotermnim uslovima spoljašnje sredine, i na slabo razvijenom zemljištu.

Više podataka o ekologiji *Suillus*-a prikazano je u poglavlju 5, gde je *Suillus granulatus* korišćen za inokulaciju sadnica crnog bora.

¹⁹ *Pinus banksiana* raste u subarktičkom i planinskom-borealnom klimatu u Severnoj Americi, sa vrlo suvim do umereno suvim edafskim uslovima i na kiselim zemljištima koja su vrlo siromašna do siromašna hranljivim materijama.

Vrste iz roda *Rhizopogon*, kao i *Suillus* vrste²⁰, pokazuju veliki stepen specifikacije prema borovima (MOLINA *et al.*, 1992), i smatraju se kao rani i kasni kolonizatori, u smislu sukcesije vrsta i u odnosu na starost domaćina.

Najveći diverzitet vrsta *Rhizopogon*-a zabeležen je u četinarskim šumama na obali Pacifika na severo-zapadu SAD, zbog velikog diverziteta i broja borova (i drugih *Pinaceae*) koji se tamo javljaju. Ova oblast smatra se glavnom oblašću za specijalizaciju i evoluciju *Rhizopogona* i njihovih četinarskih domaćina (TRAPPE i MOLINA, 1994, GRUBISHA *et al.*, 2002).

Istraživanja pokazuju da su lokalne populacije *Rhizopogon*-a u zemljištu velike zbog toga što se plodonosna tela *Rhizopogona* obrazuju ispod zemlje (hipogeično). Spore *Rhizopogon*-a u zemljištu formiraju “depoe” spora, koji su u borovim šumama toliko gusti, da čak i kada se zemljište “razblaži” 50 do 100 puta dodavanjem sterilnog zemljišta, više od polovine testiranih sadnica koje se posade u ovakvo zemljište biva kolonizovano *Rhizopogon*-om (TAYLOR i BRUNS 1999; KJØLLER i BRUNS 2003). GRUBISHA *et al.* (2007) procenjuju da zemljišta iz prosečne borove šume u Kaliforniji sadrži najmanje 3000 *Rhizopogon* spora / mL. Dugovečnost spora nije poznata, ali neka zapažanja nagoveštavaju da one mogu da sačuvaju vitalnost desetinama godina (IZZO *et al.* 2005; GRUBISHA *et al.*, 2007), što znači da se rezervoar vitalnih *Rhizopogon* spora u zemljištu s godinama povećava.

Ova karakteristika *Rhizopogon*-a može da budu veoma značajna za muniku na terenima velikog nagiba, gde je količina zemljišta mala, a njegovo spiranje veliko. Dugovečnost spora u zemljištu je takođe od posebnog značaja u sušnim i visokoplaninskim uslovima, gde je klijanje, kao i kasniji razvoj biljaka neizvestan. Ovo takođe objašnjava veliku zastupljenost (skoro dominaciju) *Rhizopogona* u ektomikoriznoj zajednici munike. Osim toga, interesantan je podatak da, u ogledu u stakleniku, frekvencija *Rhizopogon olivaceotinctus* ektomikoriza raste kada se zemljište sakupljeno u zreloj mešovitoj četinarskoj šumi prvo zagreje do 75° C (IZZO *et al.* 2006, cit. GRUBISHA *et al.*, 2007). Nije utvrđeno da

²⁰ *Rhizopogon* i *Suillus* označavaju se u literaturi i kao suiloidi, jer su filogenetski, kao i u pogledu ekoloških “zahteva”/preferencijala veoma bliski rodovi. (BRUNS *et al.*, 2002; KJØLLER i BRUNS, 2003; MOHATT *et al.*, 2008).

li zagrevanje zemljišta (toplota) redukuje konkurenciju, ili stimuliše infektivnost *Rhizopogon*-a. U šumi munike zabeležena je veoma visoka temperatura “zemljišta” odnosno kamenitog substrata, u kojem su sakupljeni uzorci korena korišćeni za analizu (posebno na siparima, poslepodne), što se moglo očekivati.

Pokazalo se da *Rhizopogon* i *Suillus* vrste rapidno kolonizuju mlade biljke na terenima posle požara ili klijanca koji počinju da rastu na terenima van zrele sastojine, na novim pionirskim staništima. Istraživanja ASHKANNEJHAD i HORTON (2006) pokazala su da su klijanci *Pinus contorta* koji niču na peščanim dinama van šume bili kolonizovani malim brojem vrsta koje se javljaju u šumi, a 7 od 10 ektomikoriznih vrsta, zabeleženih na korenu klijanaca su bile suiloidne vrste (*Rhizopogon* i *Suillus*).

KJØLLER i BRUNS (2003) smatraju da su suiloidi, a posebno *Rhizopogon* sp. često značajni za regeneraciju borova posle poremećaja. Njihovo prisustvo na biljkama koje se ili prirodno javljaju, ili su sađene, ukazuje da su to potencijalno vitalni taksoni koji se neće izgubiti za vreme požara i biće u mogućnosti da obrazuju mikorizu na sadnicama.

Istraživanja MOHATT *et al.* (2008) pokazuju da *Rhizopogon* i *Suillus* predstavljaju značajne ektomikorizne simbiote *P. albicaulis*, posebno na sadnicama i mladim biljkama (klijavcima), kao i da suiloidi imaju veći značaj u šumama koje nisu gorele.

Zabeleženo je da se *Rhizopogon* vrste javljaju u ektomikoriznim zajednicama kako pre, tako i posle požara (KJØLLER i BRUNS 2003), na *Pinus muricata* (HORTON *et al.* 1998), kao i na *Pinus halepensis* (TORRRES i HONRUBIA, 1997).

Pokazalo se da inokulacija *P. ponderosa* sa *Rhizopogon*-om i njegova upotreba u nepovoljnim i teškim uslovima spoljašnje sredine u jugozapadnom Oregonu (SAD) omogućava porast preživljavanja sadnica za najmanje 40% u odnosu na ne inokulisane sadnice (STEINFELD *et al.* 2003), dok MOSER (1963) navodi da inokulacija *Pinus cembra* L., koji raste na velikim nadmorskim visinama, suiloidnim gljivama daje dobre rezultate preko 50 godina.

Druga stvar koja u determinisanim *Rhizopogon* sekvencama iz korena munike zavređuje pažnju je da su najbliže identifikovane sekvence iz banke gena potvrdile identitet taksona do nivoa roda. Dosadašnja istraživanja u svetu, pokazala da su pojedine vrste

Rhizopogon-a ograničene na samo jednu vrstu domaćina. Ovu pojavu objasnili su GRUBISHA *et al.* (2007) činjenicom da *Rhizopogon* obrazuje spore u hipogeičnim plodonosnim telima²¹ koje obično raznose sitni glodari, ili ređe krupniji sisari. Rasprostranjenje *Rhizopogon*-a je ograničeno na zonu kretanja ovih životinj (u poređenju sa gljivama koje obrazuju nadzemna plodonosna tela, i čije spore se raznose vetrom), kao i zonom rasprostranjenja biljke domaćina. Kada je granica populacije domaćina jasna i populacija izolovana, kao što je slučaj sa munikom (posmatrano sa aspekta izolovanog lokaliteta-Sovrh), ili endemoreliktne vrste na jednom području, ima osnova da se očekuje da se može raditi o do sada ne zabeleženoj vrsti *Rhizopogon*-a.

Zbog fragmentiranog areala munike, ima osnova da se pretpostavi da se u različitim regionima njenog areala mogu očekivati taksoni *Rhizopogon*-a, sa “samostalnom” (odvojenom) evolucijom.

Istraživanja GRUBISHA *et al.* (2007) pokazuju da je razdaljina od 8,5 km između zajednica *P. muricata* dovoljna za veliku genetičku diferencijaciju u populacijama *Rhizopogon* vrsta (praćene su populacije *R. vulgaris* i *R. occidentalis* koje se javljaju na oba lokaliteta, pri čemu je zapažena ista diferencijaciona šema za obe vrste).

Rhizopogon rocabrunae M.M. Martin je veoma retka vrsta, nedavno opisana (1996) u Španiji, u zajednici sa *Abies alba*. 2010 ZOTTI *et al.* su objavili prvi nalaz ove vrste u Italiji. Naša ITS sekvenca najbliža je ovoj vrsti.

Na lokalitetu Kastrat *Rhizopogon* međutim nije zabeležen ni kao morfotip, niti sekvenciranjem.

Amphinema predstavlja jednu od dominantnih komponenti ektomikoriznih zajednica munike na oba lokaliteta. *Amphinema* (Stereales, *Atheliaceae*) je česta, vrlo raširena i vrlo često najviše zastupljena vrsta, posebno u četinarskim šumama, mada se javlja i u zajednici sa lišćarima.

Amphinema byssoides je pionirska vrste, dobro adaptirana na uslove inicijalnih zemljišta. Ova ektomikoriza odlikuje se razvijenim rizomorfama i široko rasprostranjenom

²¹ koja se nazivaju lažni tartufi

mrežom micelije, što su prema KRANABETTER (2004) proliferacije korena koje domaćinu omogućavaju potpunu upotrebu zemljišnih resursa. Ovakva ektomikoriza može da ima prednost na inicijalnim, ili staništima na kojima je došlo do poremećaja, jer omogućava bolji pristup nutrijentima (HARLEY i SMITH, 1983). Smatra se da *Amphinema* takođe može da predstavlja značajan izvor inokuluma za sadnice koje se iznose na terene posle požara ili drugog poremećaja, verovatno na taj način što nastavlja da egzistira na korenu drveća preostalom od pre požara ili na drugoj izdanačkoj vegetaciji (BAARET *et al.* 1999; HAGERMAN *et al.* 1999). *Amphinema*, *Thelephora* i *Hebeloma* su uobičajene gljive sa rizomorfama koje se javljaju na sadnicama koje su sađene, ili koje se prirodno regenerišu posle poremećaja.

Amphinema taksoni česti u četinarskim šumama u nepovoljnim uslovima spoljašnje sredine. Najzastupljenije vrste u u šumama *P. teada* (PARRENT, 2006), predstavljaju *Amphinema* B i *Amphinema* D, koje se javljaju među 8 dominantnih taksona. *Amphinema byssoides* je jedna od najčešćih ECM gljiva povezanih sa smrčom u severozapadnoj Severnoj Americi. U šumama hibridne smrče (*Picea engelmannii* × *Picea glauca*) u Britanskoj Kolumbiji, na staništima posle čiste seče, kao i posle požara *Amphinema* je najzastupljenija vrsta (MAH *et al.*, 2001). Njeno prisustvo na sadnicama sađenim na ovakvim lokalitetima mnogo je veće u poređenju sa sadnicama koje se prirodno obnavljaju u zreloj šumi. Ona je jedna od 10 dominantnih u zajednici *Pinus albicans*, kao i u zajednici *Picea engelmannii* koja je subalpska vrsta (MAH *et al.*, 2001), i jedna od 8 dominantnih vrsta (>5% relativne obilnosti) u subalpskim mešovitim šumama *Abies lasiocarpa* (Hooker) Nuttall i *Picea engelmannii* (HAGERMAN *et al.*, 1999). *Amphinema* takođe, posle E-straina (*Wilcoxina*), predstavlja najzastupljeniji morfotip na smrčama gajenim u gradskim uslovima.

Uloga pionirske ektomikorizne zajednice u uspešnom snabdevanju domaćina hranljivim materijama potvrđena je i istraživanjima KRANABETTER-a (2004), kada su sadnice hibridne smrče (u izolovanom ogledu) na kojima je zabeležena zajednica koju čine *Amphinema byssoides*, *Thelephora terrestris* i *Laccaria laccata* pokazale bolji porast od sadnica inokulisanih ektomikoriznom zajednicom iz zrele šume.

U Italiji je *Amphinema* zabeležena u zajednici sa *Eucalyptus*, *Cistus incanus*, *Pinus pinea*, *P. nigra*, *P. laricio*, *Cornus mas*, *Juniperus communis*, *J. oxycedrus*, *Polysticum setiferum*, *Acacia cyanophylla*, *Abies alba*, *Erica*, *Betula*, *Alnus* i *Picea abies*. Dokazano je da *Amphinema* mikorizna sa *Pseudotsduga menziesi*, *Pinus ponderosa*, *Abies grandis* (Douglas ex D. Don) Lindley, *Betula papyrifera* Marsh, *Arbutus menziesi* Pursh, *Lichnocarpus pruinosus* Petersen i *Arctostaphylos uva ursi* (L.) Spreng.

Istraživanja pokazuju da *Amphinema*, kao i *Rhizopogon*, slabo raste na većini hranljivih podloga u kulturi. Smatra se da je za nju je optimalan umereni pH. U prirodnim uslovima značajan pad populacije *Amphinema* beleži u slučaju kada se vrši fertilizacija azotom. Efekat suše takođe utiču na smanjenje biomase i relativnu učestalost pojavljivanja *Amphinema* sp.

Tomentella ektomikoriza se često javlja i dominantna je u mikorizosferi četinara i lišćara širom sveta. *Tomentella sublilacina* i drugi *Tomentella* taksoni predstavljaju široko rasprostranjene ektomikorizne gljive koje sporulišu u organskom horizontu zemljišta. *T. sublilacina* može da bude dominantna ili subdominantna ektomikorizna vrsta u zrelim šumskim sastojinama (LILLESKOV i BRUNS, 2005). *Tomentella* formira mikorizu koja se odlikuje čestim ekstramatričnim hifama, i rizomorfama koje nisu česte, što znači da poseduje mikorizu kratkog do srednjeg dometa. Ona se lako i brzo pojavljuje na sadnicama iz depoa spora iz zemljišta u ogledima u rasadnicima, kao i na terenu nakon požara (LILLESKOV i BRUNS, 2005). *Tomentella* može da dominira ektomikoriznim zajednicama korena i da preživi poremećaje u obliku depoa spora (KJØLLER, 2006.).

TANIGUCHI *et al.* (2009) istražuju sukcesiju ektomikoriznih zajednica u sukcesiji od *Pinus thunbergii* Parl. do bagrema i navode da je *Tomernotella* bila dominantna vrsta u zajednicama u kojima dominira bagrem, a malo zastupljena u zajednicama gde dominira japanski crni bor, pretpostavljajući da je distribucija vrste uslovljena inokulum potencijalom u zemljištu.

Ranije se smatralo da *Sebacinaceae* (Heterobasidiomycota) predstavljaju saprobne ili parazitne vrste gljiva. Međutim novija istraživanja pokazuju da Sebacinales formiraju ektomikorizu u šumama umerenog regiona One nisu ograničene na pojedine domaćine i javljaju se u zajednicama sa domaćinima iz fam *Betulaceae*, *Fagaceae* i *Tiliaceae* (SELOSSE *et al.*, 2002). Osim ektomikorize sa šumskim drvećem one u prirodi formiraju veliki broj tipova mikorize sa korenom različitih mono- i dikotila, od ectomikorize, do erikoidnih mikoriza ili mikoriza orhideja. Njihova uloga u ishrani biljaka i sposobnosti da utiču na povećanje rasta biljaka i otpornost domaćina prema abiotičkom stresu i patogenima doprinela je da u poslednje vreme počnu istraživanja o mogućnosti njihove primene na poljoprivrednim kulturama (GHEMIRE i KELLY, 2011). Posebnu pažnju u poslednje vreme pobudila je *Sebacina vermifera*, kao i druge *Sebacina* vrste, jer formiraju mikorizne ili endofitne zajednice sa većinom biljaka koje su do danas proučene. Smatra se da njena upotreba u povećanju tolerancije prema suši kod poljoprivrednih useva ima perspektivu.

Istraživanja BAAR *et al.* (1999) pokazuju da *Rhizopogon*, *Wilcoxina* (E-strain), i *Tomentella* spp. kolonizuju sadnice koje su gajene u zemljištu prikupljenom odmah posle požara, dok se *Wilcoxina* spp., *Pseudotomentella nigra*, *Amphinema byssoides* javljaju posle poremećaja. Smatra se da *Wilcoxina mikolae* ima hlamidospore sa debelim zidovima, koje mogu dugo da opstanu u zemljištu posle poremećaja. HAGERMAN *et al.* (1999) ove taksone definišu i kao “taksone otporni na poremećaj” (disturbance resistant taxa).

Tokom analize sekvenci dobijenih u ovom istraživanju zapaženo je da u grupi identičnih sa neidentifikovanim sekvencama iz Banke Gena, veliki broj neidentifikovanih sekvenci vodi poreklo, tj. prethodno je izolovano, iz mikoriznih korenova različitih domaćina, ali iz veoma sličnih ekoloških uslova, kao što je suvi mediteranski klimat na krečnjacima, ili, manje često, visokoplaninski klimati, hladni i siromašni u hranljivim materijama.

U grupi neidentifikovanih vrsta prisutne su sekvence Ascomycota (17) koje izgleda da mogu da predstavljaju sekvence ektomikoriznih vrsta. One su najbliže sa sekvencama

nekih *Pyrenemataceae* i *Pezizaceae*-a. Poznato je da se gljive iz ovih rodova javljaju na sušnim i siromašnim staništima u ECM zajednici sa borovima, ili drugim domaćinima (TEDERSOO *et al.*, 2006; TAMM *et al.*, 2010; WARCUP, 1990).

Buduća istraživanja, koja će biti sprovedena svuda u svetu, treba da pomognu u identifikovanju neidentifikovanih vrsta gljiva, što će sve doprineti boljem i potpunijem razumevanju uloge pojedinih gljiva u šumskim ekosistemima i boljem razumevanju funkcionisanja šumskih ekosistema.

4.5. Zaključak

Molekularna analiza kolrena dala je precizne i nove informacije o sastavu ektomikorizne zajednice munike.

Ektomikorizne zajednice munike na dva lokaliteta sa prvenstveno različito razvijenim zemljištem se razlikuju po sastavu i strukturi.

Na korenu munike prikupljenom na lokalitetu Sovrh izdvojeno je 11 različitih morfortipova iz kojih je izolovano 119 taksona gljiva. Od toga je 29 ektomikoriznih taksona. Ostale izolovane gljive predstavljaju epifite korena, ili gljive koje se uobičajeno javljaju u rizosferi.

Ektomikoriznu zajednicu munike na lokalitetu Sovrh čine vrste iz rodova *Suillus* (3), *Rhizopogon* (1), *Amphinema* (5), *Tomentela* (5), *Willcoxina* (2), *Sebacine* (2), *Pseudotomentella* (1), *Lactarius* (1), *Tricholoma* (1), *Inocybe* (3). Mikorizne su verovatno i neke vrste iz grupe "identifikovane u Banci Gena (GenBank)", kao i neke od neidentifikovanih vrsta, bliske sa askomicetama (*Pezizales*, *Pleosporales*).

Na ovom, kao i na ovakvom tipu staništa do sada nije zabeležena fruktifikacija gljiva.

Na lokalitetu Kastrat izdvojeno je 7 različitih morfotipova, iz kojih je izolovano je 63 taksona gljiva, od kojih je 21 mikorizan.

Na lokalitetu Kastrat dominiraju *Amphinema* (4) taksoni, a osim njih ektomikoriznu zajednice u čine *Tomentella* (2), *Pseudotomentella* (1), *Sebacine* (2), *Suillus* (1), *Russula* (3), *Lactarius* (3), kao i neidentifikovani *Tricholoma* (2), *Cortinarius* (1) i *Chantarellacea* taksoni (1).

Podaci dobijeni analizom korena munike sa ovih staništa predstavljaju nove podatke sa aspekta upoznavanja mikoriznih zajednica munike, a u širem kontekstu to predstavlja upoznavanja pionirskih i ekstremno kserotermnih mikoriznih zajednica na krečnjacima. S obzirom na reliktni i subendemični karakter munike, od zajednice simbiotskih gljiva se mogu očekivati nekakve specifičnosti u smislu sastava vrsta. Posebnu pažnju treba obratiti na ektomikorizne askomicete (Pezizales i Pleosporales).

Metodološki pristup koji je primenjen prilikom ovog istraživanja na uzorcima korena munike može biti primenjen na veoma različitim uzorcima biljnog materijala (list, stablo, seme), za "hvatanje" i identifikaciju taksonomski vrlo različitih vrsta gljiva.

5. Uticaj nekih fizioloških faktora na razvoj ektomikoriznih gljiva

5.1. Uvod

Različiti ekološki i fiziološki faktori utiču na porast mikoriznih gljiva, kao i na mikoriznu sintezu i funkcije u prirodi. U prvom redu, to su vlažnost, pH i struktura zemljišta, kao i druge fizičke i hemijske osobine zemljišta, raspoložive hranljive materije, a posebno izvori ugljenika i azota. Svi ovi faktori značajno utiču i na rast ektomikoriznih gljiva u kontrolisanim laboratorijskim uslovima (SMITH i READ, 1997).

Uloga biljke u ektomikoriznoj simbiozi je da obezbedi gljivu sa ugljenikom, koji vezuje u procesu fotosinteze.

Najvažniji nutrijent, koji predstavlja ograničavajući faktor za rast drveća (uopšteno govoreći: biljaka) u borealnim, ali i drugim šumama umerenog regiona je azot. Azot se u ekosistemima borealnih šuma nalazi vezan u velikom broju organskih komponenti: od prostih amino-kiselina i amino-šećera do kompleksnih polipeptida i hitina. Sposobnost šumskog drveća da usvaja organski azot je ograničena na proste aminokiseline (NASHOLM i PERSSON, 2001). Međutim većina šumskog drveća formira ektomikorizu sa velikim brojem gljiva iz zemljišta, koja je od fundamentalnog značaja za usvajanje azota.

Limitirajući element za rast biljaka u borealnim šumama je takođe fosfor (P). Dokazano je da je usvajanje fosfora od strane šumskog drveća značajno poboljšano kod biljaka koloniziranih ektomikoriznim gljivama (SMITH i READ, 1997).

READ i PEREZ-MORENO (2003) smatraju da se ektomikorizna simbioza razvila kod biljaka kao adaptacija koja im omogućava da kolonizuju zemljišta u kojima su hranljive materije vezane u obliku organskih jedinjenja. Koren biljaka samostalno nije sposoban da usvoji većinu organskih hranljivih materija. Međutim, do njih može da dođe zahvaljujući ekstracelularnim enzimima koje luče micelije ektomikoriznih gljiva. Osim toga, pristupačnost nutrijenata iz zemljišta biljkama je značajno povećana zahvaljujući velikoj površini micelije gljive, koja vrši absorpciju hranljivih materija (SMITH i READ, 1997).

Većina hranljivih materija vezana u organskim makromolekulima, tako da ektomikorizne gljive treba prvo da degradiraju ove komponente. Vrhovi hifa ektomikoriznih gljiva produkuju veliki broj enzima koji biljkama domaćinima omogućavaju pristup nutrijentima koji bi im inače ostali nepristupačni (LINDAHL *et al.*, 2005). Degradacija proteina vrši se u prisustvu ekstracelularnih proteaza koje produkuju gljive, peroksidaze doprinose razgradnji humusa a hitinaze razgrađuju hitin. Pošto su ektomikorizne gljive evoluirale od saprobnih predaka, smatra se da kod ektomikoriznih gljiva može da se očekuje i značajna katabolička aktivnost (NYGREN, 2008).

Pojedinačno drveće formira ektomikorizne zajednice sa raznovrsnim zajednicama gljiva. Na malim površina (< 1 ha) može da se javi veliki broj (>100) različitih vrsta gljiva, pri čemu pojedinačna biljka domaćin "podržava" veliki broj vrsta ektomikoriznih gljiva u isto vreme (SMITH i READ, 1997). Više ektomikoriznih vrsta gljiva može takođe da koegzistira u nekoliko centimetara dužine jednog korena a ponekad čak i da deli pojedinačni korenski vrh. Verovatno je da mnoge od ovih gljiva ispunjavaju u principu sličnu ekološku funkciju i da izvestan stepen funkcionalne "suvišnosti" postoji u ektomikoriznim zajednicama gljiva (BUSCOT *et al.*, 2000). Međutim, na osnovu bogatstva njihovog taksonomskog diverzitetza, može se pretpostaviti da zajednice ektomikoriznih gljiva poseduju veliku količinu funkcionalne heterogenosti ili diverziteteta.

Prema DIAZ i CABIDO (2002) funkcionalni diverzitet predstavlja "broj, tip i distribuciju funkcija koje ispoljavaju organizmi unutar ekosistema". Definicija funkcionalnog diverziteteta ne mora nužno da bude povezana sa usvajanjem hranljivih materija. Međutim, s obzirom da ishrana predstavlja suštinsku komponentom u kruženju materije i energije u ekosistemu (BENGTSSON, 1998), ona je veoma važan ekološki proces. Zbog toga se veliki broj istraživača, kada se bavi istraživanjem funkcionalnog diverziteteta, fokusira na usvajanje hranljivih materija. Osim toga, kada se istražuje funkcionalni diverzitet mikoriznih gljiva, očekivano je da se pažnja posveti funkcijama koje pozitivno utiču na biljku domaćina, kao i na samu gljivu.

Glavni problem u istraživanjima mikorize, prema NYGREN (2008) je što je samo mali broj ektomikoriznih vrsta izolovan u čiste kulture²². Kao posledica toga, naše znanje o njihovim funkcionalnim osobinama zasniva se na samo nekoliko vrsta koje se lako gaje u kulturi, kao što su vrste iz rodova *Hebeloma*, *Laccaria*, *Paxillus* i *Suillus* (NYGREN, 2008). Generalno, ove vrste ne predstavljaju glavne komponente zajednica gljiva u zrelih šumama (HORTON i BURNS, 2001). Smatra se da ekstremno teško, ako je uopšte i moguće, izolovati u čiste kulture gljive iz rodova koji su najbogatiji vrstama i možda ekološki najvažniji (u borealnim četinarskim šumama), kao što su *Cortinarius*, *Lactarius*, *Russula*, *Inocybe*, *Tomentella* i *Tricholoma* (SMIT i READ, 1997). Može se reći da je vrlo malo je poznato o funkcionalnim osobinama ovih vrsta (NYGREN, 2008), kao i da osnovne fiziološke informacije o mnogim drugim vrstama ektomikoriznih gljiva nedostaju (TEDERSOO *et al.*, 2010). Takođe se mora imati u vidu da je, usled postojanja velikih unutarvrstnih varijacija u ispoljavanju različitih osobina, svaki pojedinačni izolat potrebno ispitati (CAIRNEY, 1999).

Cilj ovog istraživanja je upoznavanje sa nekim osnovnim fiziološkim karakteristikama gljiva čija se plonosna tela najčešće sreću u šumskim ekosistemima munike. Ono istovremeno treba da predstavlja doprinos upoznavanju funkcionalnog diverziteta ektomikoriznih gljiva u ovim šumama.

Na osnovu praćenja pojave sporokarpa u toku nekoliko uzastopnih godina, i na osnovu podataka iz literature, najfrekventnije vrste ektomikoriznih gljiva u šumama munike u Crnoj Gori su *Suillus granulatus*, *Tricholoma imbricatum*, *Lactarius semisanguifluus* i *Russula sanguinaria*. Izolati ovih vrsta korišćene su za ispitivanje nekih fizioloških osobina u kulturi. Osim toga, ispitivane su *Suillus collinitus* i *Tricholoma batschii*, koje nisu toliko česte, ali su prisutne u ovim šumama, kao i *Chalciporus amarellus*, vrsta za koju se smatralo da je mikorizna (RINALDI *et al.*, 2008), ali su istraživanja TEDERSOO *et al.* (2010) to osporila. Pojava ove vrste u Crnoj Gori vezuje se isključivo za ekosisteme munike, a smatra se da je retka u Crnoj Gori (PERIĆ i PERIĆ 2004).

Izolati *Pisolithus arhizus* i *Scleroderma* sp. koji smo ocenili kao pogodni za mikorizaciju sadnica u rasadničkoj proizvodnji (poglavlje 6), ispitivani su prvenstveno radi

²² Njih opisuju kao "tractable"-poslušne, ili one koje se lako obrađuju-istražuju, upoznaju, prate

pronalaženja optimalnih uslova za njihovo gajenje u laboratorijskim uslovima i proizvodnju mikoriznog inokuluma.

Ispitivan je uticaj temperature i različitih pH na razvoj micelije navedenih izolata ektomikoriznih gljiva, zatim uticaj različitih izvora ugljenika (6) i azota (3) na brzinu porasta micelije.

Izolati poreklom iz šume munike dobijeni su iz sporokarpa gljiva sakupljenih na lokalitetu Korita, na međusobnom rastojanju od svega nekoliko metara tokom septembra i oktobra 2009., osim izolata *T. batschii* i *S. collinitus*, koji su prikupljeni i izolovani ranije (2007). Pošto su se javile na istom staništu, pretpostavka je da sa njega mogu da koriste različite zemljišne resurse-hranljive materije. Smatra se da neke karakteristike ektomikoriznih gljiva, a pogotovo one koje se odnose na njihovu enzimatsku aktivnost mogu da budu promenjene usled gajenja u kulturi na hranljivim podlogama. Zbog toga je bilo značajno da su u ogledu korišćene kulture jednako stare, i to neposredno po izolaciji (u toku zime 2009 i proleća 2010).

Poznato je da postoje razlike u porastu izolata različitih vrsta ECM gljiva u odnosu na temperaturu (HUTCHISON, 1990; DAMES *et al.*, 1999) kao i da su gljive acidofilne (DAMES *et al.*, 1999). Radi optimizacije laboratorijskih uslova za gajenje micelije ektomikoriznih gljiva ispitivan je rast micelija na suboptimalnim temperaturama i na različitim pH.

Radi ispitivanja sposobnosti razlaganja i korišćenja različitih složenih ugljenih hidrata praćen je porast micelije gljiva na podlogama u kojima su izvori ugljenika predstavljali: glukoza, saharoza, dekstrin, skrob, arabinoza i ksiloza.

U procesu fotosinteze biljke vezuju ugljenik iz atmosfere, koji se iz lišća translocira u koren u obliku rastvorljivih šećera i organskih kiselina, i u apoplastima korena (kroz Hartigovu mrežu) prenosi u gljivu u obliku saharoze (NEHLS *et al.*, 2007). Kisele invertaze - enzimi poreklom od biljke, vrše cepanje saharoze na glukozu i fruktozu koje je gljiva u mogućnosti da usvoji (NEHLS *et al.*, 2007). Osim toga, glukozu, koju proizvode u procesu fotosinteze, biljke najčešće skladište u obliku polisaharida skroba u hloroplastima i amiloplastima. Molekuli glukoze su vezani u skrobu sa alfa vezama, koje se lako hidrolizuju.

Dekstrin je polisaharid male molekularne mase koji nastaje hidrolizom skroba. On je takođe građen od glukoza, povezanih α vezama. Ksilozna i arabinoza su monosaharidi koji ulaze u sastav hemiceluloze, koja je, zajedno sa celulozom prisutna u gotovo svim biljnim ćelijskim zidovima, čineći oko 30% biljnog tkiva. Dok je celuloza sa kristalnom strukturom jaka i otporna na hidrolizu, hemiceluloza se odlikuje više amorfnom strukturom, i lako se hidrolizuje sa rastvorenim kiselinama i bazama, kao i sa brojnim hemicelulitičkim enzimima. Glavni gradivni element hemiceluloze je ksilozna. Arabinoza, osim što se nalazi u hemicelulozi, ulazi u sastav biopolimera kao što je pektin (VELIČKOVIĆ, 2000).

Porast micelije gljiva praćen je na hranljivim podlogama sa dodatkom amonijaknog (NH_4^+), nitratnog (NO_3^+) i proteinskog azota. Prema READ i PEREZ-MORENO (2003) rast na proteinskim substratima predstavlja najbolji način da se dokumentovuje sposobnost ektomikoriznih gljiva da koriste organske izvore hranljivih materija. Kao model komponentu, ABUZINADAH i READ (1986), a kasnije i drugi autori, su koristili čist protein BSA (Albumin bovin, Frakcija V), kada su pokazali da različite ECM vrste imaju širok spektar sposobnosti za degradaciju proteina (NYGREN, 2008). Upotreba NO_3^+ kao izvora azota je do sada ispitana kod malog broja ektomikoriznih gljiva i rezultati pokazuju da je upotreba veoma varijabilna kako između, tako i unutar vrste (NYGREN, 2008), dok se azot u obliku NH_4^+ uobičajeno koristi za kultivaciju ektomikoriznih gljiva.

Porast micelije gljiva iz rodova *Boletus*, *Suillus*, *Amanita* i *Hebeloma* na hranljivim podlogama i u prisustvu teških metala ispitivala je GOLUBOVIĆ –ĆURGUZ (2008).

Informacije o fiziološkim karakteristikama vrsta iz rodova *Tricholoma*, *Lactarius*, *Russula* i *Chalciporus* su malobrojne (ukoliko ih uopšte i ima) usled činjenice da se ove vrste teško gaje u laboratorijskim uslovima u čistoj kulturi. Ispitivane gljive predstavljaju uobičajene i česte komponente ektomikoriznih zajednica i u drugim šumama četinarica i lišćara umerenog pojasa, pa usled toga dobijeni podaci mogu da imaju širi značaj.

Ovo istraživanje se u isto vreme može smatrati pokušajem optimizacije gajenja ovih vrsta *in vitro* i očekuje se da dobijeni rezultati mogu da pomognu prevazilaženju problema njihove kultivacije.

5.2. Material i metod

5.2.1. Izolacija ektomikoriznih gljiva

Tokom ovog istraživanja korišćeni su izolati gljiva dati u tabeli 16.

Tabela 16. Izolati mikoriznih gljiva korišćeni u istraživanju, sa brojem pod kojim je gljiva prijavljena u Banku Gena NCBI

br.	izolat	No. NCBI
1	<i>Chalciporus ammarelus</i> (Quel) Bataile	JQ685719
2	<i>Lactarius deliciosus</i> (L.) Gray	JQ685722
3	<i>Russula sanguinaria</i> (Schumach.) Rauschert	JQ685712
4	<i>Suillus granulatus</i> (L.) Rousell	JQ685727
5	<i>Suillus collinitus</i> (Fr.) Kuntze	JQ685733
6	<i>Tricholoma batchii</i> Guldern	JQ685729
7	<i>Tricholoma imbricatum</i> (Fr.) Kumm.	JQ685731
8	<i>Pisolithus arhizus</i> (Scop.) Rauschert	JQ685724
9	<i>Scleroderma</i> sp.	JQ685726

Plodonosna tela ektomikoriznih gljiva (1, 2, 3, 4, 7) prikupljena su u šumi munike, na lokalitetu Korita Kuči (N 42°28'50,4", E 019° 30' 04,2"), u toku septembra i oktobra 2009. Izolacija gljiva izvršena je kao što je opisano u poglavlju 2. Podaci o poreklu i datumu sakupljanja drugih izolata korišćenih u ovom istraživanju takođe su dati u poglavlju 2 (tabela 4).

Kao polazna, korišćena je MMN podloga, koja je modifikovana na različite načine.

Micelija gljiva gajena je na agarnoj MMN podlozi 40 -60 dana pre inokulacije na 22°C. Hranjive podloge inokulisane su isečkom micelije sa agar podloge kružnog oblika, prečnika 7 mm. Ogledi na čvrstim hranljivim podlogama (u Petri posudama) urađeni su u 2 x 5 ponavljanja, a u tečnoj kulturi 3 x 5 za izolate koji su pokazali veća odstupanja ili neke nepravilnosti u rastu. Ponavljanja gde nije došlo do rasta micelije iz inokuluma isključena su iz dalje obrade.

5.2.2. Uticaj temperature na porast micelije ektomikoriznih gljiva

Za ispitivanje uticaja različite temperature na porast micelija korišćena je MMN (MARX, 1969) modifikovana tako da sadrži 10 g glukoze, 3 g malc ekstrakta i 1g ekstrakta kvasca, pH 5.8. pH vrednost podloge podešena je dodavanjem 1M HCl. Korišćene su plastične petri posude standardnog prečnika (9.5-10 cm). Kulture gljiva inkubirane su u mraku, na temperaturama 20, 22 i 25 °C.

Meren je prečnik obrazovane kulture posle 7,14, 21 i 28 dana.

Prikazan je prečnik micelije kulture razvijene posle 28 dana.

5.2.3. Uticaj različitih ugljenih hidrata na porast micelije ektomikoriznih gljiva

Uticaj različitih vrsta ugljenih hidrata na porast micelije ECM gljiva praćen je na čvrstoj MMN podlozi (u Petri posudama), pH 5,8, na 22° C. Umesto glukoze u hranljivu podlogu dodavani su sledeći izvori ugljenika (10 g/l): saharoza, dekstrin, skrob, arabinoza i ksiloza.

Meren je unakrsni prečnik obrazovane kulture posle 7,14, 21 i 28 dana gajenja u mraku. Prikazan je prečnik micelije kulture razvijene posle 28 dana.

5.2.4. Uticaj pH na porast micelije ektomikoriznih gljiva

Uticaj pH na porast micelije ECM gljiva ispitivan je na tečnoj MMN podlozi (u hranljivom rastvoru) koja je sadržala 10 g glukoze po litru, 3 g malca i 1 g ekstrakta kvasca. pH rastvora podešavan je dodavanjem 1M HCl, ili 1M NaOH/4M NaOH. Ispitivan je porast micelije na pH 4, pH 4.5, pH 5.2, pH 5.8, pH 6.5, pH 7.5. Ogljed je postavljen u sterilnim čašama zapremine 75 ml, na 35-40 ml hranljivog rastvora, na temperaturi od na 22° C

Merena je masa razvijene micelije, posle 28 (30) dana. Suva masa merena je po sušenju micelije 24 h na 65° C.

5.2.5. Uticaj različitih izvora azota na porast micelije ektomikoriznih gljiva

Kulture ektomikoriznih gljiva gajene su na podlogama u kojima je azot bio zastupljen u obliku NH_4^+ , NO_3^- , proteina Albumin bovin- BSA

Kao izvori azota korišćeni su $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (NPK Inžinjering, Srbija), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, (Centrohem, Srbija), BSA (Albumin, Fraction V, Merck, EU).

Sadržaj azota je iznosio 120mg/l²³ za $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ i Albumin bovine frakcija V. Da bi se obezbedio povoljan odnos C:N-20:1, u podlogu za ispitivanje uticaja različitih izvora azota dodavano je po 6 g glukoze. Iz ove podloge izostavljeni su organski izvori azota kao što su malc ekstrakt i ekstrakt kvasca (DAMES *et al.*, 1999; DAZA *et al.*, 2006).

Merena je masa razvijene micelije posle 50 dana, jer je posle 30 dana micelija nekih ispitivanih izolata -zbog smanjene količine hranljivih materija u rastvoru bila je jako slabo razvijena. Suva masa merena je po sušenju micelije 24 h na 65° C. Ogljed je postavljen u sterilnim čašama zapremine 75 ml, na 35-40 ml hranljivog rastvora, na temperaturi od 22° C.

5.2.6. Korišćeni softverski paketi

Podaci su analizirani jednosmernom analizom varijanse (ANOVA) i značajne razlike između tretmana razdvojene su Tukey B testom ($P < 0.05$). Za obradu je korišćen program SPSS 10 for Windows (SPSS Inc., Čikago, SAD).

²³ Da bi se obezbedio sadržaj od 120 mg N/l podloge upotrebljeno je 0.566 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ /l; 0.703 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ /l, 0.75 g BSA/l. Prema DAZA *et al.* (2006) 0.375 g BSA sadrži 60 mg N

5.3. Rezultati istraživanja

Svaki od ispitivanih izolata pokazao je neke specifičnosti. Razlike između izolata različitih vrsta u ukupnoj brzini rasta su očigledne. Najbrže rastu izolati *P. arhizus* i *C. amarellus*. Najsporije raste *Russula*, a zatim *Tricholoma* (*T. bastbii*). Kada se kultura jednom uspostavi, izolati *Lactarius* rastu brzo.

Međutim javile su se teškoće prilikom kultivacije pojedinih izolata, naročito na tečnoj hranljivoj podlozi. Jedan broj inokuluma nije nakon postavljanja u tečnu podlogu nastavio odmah da se razvija, ili se razvijao dosta usporeno u odnosu na druge. Zbog toga se, u slučaju oglada postavljenih na tečnoj podlozi, često zapažaju velike standardne devijacije. Iako su ogledi 3 puta ponavljani na istim substratima, dobijeni rezultati se za pojedine vrste ne trebaju smatrati konačnim.

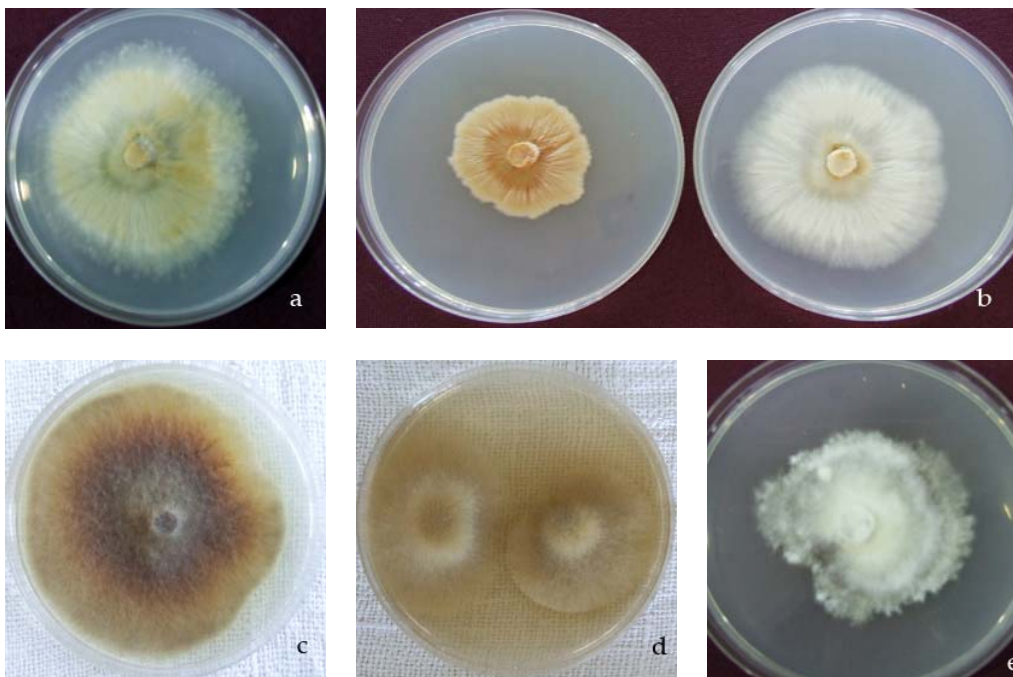
Porast na različitim izvorima azota je izuzetno spor jer su iz podloge isključeni drugi organski izvori azota kao što su malc ekstrakt i ekstrakt kvasca (koji sadrže i druge hranljive elemente važne za gljive). Osim toga u ovom ogledu je redukovana i količina glukoze, tako da mase micelija dobijene u dva oglada na tečnim podlogama nisu uporedive. Može se smatrati da je relativna greška merenja mase visoka, s obzirom da su suve mase ovih micelija jako male.

Na osnovu merenja unakrsnog prečnika micelija gljiva u Petri posudama u intervalima od 14, 21 i 28 dana, može se reći da je porast ispitivanih izolata pretežno linearan. Rezultati istraživanja predstavljeni su tabelama 17 - 20.

Tabela 17. Uticaj temperature na porast ektomikoriznih gljiva, izražen kao prečnik micelije obrazovane na agarnoj (MMN) podlozi posle 28 dana

izolat	prečnik micelije posle 30 dana (mm)		
	20 °C	22°C	25°C
<i>Chalciporus amarellus</i>	54,84±2,57 a	75,3±8,65 b	54,5±4,27 a
<i>Lactarius deliciosus</i>	39,33±5,16 a	57,87±5,72 b	39,20±4,18 a
<i>Russula sanguinaria</i>	20,80±1,30 a	25,12±2,48 b	22,8±1,81 a
<i>Suillus collinitus</i>	29,67±1,03 b	33,33±1,86 c	24,67±2,06 a
<i>Suillus granulatus</i>	30,67±4,0 a	47,17±4,12 b	35,5±4,77 a
<i>Tricholoma batschii</i>	31,4±1,82 a	34,65±2,19 b	36,4±2,12 b
<i>Tricholoma imbricatum</i>	33,5±2,98 a	36,37±3,20 a	43,87±3,68 b
<i>Pisolithus arhizus</i>	49,30±4,68 a	65,3±4,15 b	73,3±5,12 c
<i>Scleroderma sp.</i>	24,15±1,58 a	33,75±3,11 b	34,3 ±2,79 b

a-različita slova pokazuju pokazuju statistički značajne razlike u redu, prema Tukey B testu, $p>0,05$.



Slika 10. Micelije ektomikoriznih gljiva gajene na različitim temperaturama i različitim izvorima ugljenika: **a-** *Lactarius deliciosus* na podlozi sa saharozom, $t=22$ °C; **b-** *Lactarius deliciosus* na podlozi sa glukozom na 22 °C (levo) i na 25°C (desno); **c-** *Pisolithus arhizus* na podlozi sa glukozom $t=22$ °C; **d-** *Pisolithus arhizus* na podlozi sa ksilozom, $t=22$ °C; **e-** *Tricholoma imbricatum* na glukozim $t=22$ °C.

Tabela 18. Uticaj ugljenih hidrata na porast ektomikoriznih gljiva, izražen kao prečnik micelije (mm) obrazovane na agarnoj (MMN) podlozi posle 28 dana

izolat	ugljeni hidrati					
	glukoza	saharoza	dekstrin	arabinoza	ksiloza	skrob
<i>C. amarellus</i>	75,3±8,65 c	72,3±8,58 c	63,0±3,02 bc	62,25±16,39 bc	56,11±13 b	28,5±8,73 a
<i>L. deliciosus</i>	56,98±4,95 d	56,0±1,55 d	21,35±2,5 b	57,83±7,97 d	12,92±1,6 a	29,9±2,18 c
<i>R. sanguinaria</i>	25,12±2,47 d	23,0±1,49 c	25,5±1,84 d	23,25±1,48 c	9,92±0,9 a	15,4±1,95 b
<i>S. collinitus</i>	45,12±4,29 b	56,41±6,5 c	47,83±4,9 b	17,83±4,96 a	11,5±1,29 a	47,75±7,6 b
<i>S. granulatus</i>	52,08±10,21 b	84,0±2,64 c	61,3±21,1 b	30,58±4,25 a	20,42±3,6 a	27,6±10,4 a
<i>T. batschii</i>	33,5±3,10 c	30,7±6,5 bc	34,67±2,2 c	33,67±4,87 c	19,00±1,8 a	26,5±3,86 b
<i>T. imbricatum</i>	36,37±3,20 bc	41,2±4,51 cd	42,6±4,0 d	33,7±8,82 b	16,08±3,3 a	33,3±4,62 b
<i>P. arhizus</i>	65,3±13,24 cd	71,62±9,1 d	55,6±4,52 c	21,12±1,88 a	46,41±5,9 b	38,0±6,16 b
<i>Scleroderma</i> sp	34,3 ±2,79 c	29,10±1,4 b	34,90±2,2 c	15,57±1,45 a	45,83±2,3 d	29,82±3,2 b

a-različita slova pokazuju statistički značajne razlike u redu, prema Tukey B testu, $p > 0,05$.

Tabela 19. Uticaj pH na porast ektomikoriznih gljiva, izražen kao masa micelije ($\times 10^{-2}$ g) obrazovane na tečnoj hranljivoj MMN podlozi posle 28 dana

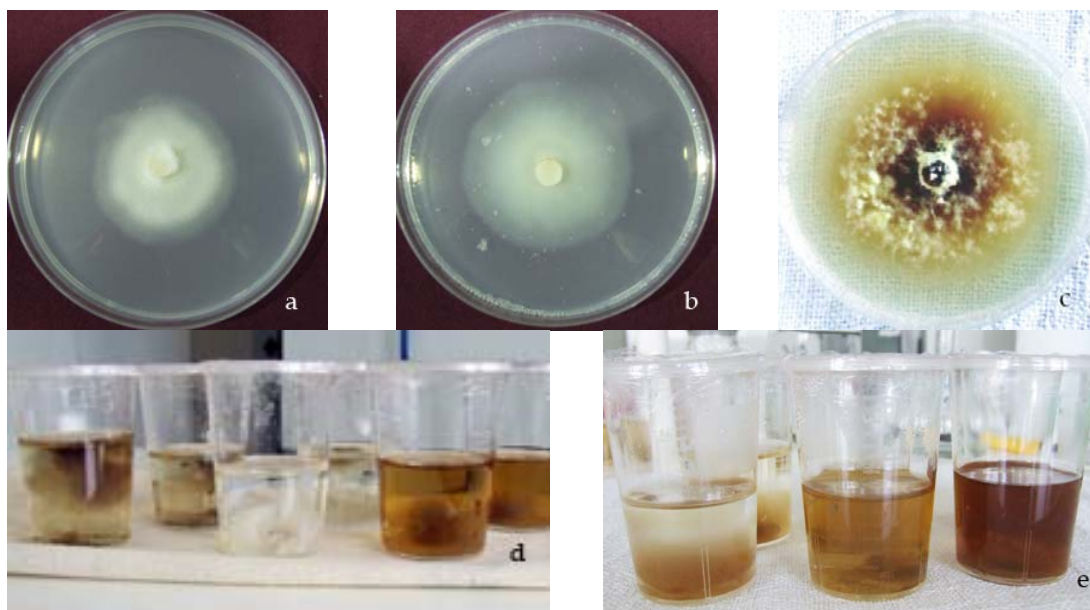
izolat	pH					
	4	4,5	5,2	5,8	6,5	7,5
<i>C. amarellus</i>	3,27±0,41 a	2,66±0,16 a	3,58±0,54 a	2,23±0,24 a	1,47±0,07 a	1,55±0,04 a
<i>L. deliciosus</i>	1,02±0,09 a	1,06±0,12 a	1,37±0,22 ab	1,72±0,29 b	1,53±0,24 b	1,25±0,11 ab
<i>R. sanguinaria</i>	0,5±0,11 a	0,6±0,14 a	1,0±0,2 b	1,1±0,3 a	1,1±0,1 a	1,1±0,1 a
<i>S. collinitus</i>	1,96± 0,29 ab	1,18±0,39 ab	1,32±0,43 ab	2,56±0,77 b	0,81±0,01 a	0,98±0,24 a
<i>S. granulatus</i>	1,83±0,57 a	2,62±0,5 a	2,97±0,85 a	2,14±0,87 a	1,43±0,53 a	2,61±0,68 a
<i>T. batschii</i>	1,36±0,62 a	1,17±0,15 a	1,86±0,60 b	1,80±0,87 b	1,56±0,45 b	1,11±0,03 a
<i>T. imbricatum</i>	0,44±0,12 ab	0,52±0,15 b	0,45±0,2 ab	0,67±0,27 b	0,39±0,23 a	0,23±0,13 a
<i>P. arhizus</i>	9,65±2 ,13 b	8,17±1,9 b	8,68±1,86 b	10,1±2,3 b	7,89±0,67 b	4,21±1,72 a

a-različita slova pokazuju statistički značajne razlike u redu, prema Tukey B testu, $p > 0,05$.

Tabela 20. Uticaj različitih izvora azota na porast ektomikoriznih gljiva, izražen kao masa micelije ($\times 10^{-2}$ g) obrazovane na tečnoj (MMN) hranjivoj podlozi posle 60 dana

izolat	azot u obliku		
	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	BSA
<i>C. ammarelus</i>	2,62±0,27 c	0,42 ±0,04 a	1,36 ±0,15 b
<i>L. deliciosus</i>	0,58 ±0,11 a	0,65 ± 0,09 ab	0,78 ±0,09 b
<i>R. sanguinaria</i>	1,85±0,14 b	1,60 ±0,16 b	0,41 ±0,04 a
<i>S. collinitus</i>	4,48±0,67 a	4,84 ±0,89 a	4,33 ±0,82 a
<i>S. granulatus</i>	4,52±0,37 a	4,32±0,33 a	3,66±0,65 a
<i>T. batchii</i>	3,88±0,44 c	2,40 ±0,38 b	1,54±0,26 a
<i>T. imbricatum</i>	2,43 ±0,16 b	2,30 ±0,16 b	1,06±0,14 a
<i>P. arbizus</i>	5,42 ±0,66 b	4,21 ±0,4 a	4,34 ±0,18 a
<i>Scleroderma sp</i>	4,54 ±0,76 c	2,57 ±0,26 b	1,02 ±0,09 a

a- različita slova pokazuju pokazuju statistički značajne razlike u redu, prema Tukey B testu, $p>0,05$.



Slika 11. Micelije ektomikoriznih gljiva gajene na različitim izvorima ugljenika i azota, i na različitim pH: **a-** *R. sanguinaria* na podlozi sa glukozom ($t=22$ °C); **b--** *R. sanguinaria* na podlozi sa dekstrinom ($t=22$ °C); **c-** *Chalciaporus amarellus* na podlozi sa dekstrinom; **d-** *Tricholoma batschii* na različitim pH (4, 5,2, 6,5); **e-** *Lactarius deliciosus* na različitim izvorima azota (NO₃⁻, NH₄⁺ protein)

Micelija *C. amarellus* najbolje raste na 22°C, a dobar porast pokazuje na svim ispitivanim izvorima ugljenih hidrata, mada slabije raste na skrobu. U zavisnosti izvora ugljenih hidrata, menja boju micelije. Najbolje raste na amonijačnom, a zatim na organskom i najslabije na nitratnom azotu.

L. deliciosus najbolje raste na 22°C, a od ugljenih hidrata na glukozu, saharozu i gotovo jednako dobro na arabinozi. Na ksilozi gotovo ne raste, dok na dekstrinu raste slabo (micelija je manjeg prečnika i tanka). Na glukozu je takođe micelija nešto gušća i razvija upadljivo zrakasto- radijalnu formu. Iako je na 22 °C zabeležen najveći porast micelije, mase micelije bolje je razvijena na 25 °C. Na 25 °C micelija ima tamniju narandžastu-*Lactarius* boju²⁴. Na podlozi sa NO₃⁻ boja micelije je intenzivnije narandžasta. *L. deliciosus* se najbolje razvija na organskim izvorima azota, a zatim na NO₃⁻. Na NH₄⁺ formira kompaktne loptice, dok je na NO₃⁻ micelija vazdušastija.

Od svih ispitivanih izolata u kulturi najsporije raste *R. sanguinaria*. Najbolje porast prečnika pokazuje na 22°C, a od ugljenih hidrata najbolje raste na skrobu i dekstrinu, a zatim na saharozu i arabinozi. Na ksilozi ne raste. Međutim, na podlogama sa glukozom i saharozom, micelije su bolje razvijene i kompaktnije, nego na dekstrinu, skrobu i arabinozi. Na 25 °C micelija je bolje razvijena i deblja u odnosu na miceliju koja se razvijala na 20 °C. Na 20 °C na podlozi sa glukozom micelija je gušća i kompaktija, dok je u svim ostalim varijantama ugljenih hidrata vrlo tanka i svetla. *R. sanguinaria* bolje raste na podlozi sa neorganskim izvorima azota, a na NH₄⁺ formira kompaktno razvijenu miceliju.

S. collinitus ima najveći porast prečnika micelije na 22 °C, a porast na 20 °C je bolji i statistički se značajno razlikuje porasta na 25°C. *S. collinitus* najveći prečnik ima na saharozu, zatim na dekstrinu, skrobu i glukozu. Međutim, i ovde je na glukozu micelija više kompaktna i gusta, tj. bolje razvijena. Vrlo slabo raste na arabinozi (iako je prečnik nešto veći, micelija je vrlo tanka, i urasta u podlogu), dok na ksilozi vrlo slabo raste, formirajući gusto vunastu miceliju. *S. collinitus* jednako dobro raste na svim izvorima azota.

Micelija *S. granulatus* najbrže raste na 22 °C, a bez razlike u brzini porasta na temperaturama 20 i 25°C. *S. granulatus* postiže najveći prečnik na saharozu, pa zatim na

²⁴ na 22 °C micelija je dosta svetlija na svim ispitivanim ugljenim hidratima

glukozi, i dekstrinu. Međutim na podlozi sa glukozom micelija je kompaktnija, gušća i jače pigmentisana nego na saharozi. Micelija na dekstrinu je bela, vunasto razvijena i gusta. Micelija razvijena na skrobu je tanka, dok vrlo slabo raste na ksilozi i arabinozi. Iako se na arabinozi formira kultura većeg prečnika, micelija koja se formira na ksilozi je veće gustine i tamnija.

S. granulatus se dobro i obilno razvija na svim izvorima azota.

Najbolji porast prečnika micelije kod *T. batschii* zabeležen je na 25 °C, ali bez razlike u odnosu na 22 °C. *T. batschii* najbolje raste na glukozu, dekstrinu i arabinozi, zatim na skrobu, pa na saharozi. Najslabije raste na ksilozi. Na podlozi sa glukozom, micelija je bela i naborana u centru, sa tamnijom žutom zonom u centru. Micelija *T. batschii* je tamnija na podlozi sa NO_3^- , i to je tamna (smeđa) boja plodonosnog tela. Bolje raste na neorganskom azotu.

T. imbricatum najbolje raste na 25 °C. Najbolji rast prečnika ima na dekstrinu, zatim na saharozi, pa na glukozu. Međutim, micelija je na glukozu gusto razvijena i bela, dok je na saharozi i dekstrinu tanja, pa je uprkos većem prečniku, ukupno razvijena masa micelije manja. Na ksilozi gotovo da ne raste. Na 25 °C micelija je gusta i zbijena, menjajući boju prema smeđoj boji (boji klobuka plodonosnog tela). Na 20 °C micelija je više horizontalno razvijena i tanka. Ona bolje raste na podlozi sa NH_4^+ , zatim na BSA, pa na NO_3^- .

P. arhizus najbolje raste na 25 °C, i to na saharozi i glukozu, a zatim na dekstrinu. U zavisnosti od izvora ugljenih hidrata, menja boju micelije. Najslabije raste na arabinozi, dok vrlo dobro raste i na ksilozi (posebno u poređenju sa drugim izolatima). Na svim izvorima azota *P. arhizus* se dobro razvijao, mada bolje na neorganskim. Na NO_3^- je zabeležena intenzivnija intenzivnija proizvodnja pigmentata²⁵. Boja na BSA i NH_4^+ je slična i svetlija.

Scleroderma sp. raste bolje na temperaturama od 22 i 25°C nego na 20°C. Ona pokazuje najbolji porast na ksilozi gde formira bujnu belu miceliju, koja je vrlo vazdušasta, a zatim na dekstrinu i glukozu. Vrlo slabo raste na podlozi sa dodatkom arabinoze, gde boji podlogu u sivkasto-ljubičastu boju (kada i micelija ima taj sivo-ljubičasti pigment).

²⁵ koji su karakteristični za *Pisolithus*, on se koristi za bojenje i po tome je vrsta dobila ime

Scleroderma sp. na organskom azotu boji podlogu u tamno i micelija je nešto tamnija, dok je najbolji porast zabeležen na podlozi sa amonijačnim azotom.

Prilikom ispitivanja uticaja pH na porast micelije gljiva, pokazalo se da su ispitivani izolati dosta tolerantni prema svim ispitivanim vrednostima pH. *S. granulatus*, *C. amarellus* i *P. arhizus* ne pokazuju izrazite razlike u porastu na različitim pH, dok *T. imbricatum*, *T. batchii*, *L. deliciosus* pokazuju najbolji porast na pH između 5,2 i 6,5, *R. sanguinaria* na 5,2, a *S. collinitus* na pH između 4,5-5,8.

5.4. Diskusija

Podaci o mogućnostima razlaganja substrata i karakteristike gljive u kulturi dopunjavaju sliku o trofičnom statusu gljiva, a naročito basidiomiceta (TEDERSOO *et al.*, 2010). Tokom ovog istraživanja ispitivan je porast micelija gljiva na različitim temperaturama i različitim pH, što može da bude značajno za poznavanje ekologije vrsta, kao i njihovo uspešno gajenje u kulturi.

Ispitivanje osobina pretpostavljeno ekološki važnih gljiva u šumama munike obezbedilo je osnovne fiziološke informacije o njima, kao i za izolate *P. arhizus* i *Scleroderma* sp., za koje se pretpostavlja da mogu da imaju značaj za mikorizaciju sadnica četinara u šumskim rasadnicima. Ove informacije do sada nisu bile poznate.

Razlike između izolata u ukupnoj brzini rasta su očigledne, kao i specifičnosti u pojedinačnim reakcijama izolata na različite izvore azota i ugljenika. Najbrže rastu izolati *P. arhizus* i *C. amarellus*. Ove vrste se takođe relativno jednostavno izoluju na hranljivim podlogama. Teško se izoluju *Tricholoma*, *Lactarius* i *Russula* vrste. Ali, pokazalo se da, kada se kultura jednom uspostavi, izolati *Lactarius* rastu brzo (mada na čvrstoj podlozi brže nego u tečnoj). Najsporije raste *Russula*, a zatim *Tricholoma* (*T. batschii*). U odnosu na druge vrste, *Suillus*-i se relativno lako izoluju.

HUTCHISON (1990) je predložio model po kome se linearan rast gljiva na standardnim ekstremnim temperaturama koristi za identifikaciju kultura gljiva. Ovaj princip primenili su kasnije u svojim istraživanjima DAMES *et al.* (1999), pri pokušaju da identifikuju izolate dobijene iz mikoriznih korenova, u kombinaciji sa morfotajpingom²⁶. U ranijim proučavanjima mikorize, identifikacija simbionta dobijenih iz korena domaćina je vršena na osnovu morfoloških poređenja sa izolatima dobijenim iz plodonosnih tela. Osnovni problem prilikom ovih istraživanja bio je to što mnoge vrste ektomikoriznih gljiva nikada nisu izolovane u kulture, što otežava proučavanje njihove ekologije u uslovima *in vitro* (TEDERSOO *et al.*, 2010).

Može se smatrati da većini gljiva za porast odgovaraju umerene temperature između 11-28 °C (HUTCHISON, 1990), dok su optimalne temperature za porast obično od 18-25 °C. Optimalna temperatura za rast izolata gljiva koje vode poreklo iz šume munike (osim *Tricholoma* izolata) je 22 °C, dok izolati *P. arhizus* i *Scleroderma* sp. brži porast pokazuju na višim temperaturama (25 i 28 °C) Ove razlike su očekivane s obzirom na poreklo izolata.

Prema MARX *et al.* (1982), *P. arhizus* najbrže raste na 28-30° C , a može da raste na 40- 42 °C, dok je termalna tačka smrti hifa na 45°C. Tolerancija gljive prema visokim temperaturama substrata može da predstavlja ključnu prednost za uspešne inokulacije sadnica u procesu rasadničke proizvodnje na otvorenom u uslovima submediteranske klime u Podgorici, kao i u uslovima umereno kontinentalne klime, te za upotrebu u pošumljavanju.

Uočljivo je da su na različitim temperaturama micelije različito razvijene i čak obojene. Prema MARX *et al.* (1970., cit .SANCHES *et al.*, 2001) ektomikorizne micelije su veoma osetljive na promenu temperature. Na primer, kada temperatura zemljišta padne, metabolička aktivnost i gljive i korena značajno opada što nepovoljno utiče na rast micelije i redukuje pristupačnost nutrijenata gljivi, što pospešuje obrazovanje sklerocija.

Ispitivani izolati dobro su rasli na rasli na pH između 4 i 7,5. Treba imati u vidu da se, prema ERLAND i SODERSTROM (1990), optimalan pH za rast gljive može razlikovati od optimalanog za mikorizaciju korena domaćina.

²⁶ različita brzina porasta micelija srodnih vrsta u kulturi, kao i razlike u optimalnim temperaturama mogu da se koriste kao dijagnostičko-taksonomska obeležja kod gljiva

Pokazalo se da su svi ispitivani izolati bili sposobni da koriste amonijačni, nitratni i proteinski (organski) azot kao izvore hrane. Može se reći da su razlike u sposobnosti gljiva da koriste različite oblike azota kvantitativne, pre nego kvalitativne.

S. granulatus, *S. collinitus* i *P. arbizus* izgleda da koriste ispitivane izvore azota sa jednakom efikasnošću. *T. imbricatum* i *R. sanguinaria* bolje rastu na neorganskim izvorima azota. *T. batschii*, *C. amarellus* i *Scleroderma* sp. najbolje rastu na amonijačnom azotu, dok *L. deliciosus* najbolje raste na organskom azotu. Istraživanja drugih autora (ABUZINADAH i READ, 1986; FINLAY *et al.*, 1992; READ *et al.*, 1989.) pokazuju da ECM gljive dobro rastu na podlozi sa NH_4^+ , koji se standardno koristi u hranljivim podlogama kao izvor azota. Ovo je očekivano utoliko što ektomikorizne gljive rastu u kiselj sredini sa akumulacijom organske materije, gde je amonijačni azot glavni oblik neorganskog azota (MARSCHNER 1995, READ *et al.*, 1989, DAMES *et al.*, 1999). Porast na nitratu kod ispitivanih izolata je nešto slabiji nego na amonijumu, sa izuzetkom *Lactarius*, koji raste bolje na NO_3^- . Ovaj rezultat je u skladu sa mišljenjem da, ektomikorizne gljive generalno mogu da koriste i nitratni i amonijačni azot, mada su neke razlike između različitih ektomikoriznih vrsta očigledne, što može da se odrazi na njihovu distribuciju (KELLER 1996, READ *et al.*, 1989.)

Upotreba NO_3^- kao izvora azota je do sada ispitana kod malog broja ektomikoriznih gljiva. Rezultati pokazuju da je upotreba NO_3^- veoma varijabilna kako između, tako i unutar vrste. (FRANCE i REID, 1984, HO i TRAPPE, 1987, ANDERSON *et al.*, 1999). Prema SCHEROM *et al.*, (2003, cit. NYGREN 2008) neki *Pisolithus* izolati izgleda da preferiraju NO_3^- u odnosu na NH_4^+ azot, dok druge vrste na NO_3^- pokazuju ograničen rast ili uopšte ne rastu. Prema novijim istraživanjima NYGREN *et al.* (2008), pokazalo se da 68 vrsta iz 17 rodova ektomikoriznih gljiva ima sposobnost da koristi NO_3^- kao jedini izvor azota. Ovo je zabeleženo i kod izolata koji vode poreklo iz borealnih šuma, gde zalihe nitrata mogu biti veoma niske.

Prema LAPEYRIE *et al.* (1991), u krečnjačkim zemljištima, u kojima je azot zastupljen najviše kao nitratni, stimulirana je ekskrecija oksalnih kiselina i ektomikorizne

gljive imaju ulogu agensa koji vrši rastvaranje putem acidifikacije i helatizacije²⁷ gvožđa (Fe), kalcijuma (Ca) i Aluminijuma (Al).

Jedno od ključnih pitanja ekologije ektomikoriznih gljiva, kao i simbiotskog drveća, je koliko je kod njih raširena sposobnost korišćenja organskog azota. S obzirom da ektomikorizne gljive predstavljaju komponentu četinarskih šuma u kojima je sadržaj mineralnog azota jako mali, smatra se da je kod njih raširena sposobnost korišćenja proteina kao izvora azota.

ABUZINIDAH i READ (1986) kategorisali su ECM gljive kao proteinske, ili ne-proteinske, tvrdeći da su neke vrste specijalizovane u korišćenju proteina, dok druge imaju veoma ograničene sposobnosti za to²⁸. Ova klasifikacija je ostala široko u upotrebi, mada je jasno da ektomikorizne gljive ispoljavaju značajne unutrašnje varijacije (CAIRNEY, 1999). Osim toga, NYGREN *et al.*(2008) su u studiji u koju je bio uključen veoma velik broj vrsta, pokazali da postoji čitav niz različitih reakcija između ova dva ekstrema.

Ogledi u kulturi pokazuju da ECM gljive mogu da koriste čitav niz amino kiselina i proteina kao jedini izvor azota i na taj način obezbeđuju biljkama-domaćinima pristup organskim izvorima azota (ABUZUNADAH i READ, 1986). Usvajanje N iz proteinskih izvora je demonstrirano kod aksenično gajenih mikoriznih biljaka *Betula pendula* Roth., *Picea mariana* (Mill.) Britton, Sterns & Poggenburg, *Pinus contorta* Douglas, *P. sylvestris*, *Eucalyptus grandis* W.Hill ex Maiden i *Corymbia maculata*(Hook.) Hill & Johnson (DAMES, 1999.)

Poznato je da se razgradnja proteina vrši se u prisustvu enzima - proteaza. Istraživanja su pokazala da pojedinačna vrsta gljive može da produkuje nekoliko različitih proteaza zavisno od izvora hranljivih materija i pH sredine. Sposobnost gljiva da raste na različitim izvorima azota kod velikog broja vrsta gljiva jasno ukazuje na strategiju da se sav raspoloživi azot mora usvojiti, čak i kada su određene vrste nutrijenata u zemljištu prisutne samo u tragovima (NYGREN, 2008).

²⁷ Helati su kisela metal-organska jedinjenja (gljive omogućavaju stvaranje helata)

²⁸ Smatra se da su ne-proteinske gljive značajne u novopodignutim šumskim zasadima (na novim staništima), dok proteinske gljive dobijaju na značaju sa starenjem plantaze i u drugoj rotaciji. Ovakva sukcesija gljiva je zapažena u brojnim ekosistemima, i ona prati uslovnu podelu na pionirske i gljive kasnije faze.

Drugo ekološki važno pitanje, odnosno prvo važno pitanje u ishrani gljiva je “iz kojih sve izvora gljiva može samostalno da koristi ugljenik”?, odnosno odakle sve može gljiva da se hrani? Uloga biljke u ektomikoriznoj simbiozi je da obezbedi gljivu sa ugljenikom. Smatra se da, sa nekoliko izuzetaka, ektomikorizne basidiomikote nemaju enzime za degradaciju celuloze i lignina (TEDERSOO *et al.*, 2010), mada po tom pitanju još uvek nisu izvedeni konačni zaključci. Prema DAMES *et al.* (1999) neke ektomikorizne gljive mogu da razlažu lignin, holocelulozu i celulozu usled čega predstavljaju uspešne kompetitore saprotrofa. Tokom našeg istraživanja zabeleženo je da određene gljive mogu da se razvijaju na polisaharidima kao što su skrob i dekstrin, što ukazuje na prisustvo enzima koji su sposobni da izvrše razlaganje ovih šećera (mada su ovde u pitanju veoma slabe α veze) na glukozu koje je gljiva u mogućnosti da usvoji. Određene vrste mogu da koriste arabinozu, a *Lactarius* čak i ksilozu, koja čini sastavnu komponentu hemiceluloze.

Zabeleženi su primeri da se ECM korenovi i rizomorfe razvijaju unutar panjeva drveta koje truli, što upućuje, prema DAMES *et al.* (1999) na izvesnu aktivnost celulaza. Rast ektomikoriznih korenova unutar ostataka mrtvog drveta može da bude značajan za održavanje mikoriznog diverziteta nakon poremećaja u ekosistemu kao što je čista seča ili da pomogne u očuvanju mikorize tokom sušnih perioda. Smatra se da ostaci drveta predstavljaju izvor hranjivih materija, a osim toga mogu da zadrže vlagu duže nego slojevi šumske stelje (DAMES *et al.*, 1999.).

Tokom ovog istraživanja zabeleženo je da se *P. arhizus* i *Scleroderma*, karakteristični rani kolonizatori sadnica, jako dobro razvijaju na ksilozi, koja čini sastavni deo hemiceluloze prisutne u svim ćelijskim zidovima. Ovo se može dovesti u vezu sa stanovištem da gljive rane faze imaju niže zahteve za asimilatima koji vode poreklo od domaćina i može da bude potvrda za pretpostavku da neke mikorizne gljive jedan deo ugljenika neophodnog za rast mogu da koriste iz organskih izvora.

Buduća istraživanja potrebno je usmeriti na proučavanje enzimatske aktivnosti gljiva. Na taj način moći će da se dobije potpunija slika o osobinama gljiva i da se razume zašto je diverzitet gljiva koristan za diverzitet biljaka, te koja je tačna uloga koje vrste gljive u simbiozi sa biljkom.

5.5. Zaključak

Sprovedeni ogledi pokazuju da postoje razlike u izgledu kultura iste gljive kada se ona razvija na različitim temperaturama, različitim izvorima azota, kao i očigledno različite reakcije vrsta gajenih na određenim ugljenim hidratima. One se odnose na opšti izgled, razvijenost i boju kultura, i posledica su nekih specifičnih biohemijskih reakcija do kojih dolazi u određenim kombinacijama.

Ispitivani izolati poreklom iz šume munike najbolje rastu na temperaturi od 22 °C, dok izolati *P. arhizus* i *Scleroderma* sp. bolje rastu na 25 °C.

Svi ispitivani izolati dobro su rasli na rasli na pH između 4 i 7,5.

Pokazalo se da su svi ispitivani izolati mogli da koriste amonijačni, nitratni i proteinski (organski) azot, kao i da su praktično svi imali sposobnost da koriste različite ugljene hidrate kao izvore hranljivih materija, mada su ove sposobnosti bile varijabilne između vrsta.

6. Mikorizacija u rasadničkoj proizvodnji

6.1. Uvod

Da bi se prilikom pošumljavanja obezbedio visok stepen preživljavanja sadnica na terenu neophodna je upotreba sadnica visokog kvaliteta (RADOGLU *et al.*, 2009), posebno u oblastima jugoistočne Evrope koje se odlikuju visokim temperaturama vazduha i zemljišta, niskom relativnom vlažnošću vazduha i malom količinom padavina.

Zemljišta razvijena na karbonatima preovladavaju u Crnoj Gori. Fizičke i hemijske osobine karbonatnih zemljišta, kao što su nisko zadržavanje vode (niska retenciona sposobnost), formiranje tvrde kore na površini, slaba struktura, visoka infiltracija i ispiranje jona, kao i niska pristupačnost nutrijenata predstavljaju glavne ograničavajuće faktore za razvoj šumskog drveća (RINCON *et al.*, 2007). U isto vreme, u semi-aridnim uslovima mediterana i submediterana, karakterističnim za jug Crne Gore, pošumljavanje je često ograničeno klimatskim uslovima koji se karakterišu produženim suvim periodima sa visokom temperaturom i padavinama koje su koncentrisane u nekoliko meseci. U severnom planinskom regionu Crne Gore nepovoljnosti vezane za pošumljavanje odnose se uglavnom na skraćeni vegetacioni period –dugotrajnu zimu na većim nadmorskim visinama i relativno niske temperature u dužem delu vegetacionog perioda, dok period letnje suše takođe može da bude izražen.

Brojne studije bavile su se optimizacijom rasadničke proizvodnje koja ima za cilj proizvodnju visoko kvalitetnih sadnica, koje bi mogle da unaprede pošumljavanja u semi-aridnoj zoni Mediterana, submediterana, kao i suvih kontinentalnih klimata. (RINCON *et al.*, 2007). Poznato je da se kada se prilikom pošumljavanja koriste sadnice koje su bez mikorize, javljaju problemi vezani za nedovoljno usvajanje nutrijenata i vode iz zemljišta, pa dolazi do prestanka rasta sadnica, ili do sušenja sadnica (PARLADE *et al.*, 1996). Sadnice bez mikorize dobro rastu na veštačkim substratima, kada imaju na raspolaganju dovoljno vode i rastvorenih hranljivih materija koje su im neophodne da bi zadovoljile potrebe rasta i transpiracije, ali nakon presađivanja, njihova sposobnost da absorbuju vodu i nutrijente iz

zemljišta može biti smanjena (PARLADE, 1996). Kada se nemikorizovane sadnice sade u zemljišta u kojima nema ektomikoriznih gljiva, one mogu propasti pre nego što dođe do prirodne kolonizacije korena ektomikoriznim gljivama. Smatra se da stepen preživljavanja i porast sadnica na ovakvim staništima može biti popravljen sadnjom sadnica sa dobro razvijenim ektomikorizovanim korenovim sistemom (MIKOLA, 1970; RIFFLE i TINNUS, 1982), tako da kontrolisana inokulacija sa željenim mikoriznim gljivama u rasadnicima može da predstavlja značajnu inicijalnu prednost za uspešno preživljavanje sadnice prilikom iznošenja na teren.

Mikoriza popravlja fiziološki status sadnice na taj način što poboljšava usvajanje vode i hranljivih materija iz zemljišta, zatim distribuciju ugljenih hidrata, kao i proizvodnju hormona rasta. U morfološkom pogledu, ektomikoriza ima veću površinu korena, preko kojeg se vrši absorpcija. Smatra se da do ovoga dolazi usled toga što gljiva proizvodi obilne trake hifa na korenu sadnica. One se razvijaju kao ekstrametrična micelija od korena prema okolnom zemljištu i povećava efikasnost absorbovanja nutrijenata i vode (BOWEN, 1973). Ona takođe utiče na produženu sposobnost absorpcije korenskih završetaka - produženi život korena (BOWEN, 1973). Na ovaj način mikoriza igra značajnu ulogu u zaštiti biljke protiv stresa izazvanog negativnim uticajima životne sredine kao što su suša, patogeni i zagađenje teškim metalima. Osim toga, ektomikorizni omotač služi kao fizička barijera koja sprečava gubitak vode i isušivanje (desikaciju) korena (RINCON *et al.*, 2007).

Za započinjanje programa proizvodnje mikoriziranih sadnica neophodno je izvršiti selekciju – odabrati ektomikorizne gljive, jer sve navedene osobine mogu da variraju u zavisnosti od vrste gljive. Osim toga, potrebno je razviti specifičan, posebno prilagođen proizvodni procesa proizvodnje mikoriziranih sadnica.

Pre-selekcija mikoriznih gljiva predstavlja važan korak za osnivanje programa inokulacije sadnica u šumskim rasadnicima (RINCON *et al.*, 2001). Preliminarna selekcija vrsta gljiva korišćenih u ovom istraživanju urađena je na osnovu literaturnih podataka i iskustava stranih autora u radu sa ektomikoriznim gljivama, kao i na osnovu rasprostranjenja- prisustva pojedinih vrsta u određenim šumskim zajednicama u Crnoj Gori.

Kriterijumi selekcije ektomikoriznih gljiva za mikorizaciju sadnica su zasnovani na fiziološkim i ekološkim razlikama koje postoje između različitih gljiva ili čak između strejnova iste vrste (MARX *et al.*, 1994 ; RINCON *et al.*, 2001). Oni uključuju: 1) simbiotsku kompatibilnost između gljive i domaćina, 2) ekološku adaptibilnost mikorizne gljive na mesto presađivanja, 3) sposobnost gljive da bude kompetativna sa gljivama koje prirodno rastu na mestu presađivanja i 4) jednostavnost proizvodnje inokuluma.

Smatra se da je neophodno proučiti gljive i njihove izolate iz autohtonih ili geografski bliskih populacija, jer su one adaptirane na uslove spoljašnje sredine na mestu pošumljavanja, odnosno primene na terenu i jer one predstavljaju izvor inokuluma koji može lako da se koristi. Osim toga brojna istraživanja potvrđuju da mogu da postoje određene specifičnosti ili razlike između različitih izolata iste vrste (CAIRNEY, 1999).

Započeta su istraživanja koja imaju za cilj da ocene različite vrste autohtonih ektomikoriznih gljiva, radi odabiranja (selekcije) i njihove kasnije upotrebe u proizvodnji mikoriziranih sadnica borova u šumskim rasadnicima.

Cilj ovog istraživanja bio je da odredi da li su odabrane vrste/izolati autohtonih ektomikoriznih gljiva 1) sposobne da izvrše inokulaciju kontejnerskih sadnica autohtonog crnog bora pod modifikovanim poljskim uslovima u Podgorici, 2) da se uporede efekti inokulacije sporama i micelijom za pojedine vrste, kao i 3) uticaj različitih koncentracija oba tipa inokuluma na formiranje ektomikorize i porast sadnica.

6.1.1. Izbor biljke domaćina

U programima pošumljavanja u Srbiji i u Crnoj Gori, koriste se kontejnerske sadnice *Pinus nigra*. Crni i beli bor se najčešće koristi pri pošumljavanju najnepovoljnijih terena u Srbiji (ŠIJACIĆ-NIKOLIĆ *et al.*, 2010). Kako smatra RANKOVIĆ (2009), borovi su u prošlosti imali nešto manji značaj za pošumljavanje od onog za koji se procenjuje da bi mogli da imaju s obzirom da na red za pošumljavanje dolaze upravo najsiromašnija i

najoskudnija staništa. Unapređenje proizvodnje sadnica ovih vrsta, prema ŠIJACIĆ-NIKOLIĆ *et al.* (2010), je primarni cilj šumarske nauke i struke.

P. nigra je, na osnovu literature koja nam je bila dostupna slabo obrađen u smislu mikoriznih simbionata i mikorize. U mediteranskom delu Evrope nekoliko različitih grupa istraživača (iz Španije i manje iz Francuske) rade na mikorizaciji sadnica *P. halepensis* i *P. pinaster*, a delimično i *P. pinea*, jer se ove vrste široko koriste za pošumljavanje u ovim regionima Mediterana. Sa druge strane istraživači iz Severne i Centralne Evrope od borova najviše rade sa belim borom, kao vrstom bora koja je najprimerenija njihovom klimatu-njihovim prilikama. Crni bor nalazi svoje ekološko mesto brdskim predelima Srbije i delom Crne Gore.

Brojna istraživanja i iskustva u mikorizaciji sadnica zabeležena su sa severnoameričkim vrstama borova.

6.1.2. Izabrane vrste mikosimbionta

Pisolithus arhizus je odabran jer postoje brojna dobra iskustva koja su vezana za njegovu upotrebu u mikorizaciji četinara. Dokazano je da je on ostvaruje simbiozu sa preko 50 vrsta drveća u prirodnim uslovima, i sa još 25 vrsta u uslovima *in vitro*²⁹. Sprovedena su i brojna istraživanja o reakciji biljke domaćina na inokulaciju sa *P. arhizus* pod različitim uslovima (CAIRNEY i CHAMBERS, 1997). Od 1970 *P. arhizus* se široko koristi programima inokulacije u šumarstvu i brojni protokoli za inokulaciju razvijeni su za ovu vrstu. Ona ulazi u sastav većine komercijalnih preparata za ektomikorizaciju sadnica. Smatra se biološkim oruđem za poboljšanje porasta i preživljavanja borova prilikom pošumljavanja na staništima slabog kvaliteta, na krčevinama ili prilikom rekultivacije površina.

P. arhizus se javlja u urbanim područjima, kao i na različitim šumskim staništima koja se odlikuju nepovoljnim uslovima spoljašnje sredine; može se naći u voćnjacima, i ponekad u šumskim rasadnicima.

²⁹ prema CAIRNEY i CHAMBERS (1997) dokazano je da izolati *Pisolithus*-a formiraju ektomikorzu sa domaćinima iz 20 rodova u ogleđima mikorizne sinteze

Smatra se da su stanišni uslovi nepovoljni na većini "lokaliteta" na kojima je potrebno izvršiti pošumljavanje, a da je *P. arhizus* adaptiran na ovakve uslove. Zbog toga sadnice borova sa *P. arhizus* mikorizom često imaju stopu preživljavanja i rasta koja je znatno iznad stope preživljavanja sadnica koje poseduju mikorizu formiranu od strane ektomikoriznih gljiva koje se spontano javljaju u rasadniku.

Prema MARX *et al.* (1982), *P. arhizus* je sposobna da raste na 40° - 42° C, najbrže raste na 28-30° C, dok je termalna tačka smrti hifa na 45°C. Prilikom započinjanja istraživanja, pretpostavili smo da tolerancija gljive prema visokim temperaturama substrata može da predstavlja ključnu prednost za uspešne inokulacije sadnica u procesu rasadničke proizvodnje u Podgorici, kao i za upotrebu u pošumljavanju.

U istraživanjima većeg broja autora, kao posledica inokulacije sadnica sa *P. arizus*, zabeležen je bolji porast sadnica, kao i povećana akumulacija fosfora i azota u asimilacionim organima biljke domaćina. Prisustvo *P. arhizus* može dovesti do većeg broja mineralnih transformacija, koje mogu značajno da utiču na pristupačnost određenih elemenata u zemljištu. Inokulacija sadnica četinara sa *P. arhizus* generalno dovodi do povećanja nivoa fotosinteze. Evidentno je da *P. arhizus* „privlači“ ugljenik koji vodi poreklo od domaćina, posebno u ranim fazama simbioze. Korišćenjem ¹⁴CO₂, CAIRNEY *et al.* (1989) su pokazali da se 18 puta više ugljenika akumulira u korenovima *Eucalyptus pilularis* Sm. koji je inficiran sa *P. arhizus*, nego u korenovima istog korenovog sistema koji nisu inficirani.

Koristi za biljku domaćina koje se ne odnose na ishranu ogledale bi se u tome što prisustvo *P. arhizus* na korenu može da redukuje deficit vode u uslovima umerene suše na taj način što gljiva obrazuje sistem obilnih i raširenih rizomorfi kojima pospešuje usvajanje vode, ili da ublaži osetljivost domaćina na toksične metale, prema kojima poseduje nisku osetljivost. Ona može redukovati akumulaciju Zn u izbojcima četinara, gajenim na jalovištima ili supstratima obogaćenim Zn u rasadnicima, tako što dolazi do povećanja koncentracije Zn u korenu. Infekcija sa *P. arhizus* može da redukuje akumulaciju Al u izbojcima borova i na taj način da ublaži njihovu osetljivost na Al. Dokazano je takođe da može da ublaži toksičnost Pb u odnosu na smrču (CAIRNEY i CHAMBERS, 1997).

P. arhizus takođe ima značaja u remedijaciji staništa kontaminiranih sa ksenobiotičnim organskim hemikalijama, mada su istraživanja na tom polju za sada bila malobrojna. Pokazalo se da pojedeni izolati *P. arhizus* mogu da degradiraju polihlorinisane bifenile, kao i da biotransformišu 2.4.6-trinitrotoluene (CHAIRNEY i CHAMBERS, 1997).

Poznato je da *P. arhizus* ima sposobnost da zaštiti sadnice od velikog broja zemljišnih patogena (MARX, 1972): između ostalog zabeleženo je da utiče na zaštitu *Pinus* vrsta protiv *Phytophthora*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* i *Cilindrocarpon* spp., u ogledima sprovedenim u staklenicima. Zaštitni efekat gljive se pripisuje delimično obezbeđivanju fizičke barijere usled razvoja ektomikoriznog omotača. Sa druge strane postoje brojni primeri *in vitro* inhibicije rasta velikog broja patogena u prisustvu micelije *P. arhizus*, što jasno ukazuje na proizvodnju antimikrobnih metabolita. Proizvodnja ovakvih sekundarnih metabolita još uvek nije potvrđena tokom simbioze sa domaćinom, ali je izvesno i razumljivo da se ovakvi sekundarni metaboliti ispoljavaju i u simbiotskoj miceliji *P. arhizus* u zemljištu (CHAIRNEY i CHAMBERS, 1997).

Osim toga, sledeće karakteristike čine *P. arhizus* vrstom koja je pogodna za praktičnu primenu:

Sporokarpi *P. arhizus* se lako identifikuju i bez mikroskopije, jer su jedinstvena po svojoj građi. Unutrašnjost plodonosnog tela sastoji se od velikog broja "zrnaca" –peridiola braon žute boje, u kojima su smeštene spore. Okolo se nalazi ovojnica-omotač u principu kožaste strukture i svelte (belo-sive) boje. Na preseku plodonosnog tela se zapaža sadržaj zrnaste strukture, jako bogatog kolorita (ukoliko je određene starosti) i različitog stepena zrelosti spora. Sazrevaju spore sa ruba-ivice plodonosnog tela i rasipaju se u obliku praha. Plodonosna tela su najčešće krupna, i formiraju se u grupama, tako da se i u slučaju pojedinačnih nalaza gljive, može obezbediti prilično velika količina materijala (spora) pogodnog za inokulaciju u programima rasadničke proizvodnje.

Smatra se da se ova vrsta u laboratoriji može lako gajiti na većem broju čvrstih ili tečnih podloga, što omogućava i olakšava rad na ispitivanju fizioloških karakteristika pojedinih izolata, i omogućava proizvodnju materijala za inokulaciju micelijom.

Karakterističan izgled formirane ektomikorize olakšava determinaciju i praćenje, kao i kvantitativnu ocenu ektomikorize koja se razvija na korenu sadnica.

P. arhizus je usvojen kao model organizam za istraživanja ektomikoriznih interakcija na molekularnoj osnovi jer su razvojni i funkcionalni aspekti simboize dobro dokumentovani (CAIRNEY i CHAMBERS, 1997).

Vrste iz roda *Suillus* pokazuju visok nivo specijalizacije prema domaćinu, u smislu specijalizacije prema četinarima, i njihova distribucija se podudara sa prirodnom distribucijom borova - vrsta iz familije *Pinaceae* (DAHLBERG i FINLAY, 1999; RUIZ –DIEZ *et al.* 2006.) One se, prema čestini i obimnosti plodonošenja, javljaju kao značajnije ektomikorizne vrste u mediteranskim šumama borova (RINCON *et al.*, 2006; RUIZ –DIEZ *et al.* 2006). Prema TORRES i HONRUBIA (1997), *Suillus*-i se mogu smatrati simbiontima rane faze, odnosno onima koji naseljavaju mlade biljke.

S. collinitus je vrsta koja se najčešće koristi za proizvodnju mikoriziranih sadnica *P. halepensis* u rasadnicima u Španiji i Francuskoj (TORES i HONRUBIA, 1994, HONRUBIA 2000; EL KALKUORI *et al.*, 2006, RINCON *et al.*, 2006; RINCON *et al.*, 2007). Dokazano je takođe da inokulacija sa *S. collinitus* povoljno utiče na osnivanje, kao i performanse plantaža alepskog bora (RINCON *et al.*, 2007, RUIZ –DIEZ *et al.*, 2006.), koji se široko koristi za obnavljanje šuma u semi-aridnim područjima Mediterana.

Suillus granulatus je vrsta koja je prema učestalosti i obilnosti plodonošenja dominantna u šumskim zajednicama munike u Crnoj Gori.

S. granulatus je korišćen ranijih decenija za mikorizaciju sadnica četinara u Severnoj Americi. RIFFLE i TINUS (1982) smatraju *S. granulatus* simbiontom koji ima značaja za *P. ponderosa* u određenim oblastima Severne Amerike (u severnom Great Plains), dok istraživanja CLEIN i REID (1982) pokazuju da micelija *S. granulatus* može uspešno da se koristi za mikorizaciju kontejnerskih sadnica *P. contorta* i *P. ponderosa*. Osim toga, *S. granulatus* je sa uspehom korišćen je i za mikorizaciju kontejnerskih sadnica tri vrste hrasta u Severnoj Americi (DIXON *et al.*, 1984).

Možemo smatrati da su *S. granulatus* i *S. collinitus* simbionti borova dobro adaptirani na uslove spoljašnje sredine u Crnoj Gori, ali isto tako i vrste na čiju se obilnost možemo

osloniti u smislu obezbeđivanja inokuluma spora u dovoljnoj količini. Prema TORRES i HONRUBIA (1994a) *S. collinitus* ima visok procenat vitalnih i aktivnih basidiospora u suspenzijama spora dobijenim iz plodonosnih tela.

Iskustva različitih autora po pitanju gajenja *Suillus* vrsta u kulturi su različita. Severnoamerički autori navode da neke vrste *Suillus-a* ne mogu da opstanu u toku mehaničkih manipulacija koje su potrebne prilikom pripreme inokluma ili naseljavanja substrata za rast sadnice (DIXON *et al.*, 1984). Ipak, jednostavna izolacija, brz porast u kulturi i specijalizacija prema domaćinima određenih vrsta može da utiče na porast upotrebe ovih gljiva u mikorizaciji sadnica četinarara i lišćara (TRAPPE, 1977; DIXON *et al.*, 1984). Istraživači sa evropskog Mediterana (RUIZ-DIEZ *et al.* 2006) smatraju da prednost u korišćenju nekih vrsta iz roda *Suillus* za inokulaciju putem micelije leži u tome što se one, za razliku od drugih ektomikoriznih vrsta, obično lako gaje u kulturi.

Od vrsta iz roda *Boletus* za inokulaciju sadnica crnog bora odabrali smo tri vrste čija smo plodonosna tela prikupili u leto 2009. u submediteranskim šumama hrasta.

Boletus L. je kosmopolitski rod ektomikoriznih gljiva, široko zastupljen u toplim predelima Severne hemisfere. Smatra se da ove vrste imaju veliki ekonomski značaj, pošto su vrlo cenjene u ljudskoj ishrani. Rod sadrži više od 1000 vrsta, i one formiraju ektomikorizu većinom sa biljkama iz familija *Pinaceae*, *Fagaceae* i *Betulaceae*. (AGUEDA *et al.*, 2006). Bilo je interesantno utvrditi da li će naveden vrganji ostvariti simbiozu sa crnim borom, i kako će se prema njemu odnositi u poređenju sa drugim vrstama. Drugi, eventualno značajniji aspekt primene ovih vrsta u rasadniku je kontrolisana inokulacija sadnica sa prvenstvenim ciljem proizvodnje jestivih plodonosnih tela ektomikoriznih gljiva. Tehnike inokulacije sadnica sa ovim ciljem su u najvećoj meri razvijene za tartufe, a manje za lisičarke i vrganje (PARLADE *et al.*, 2004). Na sličan način razmatrana je i upotreba jestivih vrsta *Lactarius-a* (PARLADE *et al.*, 2004).

Smatra se da bi "upravljanje" inokulacijom sa jestivim ektomikoriznim gljivama kao što su vrganji, lisičarke ili mlečnice, moglo da utiče na porast produktivnosti šuma. Ovo se naročito odnosi na Mediteranske ili submediteranske šume, koje se karakterišu ograničenim proizvodnim resursima.

U dosadašnjem radu sa vrganjima u kulturi bilo je dosta teškoća i može se reći da ove gljive slabo rastu na veštačkim hranljivim podlogama. *B. aestivalis* je relativno česta vrsta, veoma cenjena u ishrani. *B. luidus* je vrsta koja je relativno brojna i raširena u šumama hrastova, bukve, a beležena je i u šumama munike i bukve u submediteranskom pojasu Crne Gore. *B. fechtneri* je relativno retka vrsta sa malim brojem nalaza. Ove vrste vrganja upotrebljene su prvenstveno sa ciljem da se utvrdi da li se mogu da ostvare simbiozu sa crnim borom u ranom razvojnom stadijumu domaćina.

Xerocomus rubellus je vrsta koja je zabeležena u asocijaciji sa *Quercus ilex*. Bilo je interesantno da se uporedi njeno „ponašanje“ prema crnom boru, u odnosu na *Suillus* vrste koje su prikupljane u šumama munike, kao i vrganje, poreklom iz hrastovih šuma.

Za inokulaciju sadnica u rasadnicima, preporučuju se vrste iz roda *Sclerodema*. Ove gljive su rani kolonizatori korena i obrazuju velike količine rizomorfi koje pospešuju usvajanje vode iz zemljišta, što u području Mediterana može da bude važan faktor za selekciju vrste za rasadničku proizvodnju (RINCON *et al.*, 2001). Često se javljaju na staništima na kojima je došlo do poremećaja uslova životne sredine, pa se pretpostavlja da ih, kao i *Pisolithus*, dobro podnose. Kao perspektivni simbiont, ova vrsta takođe ulazi u sastav nekih komercijalnih preparata za mikorizaciju sadnica.

Gljive iz ovog roda javljaju se u simbiozi sa različitim drvenastim vrstama u rasadnicima, šumskim kulturama i u šumama (PARLADE *et al.*, 1996). Vegetativni inokulum *S. citrinum* korišćen je u rasadničkoj proizvodnji sadnica *P. resinosa* Ait. (TAKACS 1961, RICHTER i BRUHN 1987, cit, PARLADE *et al.*, 1996) ili su mikorizovane sadnice dobijane tretiranjem semena sporama, ili micelijalnim inokulumom (AZEVEDO, 1982. cit. PARLADE *et al.*, 1996). PARLADE *et al.* (1996) inokulirali su sadnice *Pseudotsuga menziesii* i *P. pinaster* suspenzijom spora *S. citrinum*. Inokulum spora *S. verrucosum* korišćen je za mikorizaciju sadnica *P. pinaster* (RINCON *et al.*, 2001).

Autori preporučuju inokulaciju sporama ove vrste, jer ona formira krupna, epigeična plodonosna tela, sa velikim brojem spora, koja je lako prikupiti.

Nalazi ove vrste u Crnoj Gori za sada su retki i poslužili su za dobijanje čiste kulture gljive. Nismo imali na raspolaganju zrele spore koje bi mogle da posluže za inokulaciju

sadnica. S obzirom na njihovu potencijalnu vrednost u mikorizaciji sadnica, u budućnosti im treba posvetiti više pažnje.

6.1.3. Vrsta ektomikoriznog inokuluma

Kada govorimo o metodama inokulacije sadnica u rasadniku, govorimo o:

1) inokulaciji sporama i 2) inokulaciji micelijom (vegetativni inokulum).

Oba metoda imaju određene prednosti i određene nedostatke, koje ćemo pokušati da predstavimo u najkraćim crtama.

6.1.3.1. Inokulum spora

Spore ektomikoriznih gljiva predstavljaju relativno čest, obilan i jeftin izvor inokuluma. Njihova upotreba datira još iz 18. veka kada su korišćene sa ciljem da se unapredi proizvodnja tartufa (PARLADE *et al.*, 1996), još pre nego što je stvarna priroda ektomikorize i bila utvrđena. Do sada su spore bile korišćene u šumskim rasadnicama za inokulaciju sadnica slobodnog korena, ili za inokulaciju kontejnerskih sadnica četinara (MOLINA i TRAPPE, 1982; MARX *et al.*, 1992; CASTELANO, 1994; PARLADE *et al.*, 1996; RINCON *et al.*, 2001.)

U odnosu na vegetativni-micelijalni inokulum, prednosti inokuluma spora su: 1) gljivu nije potrebno prethodno gajaiti u čistoj kulturi u laboratoriji; 2) za inokulaciju (primenu) je potrebna mala količina "materijala" - spora i 3) postoji mogućnost skladištenja - čuvanja spora određenih vrsta ektomikoriznih gljiva.

U osnovne nedostatke inokulacije sporama spadaju: 1) problemi u određivanju vitalnosti spora, 2) nepravilno plodonošenje pojedinih ektomikoriznih gljiva i 3) nedostatak genetičke definicije spora sa kojima se radi inokulacija (MARX i KENNEY, 1982).

Formiranje mikorize pri upotrebi inokuluma spora je vremenski odloženo u poređenju sa inokulacijom vegetativnim inokulumom, što se takođe smatra nepovoljnim u procesu rasadničke proizvodnje (MARX i KENNEY 1982; BRUNETT *et al.*, 1996).

U odnosu na način primene, ovaj metod se takođe može smatrati vrlo jednostavnim i ekonomičnim, pogotovo što spore mogu da budu inkorporisane u vodu koja se koristi za zalivanje (MILLER *et al.*, 1993; TORES i HONRUBIA, 1994).

6.1.3.2. Vegetativni inokulum

Upotreba vegetativnog inokuluma se preporučuje kada se radi sa odabranim strejnovima gljiva (RINCON *et al.*, 2001) jer jedino tako možemo smatrati da se radi o genetički identičnom materijalu. Dosadašnja istraživanja jasno su pokazala da ektomikorizne gljive ispoljavaju velike varijacije unutar iste vrste gljive, koje se odnose na veliki broj fizioloških i drugih karakteristika. Varijacije ovih karakteristika mogu se javiti kao posledica različitog geografskog porekla ili biljke domaćina za različite izolate iste vrste. Smatra se da neke od zapaženih unutarvrstnih varijacija kod ektomikoriznih gljiva predstavljaju ekotipske varijacije prema nepovoljnim uslovima spoljašnje sredine u različitim geografskim regionima, ili u odnosu na lokalnu heterogenost edafskih uslova (CAIRNEY, 1999). Unutarvrstne varijacije kod ektomikoriznih gljiva još uvek se istražuju, kao i njihovi uzroci. Smatra se, čak, da treba ispitivati veći broj izolata iste vrste iz širih populacija. U dosadašnjim studijama pokazano je da unutarvrstne varijacije postoje u odnosu na sledeće osobine ektomikoriznih gljiva: porast micelije, interakcija između biljke domaćina i gljive, upotreba azota, enzimaska aktivnost, osetljivost prema metalima (Cu, Al, Zn, Cd, itd), temporalna osetljivost (podrazumevajući pod tim osetljivost tokom održavanja u kulturi), varijacije u porastu, itd. (CAIRNEY, 1999). Zbog svega ovoga, u nekim slučajevima može biti važno korišćenje tačno određenog izolata- genotipa gljive i njegovo forsiranje u rasadničkoj proizvodnji. Za nas je značajno da ispitamo karakteristike izolata iz autohtonih i geografski bliskih populacija ektomikoriznih gljiva, i utvrdimo njihov stvarni potencijal za rasadničku proizvodnju sadnica.

Osovni problem za upotrebu vegetativnog inokuluma pri planiranju rasadničke proizvodnje je što su nam neophodne velike količine vitalnog inokuluma. Poznato je takođe da se čuvanje vegetativnog inokuluma obično negativno odražava na njegovu efektivnost.

6. 1. 4. Inokulaciona doza

Za praktičnu inokulaciju sadnica u rasadniku, potrebno je odrediti efektivnu dozu primene određenog inokuluma. Količina potrebnog inokuluma direktno određuje njegovu upotrebljivost za rasadničku proizvodnju, jer se radi o proizvodnji velikog obima. Na osnovu pregleda literature, zapaža se da su iskustva u ovom pogledu različita. Interesantno je zapažanje da primenjeni u visokoj koncentraciji, pojedini tretmani mogu imati negativnog efekta na proces mikorizacije ili na rast i razvoj biljke domaćina. Niske koncentracije, što je očekivano, nemaju zadovoljavajuće efekte.

Neka ranija istraživanja pokazuju da inokulumi spora *P. arhizus* primenjeni na nivou 10^3 - 10^5 na sadnice *P. pinea* uglavnom nemaju, ili imaju slab efekat (RINCON *et al.*, 2001), dok se dobri rezultati postižu sa 10^6 - 10^8 spora/biljci. Inokulacija sporama *Scleroderma verrucosum* daje dobre rezultate pri primeni 10^5 - 10^8 spora/sadnici *P. pinea*. *Melanogaster ambiguus* i *Rhizopogon subareolatus* su primenjivani u koncentraciji 10^2 - 10^7 spora/sadnici *Pseudotsuga mensiesii* (PARLADE, *et al.*, 1996), pri čemu su dobri rezultati postizani pri tretmanima 10^6 i 10^7 , srednje dobri sa 10^5 za *M. ambiguus*, i 10^4 i 10^5 za *R. subareolatus*. U isto vreme tretman sporama *Tuber maculatum* daje dobre rezultate sa 10^3 i 10^4 spora/ sadnici *P. mensiesii*, i srednje sa 10^2 . *M. ambiguus* (10^6 - 10^7), *R. luteolus* (10^3 - 10^8) i *R. roseolus* (10^3 - 10^8) takođe su uspešno korišćeni za mikorizaciju sadnica *P. pinea* (RINCON *et al.*, 2001).

Istraživanja RINCON *et al.* (2001) pokazuju takođe da je vegetativni inokulum *P. arhizus* efektivan jedino ukoliko se primeni u visokom odnosu (1:4 i 1:8) u substratu. Upotreba vegetativnog inokuluma u brojnim istraživanjima daje rezultate već u odnosu 1:20, do čak 1:32 ili 1:64 za pojedine simbionte i pod optimalnim uslovima spoljašnje sredine.

6.2. Materijal i metod

6.2.1. Mikorizni simbiot (gljiva)

Sporokarpi pretpostavljeno mikoriznih gljiva prikupljeni su u sa različitih lokaliteta u Crnoj Gori. Datum, mesto i biljka domaćin za prikupljene gljive dati su u tabeli 4. Izvršena je taksonomska identifikacija i izolacija gljiva u čiste kulture, kao što je to opisano u poglavlju 2.

Tabela 21. Gljive korišćene za inokulaciju sadnica *Pinus nigra*, poreklo materijala i način na koji je izvršena inokulacija sadnica

br	vrsta/izolat	domaćin i lokalitet	vreme sakupljanja	način inokulacije i doza					
				vegetat. inokul.			inokulum spora		
				1:4	1:8	1:16	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
1	<i>Pisolithus arhizus</i> (Scop.)Rauschert (PT1-X-08)	<i>Cedrus atlantica</i> , Podgorica	10.09.2008.	+	+	+	+	+	+
2	<i>Scleroderma</i> sp. (ScT-X-08)	<i>Eucaliptus</i> , Tivat	25.10.2008.	+	+	+			
3	<i>Suillus granulatus</i> (L.)Rousell (SGG1)	<i>Pinus heldreichii</i> , Građen	24.06.2007.	+	+	+			
4	<i>Suillus granulatus</i> (L.)Rousell	<i>Pinus heldreichii</i> Korita	13.06.2009.				+	+	+
5	<i>Suillus granulatus</i> (L.)Rousell (II)	<i>Pinus heldreichii</i> Račama	8.07.2009				0,5	0,5	0,5
6	<i>Suillus colinirus</i> (Fr.)Kuntze II	<i>Pinus heldreichii</i> Korita	13.06.2009.				+	+	+
7	<i>Xerocomus rubellus</i> (Krombh.) Quél.	<i>Quercus ilex</i> , Pg	06.07.2009.				+	+	+
9	<i>Boletus luridus</i> var. <i>luridus</i> Schaeff.	<i>Quercus cerris</i> , Kržanja	12.07.2009.					+	
10	<i>Boletus aestivalis</i> Paulet:Fr	<i>Quercus cerris</i> Kržanja	12.07.2009					+	
11	<i>Boletus fechtneri</i> Velen	<i>Quercus cerris</i> Kržanja	12.07.2009					+	

II – ponovljena inokulacija sporama sa 0,5 x inokulaciona doza

6.2.2. Biljni materijal

Seme *P. nigra* dobijeno je iz Semenskog Centra u Užičkoj Požegi i vodi poreklo sa lokaliteta Šaranske šume (UTM 34, X 381897, Y 4853549, Srbija).

Tretman semena pre setve podrazumevao je potapanje semena u vodu tokom noći, i površinski sterilisano potapanjem u 3% H₂O₂ u trajanju od 20-25 minuta. Posle potapanja u vodonik peroksidu, seme je ispirano vodom, prosušeno i sejano (LANDIS, 1989).

6.2.3. Inokulacija sadnica

Sinteza mikorize obavljena je na kontejnerskim sadnicama pod staklom u kontejnerima QP 84T/11.5 (Quick Pot, HerkuPlast-Kubern GmbH, Nemačka). Inokulacija supstrata je urađena pre setve semena, mešanjem različitih količina spora *P. arhizus* ili vegetativnog inokuluma za sve vrste gljiva primenjene na ovaj način (*P. arhizus*, *S. granulatus*, *Scleroderma* sp.). Spore vrsta iz roda *Suillus*, *Xerocomus* i *Boletus* primenjene su u vidu suspenzije spora, koja je injektovana u rizosveru klijavaca crnog bora 2.5-3 meseca po setvi semena.

6.2.3.1. Proizvodnja vegetativnog inokuluma i inokulacija

Za dobijanje vegetativnog inokuluma, micelije gljiva su gajena u tečnoj kulturi (26.12.2008 - 23. 01. 2009.) ili na čvrstoj hranljivoj podlozi i zatim je (23.01.2009) prebačena u staklene posude zapremine 0,4 -0,7 litara u kojima se nalazio vermikulit natopljen MMN hranljivom podlogom (glukoza redukovana na 2,5 g/l) do poljskog kapaciteta (dok podloga nije prekrila vermikulit) i autoklaviran (20 min, 120°C) (RINCON *et al.*, 1999).

Vegetativni inokulum mešan je sa substratom koji se sastojao od mešavine treseta (Gramafloor, Nemačka) i veremikulita (1:1) u odnosu 1:4, 1:8 i 1:16, vodeći računa da udeo treseta u ukupnoj smesi ostane oko 0,5 ne zavisno od kolicine dodatok vermikulita koji je predstavljao inokulum. Kontejneri su napunjeni inokulisanim substratom i setva semena crnog bora izvršena je 30. marta 2009. U svakom tretmanu inokulisano je po 28 biljaka.

6.2.3.2. Inokulacija sporama

6.2.3.2.1. Inokulacija sporama *Pisolithus arhizus*

Za inokulaciju sporama, plodonosna tela *P. arhizus* su očišćena od primesa zemlje, osušena i do momenta upotrebe čuvana na sobnoj temperaturi. Spore su dobijene iz plodonosnih tela pažljivim čišćenjem i izdvajanjem dela koji se sastoji uglavnom od mase spora, i njegovim mrvljenjem u laboratorijskom avanu (CASTELLANO i MOLINA, 1989; PARLADE *et al.*, 1996).

Inokulacija sporama *P. arrhizus* izvršena je pre setve semena, na taj način što je određena količina spora koja odgovara koncentraciji 10^8 , 10^7 i 10^6 spora/biljci i pomešana sa vermikulitom, a zatim ponovo sa substratom (treset : vermikulit 1:1) za setvu semena. Koncentracija spora određena je pomoću hematocitometra. U svakom tretmanu inokulisano je po 28 biljaka, u 2 ponavljanja.

6.2.3.2.2. Inokulacija sporama *Suillus* spp, *Boletus* spp. i *Xerocomus rubellus*

U 5 kontejnera izvršena je setva semena *P. nigra* u mešavina treseta i vermikulita 1:1 (31.03.2009) za inokulaciju suspenzijom spora.

Suspenzija spora odabranih vrsta gljiva pripremana je nakon prikupljana plodonosna tela ovih gljiva u vreme plodonošenja. Sporonosni sloj sa cevčicama pažljivo je odvajan od ostalog dela plodonosnog tela i u svežem stanju (dan ili dva po sakupljanju) mešan sa destilovanom vodom i mleven u blenderu, da bi došlo do oslobađanja spora (TORES i HONRUBIA, 1994). Koncentracija spora u suspenziji računata je pomoću hematocitometra, i suspenzija je razblaživana da bi se dobile željene koncentracije od 10^8 , 10^7 i 10^6 spora/biljci (primenjene u 10 ml suspenzije spora po biljci).

Materijal za inokulaciju sporama *S. granulatus* i *S. collinitus* sakupljen je na Koritima 13.06.2009. Suspenzija spora pravljena je 15. 06. 2009, a inokulacija izvršena 17.06. 2009. Pošto je u periodu neposredno posle inokulacije (17-25 06. 2009) usledila velika količina padavina (21-23 06. oko 79 mm - litara kiše /m²) na biljke u kontejnerima, inokulacija je ponovljena. Ponovni tretman sadnica sa suspenzijom spora *S. collinitus* je urađen 3. 07. 2009. sa u pola smanjenom količinom spora po biljci ($0,5 \times 10^8$, $0,5 \times 10^7$ i $0,5 \times 10^6$). Suspenzija spora čuvana je na +4°C u periodu 17. 06. - 03.07. 2009. Prema TORES i HONRUBIA (1994) suspenzija spora *Suillus* vrsta stabilna je u kratkom vremenskom periodu i može da se čuva do 30 dana na 3-4 °C, a da ne dođe do gubitka vitalnosti spora. Za ponovljenu inokulaciju sporama *S. granulatus* sakupljen je nov material na Račama (Kući) 10. 07. 2009. i ona je izvršena 12. 07. 2009 ($0,5 \times 10^8$, $0,5 \times 10^7$ i $0,5 \times 10^6$)

16. 07. 2009. izvršen je tretman sporama *X. rubellus*, sa 10^6 , 10^7 i 10^8 spora/biljci, a *Boletus luridus*, *B. aestivalis* i *B. fechtneri* sa 10^7 spora / biljci.



Slika 12. Inokulum ektomikoriznih gljiva. *Suillus granulatus* (L.)Rousell: a-plodnosno telo (foto B. Perić), d- spore na hematocitometru, g- micelija u tečnoj kulturi, j-suspenzije spora pripremljene za inokulaciju (10^8 , 10^7 , 10^6 spora/10 ml), k- vermikulitski inokulum; *Pisolithus arhizus* (Scop.)Rauschert: b, c- plodnosno telo, i- micelija u tečnoj kulturi; *Sclerderma* sp.: f-plodnosno telo, h- micelija na agarnoj podlozi.



Slika 13. Inokulisane sadnice *Pinus nigra*: d, e, f- jednogodišnje sadnice tretirane sporama *Pisolithus arhizus*; g, h- dvogodišnje sadnice tretirane micelijom i sporama *Suillus granulatus*; b -koren sadnice tretirane vegetativnim inokulumom *Scleroderma sp.*; c- *S. granulatus* u šumi *P. heldreichii*.

6.2.4. Tok ogleđa: gajenje i nega biljaka

Seme *P. nigra* sejano je sa 2 semena po mestu, da bi se obezbedilo klijanje. Pet nedelja po setvi (05.05.) izvršeno je proređivanje ponika na jednu biljku.

Setva semena, klijanje i inicijalni razvoj biljaka (od setve do proređivanja i još nedelju dana) biljke su držane pod staklom i po potrebi su zasenjivane. Po iznošenju na otvoreno su blago zasenjivane ili zasenjivane u periodu od maja do avgusta. Zalivanje je vršeno po potrebi, dnevno, do tri puta nedeljno u periodu april-septembar.

Za prihranjivanje biljaka korišćeno je 2g/l folijarnog đubriva Morton ijc plus NPK 19: 9: 27, (ZIKO s.a., Grčka) i 0.5 g/l Fertilion Combi 2 (COMPO GmbH & Co.Kg, Nemačka), primenjenog dodavanjem rastvora đubriva u rizoseru biljke, pri čemu je svaka biljka primala po 10 ml rastvora. U periodu 05.05-02.09. bilo je ukupno 6 tretmana đubrenja (12.06., 29.06., 15.07., 3.08., 16.08., 2.09.), s tim da je 05.05. korišćeno jedino Morton ijc plus NPK 19: 9: 27 đubrivo.

Preventivni tretman semena posle setve podrazumevao je zalivanje sa Benomyl Wp-50 (Zorka, Srbija) u koncentraciji 0.05%. Tretman je ponovljen posle 7 dana, i kasnije kada su biljke počele da niču, posle 16 - 21 dan od setve semena.

6.2.5. Mereni parametri i statistička analiza

Uzorci za analizu uzeti su 11 meseci po postavljanju ogleđa, u toku februara 2010. Uzeto je po 12 biljaka iz svakog tretmana (3x4 biljke), čiji je koren pažljivo opran i očišćen od substrata. Merena je visina i prečnik vrata korena sadnice. Određen je procenat mikorizacije korena. Radi merenja suve mase biljke su osušene u sušnici (60°C, 48h). Merena suva masa nadzemnog izdanka i suva masa korena, i računat odnos mase korena prema masi nadzemnog izdanka sadnice. Podaci su analizirani jednosmernom analizom varijanse (ANOVA) i značajne razlike između tretmana razdvojene su Dulkanovim testom ($P < 0.05$). Za obradu je korišćen program SPSS 10.0 for Windows (SPSS Inc., Čikago, SAD).

Koren svake sadnice sečen je na segmente veličine 2-3 cm i analiziran pod binokularnom lupom (uvećanje do 40x). Vrhovi korena su razdvajani kao mikorizni ili nemikorizni na osnovu prisustva ili odsustva omotača i ekstramatične micelije i odsustva ili prisustva korenovih dlaka. Mikorizovani vrhovi korena su razvrstavani na različite morfotipove na osnovu karakteristika kao što su tip grananja, boja, tekstura, prisustvo ekstramatične micelije ili rizomorfi. Kod korenski završetaka na kojima karakteristike ektomikorize nisu bile jasno razvijene, proveravano je prisustvo Hartigove mreže na poprečnim presecima korena. Procenat mikorizacije i klasifikacija korenskih vrhova rađen je na uzorku od najmanje 200 korenskih završetaka po sadnici (RINCON *et al.*, 2001).

Za procenu nivoa mikorizacije sadnica, modifikovan je i primenjen metod MARX *et al.* (1994). Korenčići su podeljeni na sledeće morfotipove:

- a- ne razgranati-pojedinačni
- b- koraloidni sa manje od 4 vrha
- c- koraloidni sa 4-10 vrhova
- d- višestruko koraloidni sa više od 10 vrhova.

Urađeno je grupisanje dobijenih rezultata za različite tretmane i formirane skale za ocenjivanje ocenama 1-3.

U tabeli 22 prikazano je kako su ustanovljene ocene za mikorizu koju formira *P. arhizus*.

Tabela 22. Ocenjivanje ektomikorize na osnovu morfologije i prisustva različitih morfotipova za *P. arhizus* na sadnicama *P. nigra*

ocena	ektomikorizni morfotipovi			
	ne razgranati, pojedinačni	koraloidni < 4 vrha	koraloidni 4 -10 vrhova	višestruko koraloidni > 10 vrhova
1	150-155	25-30	10	10
2	130-140	25-55	10	5-10
3	95	55-65	10-35	15-30

Pošto su mikorize različitih gljiva međusobno različitih morfoloških karakteristika, primenjene su drugačije skale za ocenu mikoriza poreklom od *P. arhizus* i *Suillus* vrsta. Ocenjivanje razvijenosti mikoriza na sadnicama tretiranm *Suillus*-ima prikazano je u tabeli 23. Treba smatrati da se ocene 1-3 u međjusobno uporedive, tj da imaju relativno jednake vrednosti za sve tretmane u ovom ogledu.

Tabela 23. Ocenjivanje ektomikorize na osnovu morfologije i prisustva različitih morfortipova za *Suillus granulatus* i *S. collinitus* na sadnicama *P. nigra*

ocena	ektomikorizni morfortipovi			
	ne razgranati, pojedinačni	koraloidni < 4 vrha	koraloidni 4 - 10 vrhova	višestruko koraloidni > 10 vrhova
1	130-150	30-40	10-20	< 10
2	100-130	50-80	10	10
3	≈ 100	> 50	>20	>10

Posebne skale nisu razvijane za ostale vrste kojima je vršeno tretiranje, jer je u većini slučajeva stepen razvijenosti mikorize takav da mu odgovara ocena 1. Jedino se u tretmanu vegetativnim inokulumom *Scleroderma* sp. javlja ocena 2.

6.3. Rezultati istraživanja

U kontejnerima u kojima je urađena inokulacija substrata pre setve, klijanje semena počelo je posle 8-10 dana, i u periodu od 14 dana (do 13.04.) klijalo je oko 80% semena. U kontejnerima u kojima je sejano seme *P. nigra* za buduću inokulaciju sporama ektomikoriznih gljiva, kao i za kontrolu (bez prethodne inokulacije substrata) seme je počelo sa klijanjem kasnije, ali je u toku 3 nedelje (21 dan) klijalo svo seme.

Procenat preživljavanja sadnica tokom oglada bio je visok i iznosio je oko 97 %.

Prečnik u vratu korena, za biljke u svim tretmanima, iznosio je 1,7- 2,0 mm.

Visina nadzemnog idanka kretala se između 72,5 i 110 mm

Ukupna suva masa sadnice bila je u intervalu 0,52-0,85 g

Suva masa nadzemnog izdanka iznosila je 0,31-0,51 g

Suva masa korena iznosila je 0,18-0,31 g.

Odnos mase korena, prema masi nadzemnog izdanka - koeficijent K/I kretao se u intervalu 0,48-0,66.

Pokazalo se da je prečnik sadnica u vratu korena prilično ujednačen, s tim što se blago izdvajaju tretmani sa *P. arhizus* i tretman micelijom *S. granulatus*.

Visine i mase nadzemnog izdanka su veće prilikom inokulacije micelijom (*P. arhizus*, *Scleroderma* sp., *S. granulatus*) nego sporama, kao i masa korena. Visina i masa nadzemnog izdanka sadnica inokuliranih sporama *S. granulatus* i *S. collinitus* je najmanja. U isto vreme, ovi tretmani pokazuju najbolji stepen razvoja mikorize na korenu.

6.3.1. Uporedna inokulacija vegetativnim i inokulumom spora

6.3.1.1. *Pisolithus arhizus*

Karakteristike rasta sadnica *P. nigra* i razvijenost mikorize 11 meseci posle setve semena i inokulacije inokulumom micelije i inokulumom spora *P. arhizus* prikazane su u tabeli 24.

Inokulacija micelijom i sporama *P. arhizus* je pozitivno uticala na visinu nadzemnog izdanka sadnica crnog bora. Najveća visina nadzemnog izdanka zabeležena je u tretmanima prilikom inokulacije micelijom, i ona se statistički razlikuje od kontrole.

Prečnik vrata korena je najveći u slučaju inokulacije sporama u najvišoj dozi ali nisu zabeležene statistički značajne razlike između tretmana. Inokulacija nije uticala na suhu masu nadzemnog izdanka, kao ni suhu masu korena, ali je uticala na odnos mase korena/nadzemnog izdanka. Povoljniji odnos koren/nadzemni izdanak dobijen je prilikom inokulacije sporama, kao i vegetativnim inokulumom u najvišoj dozi. Kod kontrolnih sadnica odnos masa koren/nadzemni izdanak je najbolji, ali je to posledica slabijeg razvoja nadzemnog izdanka, a ne dobrog razvoja korena.

Jedanaest meseci posle inokulacije vegetativnim ili inokulumom spora, mikoriza je bila razvijena na svim sadnicama sa oko 100% mikoriznih vrhova korena. Stepen razvoja mikorize na vrhovima korena sadnica bio je različit. Na osnovu vizuelne procene morfologije i prisustva različitih morfortipova, najbolje razvijena mikoriza zabeležena je na sadnicama tretiranim vegetativnim inokulumom u odnosu 1:4, kao i inokulumom spora sa 10^6 spora/biljci (ocena 3).

Tabela 24. Karakteristike rasta sadnica *P. nigra* i razvijenost mikorize 11 meseci posle setve semena i inokulacije inokulumom micelije i inokulumom spora *P. arhizus*

Tretman	Prečnik izdanka	Visina izdanka	Suva masa izdanka	Suva masa korena	K/I	Mikorizacija		
I	ID	10^{-3} m	10^{-3} g			%	G	
veg	1:16	1,87±0,18 a	103,25±19 ab	493,0±75,6 a	250,9±58 a	0,51±0,05 a	100	1
	1:8	1,93±0,09 a	110,25±13 b	503,7±121 a	257,8±56,3 a	0,52±0,04 a	100	2
	1:4	1,91±0,15 a	109,0±12 b	449,2±111 a	231,9±41,3 a	0,53±0,05 ab	100	3
spo	10 ⁶	1,85±0,19 a	103,1±10 ab	425,1±81,5 a	240,5±62,7 a	0,56±0,04 ab	100	3
	10 ⁷	1,91±0,13 a	95,67±7,8 a	457,6±126 a	257,4±49,6 a	0,58±0,05 ab	100	2
	10 ⁸	1,94±0,16 a	100,0±10 ab	502,2±97,6 a	273,7±61,6 a	0,55±0,04 ab	100	2
Kontrola	1,78±0,12 a	93,26±8,5 a	403,3±69 a	247,0±90 a	0,62±0,05 b	66	*	

Vrednost (srednja vrednost±standardna devijacija); različita slova u koloni pokazuju statistički značajne razlike po Duncan-ovom testu ($p < 0.05$). I-tip inokuluma, ID-doza inokulacije, K/I-odnos koren/izdanak. Razvijenost mikorize na korenu sadnica: %: procenat ektomikoriznih korenčića; G-ocena razvijenosti mikorize; * strana ektomikoriza

Procenat mikorizovanih korenčića kod kontrolnih sadnica je takođe bio visok i iznosio je oko 66%. Na uzorcima ovih korenova izdvojena su 4 tipa ektomikorize. Procenili smo da oko 5% ovih mikoriza pripada *P. arhizus*, što se javilo na oko 1/3 sadnica. Pretpostavljamo da *Tricholoma-Hypholoma* mikoriza predstavlja 30% mikorize na mikoriziranim korenčićima kontrole, dok ostalo čini neidentifikovana "strana" mikoriza. Ova mikoriza je takođe prisutna na nekim delovima korena (do 20%) na oko ¼ analiziranih sadnica tretiranih sa *P. arhizus*.

6.3.1.2. *Suillus granulatus*

Karakteristike rasta sadnica *P. nigra* i razvijenost mikorize 11 meseci posle setve semena i inokulacije inokulumom micelije i inokulumom spora *S. granulatus* prikazane su u tabeli 25.

Inokulacija micelijom i sporama *S. granulatus* nije značajno uticala na porast prečnika u vratu korena sadnica crnog bora. Biljke tretirane vegetativnim inokulumom imaju visinu veću od kontrolnih, dok je inokulacija sporama negativno uticala na visinu nadzemnog uzdanka. Masa nadzemnog izdanka takođe je u tretmanima vegetativnim

inokulumom 1:16 veća od kontrole. Biljke tretirane sporama, kao i micelijom u odnosu 1:4, imaju masu manju od kontrolnih.

Tabela 25. Karakteristike rasta sadnica *P. nigra* i razvijenost mikorize 11 meseci po setvi i inokulaciji micelijalnim i inokulumom spora inokulumom *Suillus granulatus*

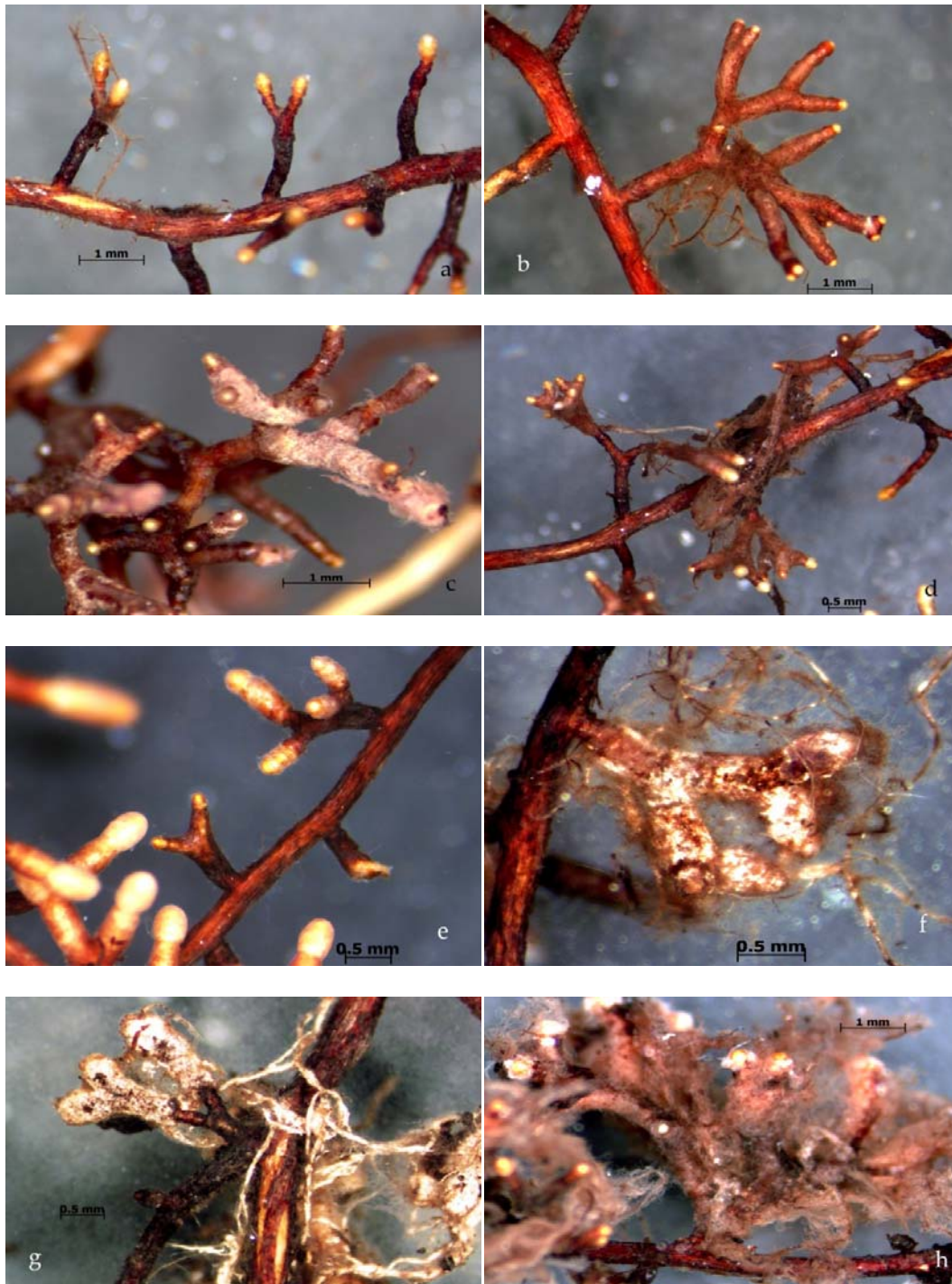
Treatment		Prečnik izdanka	Visina izdanka	Suva masa izdanka	Suva masa korena	K/I	Mikorizacija	
I	ID	10 ⁻³ m		10 ⁻³ g			%	G
veg	1:16	1,85±0,17 a	99,50±13,3 bc	483,4±42 b	268,0±46 a	0,55±0,08 a	100	1
	1:8	1,82±0,10 a	99,83±12,4 bc	426,5±78 ab	254,9±45 a	0,60±0,06 a	100	1
	1:4	1,85±0,20 a	93,83±11,6 b	375,7±37 a	226,8±34 a	0,60±0,07 a	100	1
spo	10 ⁶	1,89±0,22 a	75,58±8,2 a	399,0±92 ab	238,2±50 a	0,61±0,12 a	100	3
	10 ⁷	1,86±0,28 a	76,08±9,1 a	372,7±26 a	221,4±50 a	0,60±0,14 a	100	2
	10 ⁸	1,93±0,12 a	81,33±11,6 a	386,1±116 ab	230,3±38 a	0,63±0,15 a	100	3
kontrola		1,78±0,10 a	93,26±7,42 b	403,3±69 ab	247,0±90 a	0,62±0,09 a	66	*

Vrednost (srednja vrednost±standardna devijacija); različita slova u koloni pokazuju statistički značajne razlike po Duncan-ovom testu (p<0.05). I-tip inokuluma, ID-doza inokulacije, K/I-odnos koren/izdanak. Razvijenost mikorize na korenu sadnica: %: procenat ektomikoriznih korenčića; G-ocena razvijenosti mikorize; * strana ektomikoriza

Jedanaest meseci posle setve može se smatrati da su svi tretmani- i sve primenjene doze bile efektivne za formiranje mikorize. Na osnovu prisustva Hartigove mreže, kao i na osnovu spoljne morfologije, svi korenovi su bili mikorizovani (100%). Međutim i ovde postoji velika razlika u razvijenosti omotača i micelije u substratu.

Prilikom inokulacije micelijom, mikoriza (omotač i micelija gljive u substratu) je slabije razvijena nego u slučaju inokulacije sporama. Prilikom inokulacije micelijom vrhovi korenova su monopodijalni (pojedinačni) ili razgranati, pri čemu je najčešće prisustvo dihotomo razgranatih vrhova, dok su korenovi sa 4 vrha, ili višestruko razgranati retkost. Razvoja micelije kroz substrat u smislu formiranja gustog omotača micelije, nema. Uočljive su razlike u razvijenosti mikorize kod svake od testiranih biljaka, tako da je teško napraviti objektivnu razliku između tretmana. Međutim, kod tretmana sporama, omotač je dobro razvijen, micelija (hife) i rizomorfe su obilne.

Ukoliko je mikoriza prisutna u inicijalnom obliku, porast sadnica u visinu je poboljšan u odnosu na kontrolu.



Slika14. Ektomikoriza razvijena na sadnicama *Pinus nigra* 11 meseci posle setve. *Pisolithus arhizus*: a- -vegetativni inokulum 1:8 (ocena 1); b-inokulum spora 10^6 ; c - vegetativni inokulum 1:16 (v/v) (ocena 2); d -inokulum spora 10^7 (ocena 3). *Suillus granulatus*: e -vegetativni inokulum 1:8 (v/v)(ocena 1); f-inokulum spora 10^6 (ocena 3); g, h-inokulum spora 10^7 .

6.3. 2. Inokulacija sporama

6.3.2.1. *Suillus collinitus* i *Xerochomus rubellus*

Karakteristike rasta sadnica *P. nigra* i razvijenost mikorize 11 meseci posle setve semena i 9 meseci posle inokulacije sporama *S. collinitus* i *X. rubellus* prikazane su u tabeli 26.

Tabela 26. Karakteristike rasta sadnica *P. nigra* i razvijenost mikorize 11 meseci po setvi i inokulaciji inokulumom spora *Suillus collinitus* i *Xerochomus rubellus*

Treatm an		Prečnik izdanka	Visina izdanka	Suva masa izdanka	Suva masa korena	K/I	Mikoriza cija	
I	ID	10 ⁻³ m		10 ⁻³ g			%	G
<i>S. coll.</i>	10 ⁶	1,65±0,14a	78,92±11,5 ab	330,6±72 ab	202,9±43abc	0,62±0,11c	100	3
	10 ⁷	1,73±0,17ab	76,75±10,4 a	340,8±74 ab	222,7±43 abcd	0,66±0,09 c	100	3
	10 ⁸	1,99±0,21d	76,0±9,9 a	388,3±55 abc	241,6±59 cd	0,62±0,12 c	100	3
<i>X. rub.</i>	10 ⁶	1,82±0,26abcd	80,5±13,2 ab	339,3±47 ab	188,3±47 a	0,59±0,11bc	100	1
	10 ⁷	1,81±0,16abcd	91,75±12,2 c	436,7±31 c	201,3±31 abc	0,48±0,08 a	100	1
	10 ⁸	1,74±0,18abc	87,83±8,2 bc	416,1±36 bc	198,4±36 ab	0,50±0,12 ab	100	1
kontrola		1,78±0,10 abc	93,26±7,42 c	403,3±74 bc	247,0±90 d	0,62±0,09 c	66	*

Vrednost (srednja vrednost±standardna devijacija); različita slova u koloni pokazuju statistički značajne razlike po Duncan-ovom testu (p<0.05). I-tip inokuluma, ID-doza inokulacije, K/I-odnos koren/izdanak. Razvijenost mikorize na korenu sadnica: %: procenat ektomikoriznih korenčića; G-ocena razvijenosti mikorize; * strana ektomikoriza

Tretman sporama dve vrste iz roda *Suillus* i *X. rubellus*, na različit način utiče na sadnice *P. nigra*. Tretmani sporama *S. granulatus* i *S. collinitus*, pogotovo pri srednje visokim koncentracijama (10⁷) dovode do smanjenog porasta visine sadnica. U tretmanima 10⁸ kod *Suillus*-a dolazi do povećanja prečnika u vratu korena i do povećanja mase korena. S obzirom na to da je mikoriza jako razvijena na korenu ovih sadnica, povećanje mase korena je verovatno posledica povećanja mase gljive-mikorize na korenu.

Tretman sporama *X. rubellus* 10⁷ i 10⁸ pozitivno utiče na porast visine i mase nadzemnog izdanka.

Povoljniji odnos mase korena prema masi nadzemnog izdanka je zabeležen kod tretmana sa *Suillus*-ima.

11 meseci posle inokulacije micelijom i 9 meseci posle inokulacije sporama mikoriza je bila razvijena na svim sadnicama, a 100% svih korenova bilo je mikorizovano.

Kod *Suillus* tretmana omotač je dobro razvijen, micelija (hife) i ekstra-matrična micelija su obilne. Kod tretmana sa *X. rubellus* omotač je mnogo slabije razvijen nego kod predhodne dve vrste. Dobro razvijen omotač sa elementima ektramatrične micelije zapaža se samo na manjim delovima korena.

6.3.2.2. *Boletus* vrste

Karakteristike rasta sadnica *P. nigra* i razvijenost mikorize 11 meseci posle setve semena i 9 meseci posle inokulacije sporama 3 vrste iz roda *Boletus* prikazane su u tabeli 27.

Tabela 27. Karakteristike rasta sadnica *P. nigra* i razvijenost mikorize 11 meseci po setvi i 9 meseci po inokulaciji sporama *Boletus luridus*, *B. fechtneri* i *B. aestivalis*, 10^7 spora/sadnici

Treatman	Prečnik izdanka	Visina izdanka	Suva masa izdanka	Suva masa korena	K/I	Mikorizacija	
spore	10^{-3} m		10^{-3} g			%	G
<i>B. luridus</i>	1,79±0,10a	84,80±10,9a	405,9±117,1a	225,2±49,3a	0,57±0,11a	100	1
<i>B. fechtneri</i>	1,79±0,18a	90,10±8,0a	393,2±88,5a	200,9±36,7a	0,52±0,04a	100	1
<i>B. aestivalis</i>	1,81±0,14a	84,70±9,3a	364,2±55,9a	195,0±67,3a	0,55±0,12a	100	1
kontrola	1,78±0,10 a	93,26±7,42 a	403,3±69 a	247,0±90 b	0,62±0,09 a	66	*

Vrednost (srednja vrednost±standardna devijacija); različita slova u koloni pokazuju statistički značajne razlike po Duncan-ovom testu ($p<0.05$). K/I-odnos koren/izdanak. Razvijenost mikorize na korenu sadnica: %: procenat ektomikoriznih korenića; G- ocena razvijenosti mikorize; * strana ektomikoriza

Inokulacija sporama *B. luridus*, *B. fechtneri* i *B. aestivalis* sa 10^7 nije uticala na prečnik u vratu korena, visinu i masu nadzemnog izdanka, kao ni na masu korena sadnica crnog bora. Svi navedeni parametri manji su kod tretiranih nego kod kontrolnih sadnica, osim mase nadzemnog izdanka kod biljaka tretiranih sa *B. luridus*.

Može se smatrati da je koren sadnica i iz ovih tretmana bio u potpunosti mikorizovan. Međutim, mikoriza je sa bolje razvijenim morfološkim karakteristikama nalazi se samo na manjem delu korenovog sistema i uglavnom na najnižim partijama korena.

6.3.3. Inokulacija micelijom –vegetativnim inokulumom

6.3.3.1. *Scleroderma* sp.

Karakteristike rasta sadnica *P. nigra* i razvijenost mikorize 11 meseci posle setve semena i inokulacije inokulumom micelije *Scleroderma* sp. u odnosu 1:4, 1:8 i 1:16 prikazane su u tabeli 28.

Tabela 28. Karakteristike rasta sadnica *P. nigra* i razvoj mikorize 11 meseci po setvi i inokulaciji vegetativnim inokulumom *Scleroderma* sp.

Treatment		Prečnik izdanka	Visina izdanka	Suva masa izdanka	Suva masa korena	K/I	Mikorizacija	
I	ID	10 ⁻³ m		10 ⁻³ g			%	G
veg	1:16	1,92±0,14 b	92,25±13,8 a	460,9±108,3 ab	273,1±49,0ab	0,63±0,13 a	100	1
	1:8	1,82±0,13 ab	103,17±14,1 a	507,4±86,2 b	293,4±36,8 b	0,58±0,1a	100	2
	1:4	1,78±0,13 a	96,58±14,2 a	412,4±94,1 a	219,1±34,5 a	0,56±0,1a	100	2
kontrola		1,78±0,10 a	93,26±7,42 a	403,3±74 a	247,0±90 a	0,62±0,09 b	66	*

Vrednost (srednja vrednost±standardna devijacija); različita slova u koloni pokazuju statistički značajne razlike po Duncan-ovom testu ($p < 0.05$). I-tip inokuluma, ID-doza inokulacije, K/I-odnos koren/izdanak. Razvijenost mikorize na korenu sadnica: %: procenat ektomikoriznih korenčića; G-ocena razvijenosti mikorize; * strana ektomikoriza

Inokulacija micelijom *Scleroderma* sp. nije uticala na visinu nadzemnog izdanka sadnica crnog bora, mada je najveća visina sadnica zabeležena u tretmanu 1:8.

Inokulacija je pozitivno uticala porast prečnika u vratu korena sadnica crnog bora. Veći prečnici u vratu korena sadnica izmereni su prilikom tretmana sa manjim učešćem micelijalnog inokuluma u substratu, i najveći prečnik u vratu korena zabeležen je pri tretmanu 1:16, zatim 1:8, dok između tretmana 1:4 i kontrole nema statistički značajne razlike.

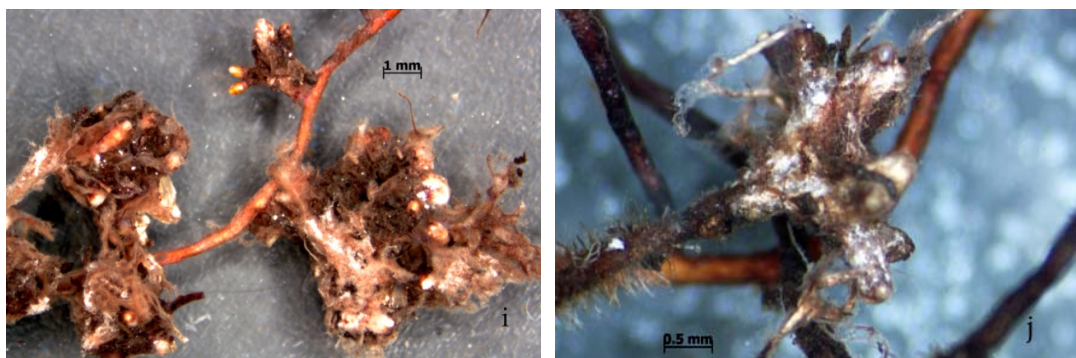
Suva masa nadzemnog izdanka i korena najveća je u tretmanu 1:8, dok između kontrole i tretmana 1:4 nema statistički značajne razlike.

Koren sadnica je u potpunosti mikorizovan (100%), na osnovu prisustva Hartigove mreže, i mikorize razvijene u inicijalnoj fazi. Dobro razvijena mikoriza sa omotačem, micelijom i rizomorfama prisutna je samo na pojedinim delovima korena.

U tretmanima 1:4 i 1:8 višestruko razgranati završeci korena prisutni su na oko 0,25-0,5 korena. Javlja se obilno razvijene ektramatrična micelija i rizopmorfe. U

tretmanima 1:16 višestruko razgranati završeti korena prisutni su u donjim partijama korena kod nekih biljaka, i 0,1-0,25 korena je sa obilno razvijenom ekstramatričnom micelijom i rizoporfama. Velike varijacije postoje između različitih biljaka u tretmanima 1:4 i 1:8 u odnosu na razvijenost mikorize na korenu.

Dosta je visoko prisustvo strane mikorize na sadnicama tretiranim sa *Scleroderma*-om, i ona zauzima do 0,5 korena na dve sadnice u tretmanu 1:16 i prisutna je na gotovo svim sadnicama iz ovog tretmana. U tretmanu 1:8 i 1:4 razvijena je na 5%-20 % korena na pojedinim sadnicama.



Slika 15. Ektomikoriza razvijena na sadnicama *Pinus nigra* 11 meseci posle setve. *Scleroderma* sp.: i – vegetativni inokulum 1:8 (v/v). *Boletus luridus*: j -inokulum spora 10^7

6.4. Diskusija

Dosadašnja istraživanja pokazala su da na mikorizaciju sadnica utiču brojni parametri. Istraživanja CLINE i REID (1982) pokazuju da sposobnost formiranja ektomikorize određenog simbionta visoko zavisi od genotipa domaćina, što se odnosi i na genotipske varijacije unutar iste vrste domaćina. Isto tako, u naučnim krugovima je postignuta saglasnost da se istraživanja ektomikoriznih gljiva vrše na nivou određenih genotipova-strejnova, a ne vrsta, zbog postojanja razlika u nizu njihovih fizioloških osobina. Stoga se može smatrati da je svaka kombinacija simbionata: biljke domaćina i ektomikorizne gljive specifična i u određenoj meri vredna pažnje.

Osim izbora vrste domaćina i mikosimbionta, na proces mikorizacije, razvoj simbioze i ukupni razvoj sadnice znatno utiču uslovi spoljašnje sredine koji preovladavaju u rasadniku (ili zaštićenom objektu za proizvodnju sadnica) tokom proizvodnje sadnica. Ovo se posebno odnosi na izbor substrata, koji treba da je dobrih vodno-vazdušnih karakteristika, u principu porozan i dobro aerisan. Temperatura vazduha, a prvenstveno substrata treba da bude umerena i da pogoduje razvoju korena biljke i gljive. Poželjno je takođe da substrat bude obezbeđen sa dovoljnom količinom vlage. Posebnu pažnju treba posvetiti izboru sredstava za prihranjivanje i pesticidima, koji su neophodni za rast biljaka, ali mogu da ugroze ili potpuno onemoguće razvoj gljive, ili da ometaju uspostavljanje simbioze. Zbog toga je potrebno pažljivo razmotriti i planirati upotrebu svih hemijskih sredstava u toku proizvodnog procesa mikoriziranih sadnica.

Sprovedena istraživanja pokazuju da tretmani sporama *P. arhizus*, *S. granulatus*, *S. collinitus*, *X. rubellus* (10^6 , 10^7 i 10^8 spora/sadnici), *B. luridus*, *B. fechtneri* i *B. aestivalis* (10^7 spora/sadnici), kao sa inokulumom micelije *P. arhizus*, *S. granulatus*, *Scleroderma* sp., (1:16, 1:8 i 1:4) mogu da se primenjuju za dobijanje mikorizovanih kontejnerskih sadnica *P. nigra*.

U sprovedenim ogledima, u različitim tretmanima, sadnice su dostigle visine 72,5-110,5 mm, dok je ukupna suva masa bila u intervalu 0,52-0,82 g. Sadnice u kontroli bile su visoke 93,26 mm i teške 0,651 g.

One su dostigle veličinu koja, prema JUS standardu odgovara I kvalitativnom razredu.

U ogledu u kome su mikorizovane kontejnerske sadnice *P. nigra* dobijene tretiranjem komercijalnim preparatom za mikorizaciju sadnica Aegis-Ecto (Sygenta, Španija), na kraju prve godine gajenja imale su visinu 85,8 mm, prečnik u vratu korena 1,27 mm i ukupnu suhu masu od 0,27 g. Sadnice dobijene u kontroli imale su visinu od 82,1 mm, prečnik u vratu korena 1,16 mm i ukupnu suhu masu od 0,22 g. Mikorizacija korena ocenjena je kao umerena (24-49 %). Međutim, režim đubrenja ovih sadnica bio je drugačiji i na znatno nižem nivou nego u ogledu mikorizacije sadnica autohtonim izolatima ektomikoriznih gljiva (LAZAREVIĆ, 2009).

Istraživanja (ŠIJAČIĆ- NIKOLIĆ *et al.*, 2010) koja su se takođe bavila proizvodnjom sadnica crnog bora za potrebe budućih pošumljavanja teških terena u Srbiji pokazuju da sadnice gajene u staklari u substratu koji čini mešavina treseta, peska i humusa u odnosu 2:1:1, nakon prvog vegetacionog perioda dostižu visinu od 69,33 mm u kontroli, odnosno 90,33 mm prilikom primene super apsorpcionih polimera u substratu. Ukupna suva masa biljaka iznosila je 0,36 g u kontroli i 0,56 g kod tretiranih biljaka. U našem ogledu, supstrat za setvu i gajenje crnog bora, kao i primenjen režim đubriva i primena pesticida odabrani su tako da prvenstveno pogoduju razvoju mikorize na korenu sadnica crnog bora. Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da su oni takođe odgovarali razvoju sadnica crnog bora, kao i da sadnice proizvedene na ovaj način mogu da budu konkurentne.

Za mikorizaciju sadnica korišćeni su inokulum spora i inokulum micelije.

Za njihovu praktičnu primenu neophodno je odrediti optimalnu dozu primene. Zbog nedostatka prethodnog iskustva i zbog toga što ogled postavljamo na otvorenom istraživanja smo započeli sa primenom oba tipa inokuluma u relativno visokom odnosu. U većini sličnih istraživanja period gajenja biljaka do momenta uzimanja uzoraka i analize efekata različitih tretmana je kraći (obično do 5 meseci). Odlučili smo da radimo sa dužim periodom posmatranja jer smo imali u vidu nepovoljnije uslove spoljašnje sredine za proces mikorizacije nego što je to uobičajeno. Na ovaj način se dobija realniju slika o stanju

mikorize na korenu sadnica u momentu koji je bliži momentu iznošenja biljaka na teren. Dug period posmatranja je glavni razlog je u ovom istraživanju dobijen visok procenat mikorizacije korena (oko 100%) u poređenju sa drugim autorima, kao i visok procenat mikorize na korenu kontrolnih biljaka, koje su spontano naseljene.

U "vizuelnoj proceni ektomikorizne morfologije" koju preporučuje MARX (1990, cit. MARX *et al.* 1994), razlikuje se ukupno 10 nivoa (1-10). U poređenju sa tim, mikoriza dobijena u ovom eksperimentu je relativno slabo razvijena i ove ocene (1-3) su u donjoj polovini skale Marxovix ocena (1-5).

Ektomikorizna kolonizacija zavisi od temperature, pH, hranljivih materija koje su na raspolaganju gljivi, vlage, aeracije substrata, eksternalnih ugljenih hidrata i drugih abiotičkih faktora. Ovo znači da postoji veliki broj faktora usled kojih može da dođe do varijacija u pogledu kolonizacije korena sadnica gljivama kojima se vrši inokulacija (REDDY i NATARAJAN, 1997).

Treba imati u vidu da tokom naših oglada uslovi spoljašnje sredine nisu bili optimalni: temperature substrata je često bila veoma visoka, dok je nivo vlage u substratu, kao i aeracija, varirao jer je substrat bio vlažan od poljskog kapaciteta do potpuno suv u periodu od jednog do dva dana.

Ne može se precizno i ukratko reći koji su to optimalni uslovi za razvoj mikorize na korenu sadnica. Oni treba da budu takvi da mogu da omoguće razvoj razgranatog i fino struktuiranog korena sadnice, jer do mikorizacije dolazi jedino na ovakvom korenu, a da istovremeno "podržavaju" razvoj gljive u substratu. To bi, u najširem, značilo: ujednačena temperature vazduha od 18-24° C i umereno vlažnan supstrat, dobre aeracije (CASTELLANO i MOLINA, 1989).

U sprovedenom istraživanju tretmani ektomikoriznim gljivama posmatrani pojedinačno u odnosu na kontrolu ne daju uvek jasne statistički značajne razlike i ne ukazuju na jasnu prednost mikorizovanih sadnica. Ovo je delom i zbog toga što postoji velika varjabilnost merenih parametara u okviru grupe.

Različiti eksperimenti koji su sprovedeni u poljskim uslovima širom sveta dali su različite rezultate, i u nekim slučajevima ne dolazi do stimulacije rasta sadnica (CASTELANO

i MOLINA, 1989; CASTELLANO 1994, 1996). Upotreba veštačkih supstrata za proizvodnju sadnica, ograničeni prostor u kontejnerima, kao i neprestano đubrenje mogu da potisnu mehanizme kojima gljiva utiče na razvoj biljke. To su prvenstveno pozitivni efekti koji bi se odnosili na mobilizaciju i korišćenje nutrijenata iz većih zapremina zemljišta. Ovi faktori generalno "pokrivaju" efekat poboljšanog rasta usled prisustva mikorize kod sadnica u rasadniku (MOLINA, 1979). Iako očekujemo da, kao posledica inokulacije ektomikoriznim gljivama, rast borova, smrče i jele bude stimulisan, on je u najvećem broju slučajeva nepromenjen ili negativan (CASTELLANO i MOLINA, 1989). I drugi autori iznose da retko kad postoji pozitivna korelacija između poboljšanja rasta u ranim fazama razvoja sadnice i obilnog razvoja mikorize kod kontejnerskih sadnica bora (MARX *et al.*, 1982; CLEIN i REID, 1982). Mogući razlog za ovo je što se metaboliti ugljenika, nutrijenti i hormoni preusmeravaju od domaćina prema gljivi simbiontu (HACSKAYLO, 1973; DIXON *et al.*, 1984). Kada se radi o domaćinima kao što je npr. hrast, smatra se da velike zalihe ugljenika u kotiledonima hrasta mogu da redukuju efekat upotrebe ugljenika od strane gljive i obezbede dovoljno ugljenih hidrata za brzi juvenilni rast sadnice i istovremeno obilan razvoj mikorize (DIXON *et al.*, 1984). Istraživanja sa mnogim vrstama severno-američkih borova pokazuju da se uticaj mikorizacije sa *P. arhizus* na porast sadnica normalno javlja druge godine po iznošenju na teren, iako je mikoriza u vreme zasnivanja kulture, kao i na kraju prve godine po osnivanju, na korenu sadnica bila dobro razvijena (MARX *et al.*, 1997; RIFFLE i TINUS 1982).

Na osnovu dosadašnjih iskustava, jasno je da iako neke ektomikorizne gljive ne utiču na poboljšanje rasta sadnica u rasadniku, one utiču na poboljšanje karakteristika sadnica do kojih dolazi do izražaja nakon njihovog iznošenja na teren (PARLADE *et al.*, 1996). Prema BERMAN i BLEDOSE (1998) korist koju biljka ima od ektomikorizne simbioze ne mora uvek da bude izražena kroz parametre rasta kao što su biomasa i visina sadnice. Kao mnogo vredniji pokazatelji mogu da se smatraju parametri kao što su zasnivanje kulture, preživljavanje i reprodukcija.

Osim ovoga, pojedini autori smatraju da postoji mogućnost da se prilikom analize i merenja sadnica iz eksperimenta potceni masa korena, kada se radi sa sadnicama koje su

inokulisane gljivama koje obrazuju velike količine rizomorfi jer dolazi do uništenja biomase gljive tokom pripreme uzoraka.

Pisolithus arhizus

Tokom poslednjih 35 godina sprovedeni su mnogi eksperimenti u kojima su sadnice različitih vrsta borova uspešno inokulisane sa bazidiosporama *P. arhizus*. Osim toga, sa različitim vrstama šumskog drveća rađena je inokulacija micelijom *P. arhizus* (MARX *et al.*, 1982; TORES i HONRUBIA, 1994; CASTELLANO i MOLINA, 1989; CAIRNEY i CHAMBERS, 1997).

U sprovedenom ogledu nema značajnog povećanja rasta sadnica *P. nigra* u odnosu na inokulaciju sa različitim tipovima inokuluma i nivoom inokulacije. RINCON *et al.* (2001) su takođe zabeležili sličnu situaciju tokom inokulacije kontejnerskih sadnica *P. pinea* sa 7 vrsta ektomikoriznih gljiva, među kojima je *P. arhizus*. Nije bilo statistički značajne razlike između visine i suve mase sadnica *P. halepensis* inokuliranih sporama *P. arhizus* u tri različite koncentracije (4×10^6 ; 1.6×10^7 ; 4×10^7), mada su razlike statistički značajne između tretiranih sadnica i kontrole (TORES i HONRUBIA, 1994). Inokulacija sa *P. arhizus* utiče značajno na povećanje prečnika u vratu korena sadnica *P. pinea*, kada se primeni tretman micelijom u odnosu 1:4. Nisu primećene značajne razlike u ukupnoj suvoj masi između inokulisanih i kontrolnih sadnica (RINCON *et al.*, 2001).

Razlike koje su utvrđene u odnosu na ukupni razvoj ektomikorize u našem eksperimentu, posebno kada se odnose na način grananja i razvijenost omotača (ocene 1-3), pokazuju da se povoljniji rezultati dobijaju prilikom inokulacije sa 10^6 spora po biljci i sa primenom vegetativnog inokuluma u odnosu 1:4. Prema RINCON *et al.* (2001), inokulum spora *P. arhizus* je efektivan kada se primeni 10^6 - 10^8 spore po sadnici *P. pinea*, dok se prilikom tretmana sa 10^3 - 10^5 spora po biljci ektomikoriza ne formira. Inokulacijom *P. pinea* sporama *P. arhizus* (10^6 , 10^7 and 10^8) postiže se procenat ektomikorize koji je blizu 50%. Vegetativni inokulum *P. arhizus* je postizao efekat jedino kada se primenjivao u 1:4 i 1:8 odnosu (RINCON *et al.*, 2001). Primena vegetativnog inokuluma u odnosu 1:4, koja takođe dala dobre rezultate u našim ogledima nije pogodna za komercijalnu proizvodnju sadnica u

rasadnicima, jer je potrebno obezbediti velike količine vegetativnog inokuluma. Priprema inokuluma je dugotrajan i ne tako jednostavan proces, posebno u poređenju sa inokulumom spora.

Prema TORESS i HONRUBIA (1994), procenat mikorizne koloizacije *P. arhizus* na sadnicama *P. halepensis* je viši ukoliko se spore primenjuju u nižoj koncentraciji. Autori smatraju da u odnosu na koncentraciju spora postoji prag preko koga svaki porast broja propagula ima negativan efekat na razvoj mikorize (procenat mikorizacije korena) i ukupnu suvu masu korena. U slučaju korišćenja visokih koncentracija spora može da postoji samo-inhibicija i neke gljive umesto da stimulišu rast sadnica, utiču na značajno smanjenje suve mase sadnica prilikom inokulacije sporama u visokoj koncentraciji (TORESS i HONRUBIA, 1994).

Na osnovu rezultata koje smo dobili u ovom ogledu, bilo bi pogodno da se za rasadničku proizvodnju ektomikoriznih sadnica crnog bora velikog obima koristi inokulum spora.

Suillus

Istraživanja RIFFLE i TINUS (1982) pokazuju da vegetativni inokulum *S. granulatus* 6 meseci po inokulaciji nije uticao na porast sadnica *P. ponderosa*. CLINE i REID (1982) istraživali su odnos 6 vrsta ektomikoriznih gljiva prema semenu *P. contorta* i *P. ponderosa* različitih provinijencija. Pokazalo se da *S. granulatus* većinom formira ektomikorizu sa sadnicama *P. contorta* sa različitim uticajem na porast sadnica, zavisno od porekla semena, dok je sa sadnicama *P. ponderosa* generalno slabo formira.

Istraživanja RUIZ –DIEZ *et al.* (2006) pokazuju da inokulacija micelijom različitih izolata *S. collinitus* utiču značajno na porast sadnica *P. halepensis*, za razliku od inokulacije sa *S. granulatus* u istom ogledu, kada se tretirane sadnice ne razlikuju od kontrolnih³⁰. Istraživanja TORES i HONRUBIA (1994) pokazuju da inokulacija sporama *S. collinitus* značajno utiče na porast sadnica *P. halepensis* (4×10^6 , 1.6×10^7 , 4×10^7) ukoliko se radi u

³⁰ mada su ovi rezultati dobijeni u uslovima in vitro, oni mogu da sugerišu postojanje određenog stepena stepen "fiziološke specifičnosti" između različitih vrsta *Suillus*-a i *P. halepensis* (RUIZ –DIEZ *et al.*, 2006)

sterilnom substratu, i gotovo ne utiče (osim pri inokulaciji u najjačoj koncentraciji 4×10^7) ukoliko se radi u substratu koji nije prethodno sterilisan³¹.

Može se reći da se razvijenost mikorize na korenu sadnica tretiranih *Suillus*-ima u našem ogledu odražava na porast tretiranih biljaka na dva načina: utiče na povećanje porasta sadnica i utiče na smanjenje porasta sadnica.

U slučaju ostvarene "inicijalne" mikorizacije korena, kada se govori o inokulaciji micelijom *S. granulatus*, prilikom upotrebe najmanje količine inokuluma (1:16) možemo pretpostaviti da se radi o slučaju da biljka ima izvesne fiziološke koristi od prisustva mikosimbionta, a sama gljiva nije toliko razvijena da troši previše hranljivih materija od biljke. Sa porastom količine vegetativnog inokuluma (1:8) sadnice još uvek imaju bolju visinu, ali ukupnu masu jednaku kontroli. Sadnice inokulisane sa 1:4 imaju masu jednaku sadnicama iz tretmana sporama *S. granulatus* 10^6 , dok im je visina manja.

Sličan efekat se postigli smo prilikom inokulacijom crnog bora sa *X. rubellus*, koji u ovom slučaju nije prirodni simbiot bora, i u tretmanima 10^7 i 10^8 ima prečnik u vratu korena, visinu nadzemnog izdanka i masu najbližu kontrolnim sadnicama. Možemo smatrati da u ovim slučajevima mikorizni simbiot nije mnogo razvijen i zbog toga ne uzima sadnici mnogo hranljivih materija potrebnih za rast.

Kada smo inokulaciju vršili sporama *S. granulatus* i *S. collinitus*, mikoriza na korenu sadnica crnog bora je dobro razvijena, sa omotačem i obilnom ekstramatričnom micelijom. Ovi tretmani pogotovo pri srednje visokim koncentracijama (10^7) dovode do smanjenog porasta sadnice. U tretmanima sa 10^8 spora obe vrste, dolazi do povećanja prečnika u vratu korena i do povećanja mase korena. S obzirom na to da je mikoriza jako razvijena na korenu ovih sadnica, povećanje mase korena je verovatno posledica povećanja mase gljive-mikorize na korenu. Negativan porast sadnica je verovatno posledica alokacije sintetisanih ugljenih hidrata prema gljivi, tj. posledica činjenice da gljiva ima velike zahteve za ugljenim hidratima od relativno slabe sadnice³².

³¹ substrat u ogledu TORES i HONRUBIA (1994) predstavlja mešavinu treseta, perlita i šumskog zemljišta. Sterilizacija se odnosila na sve tri komponente, a ovde je od značaja upotreba šumskog zemljišta, koje poseduje vlastiti inokulacioni potencijal.

³² Ovo takođe može da bude dovedeno u vezu sa postojanjem negativnog efekta koji se javlja pri primeni spora u visokim koncentracijama. Verovatno je da ova dva efekta mogu da budu "pomešana" ili tumačena na

Inokulacije sadnica sprovedene u poljskim uslovima širom sveta, pokazuju da u nekim slučajevima ne dolazi do stimulacije rasta sadnica (CASTELANO i MOLINA, 1989; CASTELLANO 1994, 1996) i da retko kad postoji pozitivna korelacija između poboljšanja rasta u ranim fazama razvoja sadnice i obilnog razvoja mikorize kod kontejnerskih sadnica bora (MARX *et al.*, 1982; CLEIN i REID, 1982). Mogući razlog za ovo je što se metaboliti ugljenika, nutrijenti i hormoni preusmeravaju od domaćina prema gljivi simbiontu (HACSKAYLO, 1973; DIXON *et al.*, 1984). U slučaju inokulacije sporama *S. granulatus* i *S. collinitus* u našem ogledu, efekat mikorizacije na porast sadnica je negativan, što je verovatno posledica alokacije sintetisanih ugljenih hidrata prema gljivi, tj. posledica činjenice da gljiva ima velike zahteve za ugljenim hidratima. U slučaju ostvarene "inicijalne" mikorizacije korena, do koje dolazi u slučaju inokulacije micelijom *S. granulatus* zapaža se (1:16, 1:8) pozitivan uticaj mikosimbionta na rast sadnice, dok sam mikosimbiont nije dovoljno snažno razvijen i ne uzima previše ugljenih hidrata od domaćina. U određenom trenutku ova dva uticaja se izjednačavaju (1:4), dok se svaki dalji razvoj (snaženje) ektomikoriznog simbijonta negativno odražava na rast sadnice. Sličan efekat se postiže sa inokulacijom crnog bora sa *X. rubellus* koji nije prirodni simbiont bora, i izgleda da mnogo manje efikasno ostvaruje mikorizu sa crnim borom. Kada je period posmatranja razvoja sadnica i mikorize duži (2 godine -22 meseca od setve semena), zapaža se mnogo bolje razvijena mikoriza u tretmanima micelijalnim inokulumom *S. granulatus* i sporama *X. rubellus* (ocene 2 i 3). Posle dve godine gajenja ne postoje statistički značajne razlike između tretmana u odnosu na sve merene parametre, osim što je prečnik sadnica iz kontrole statistički značajno niži (podaci nisu prikazani).

Sličan efekat na sadnice crnog bora dobija se i prilikom inokulacije *Boletus*-ima. Ove vrste vrganja nisu prirodni simbionti crnog bora i verovatno da je i stoga stepen razvoja

različite načine. Međutim, smatramo da se u ovom slučaju prvenstveno radi o potrebama gljive za hranljivim materijama koje troši na štetu porasta sadnice. Čini se da je efekat praga, o kome TORRES i HONRUBIA (1994) govore, prvenstveno vezan za efekat umanjenog uspostavljanja mikorize na korenu, što kasnije ima za posledicu da je ukupni pozitivan efekat na rast inokulisane sadnice manji, od druge sadnice tretirane manjim brojem spora, koja ima bolje uspostavljenju mikorizu. Mislimo da je taj efekat u ovom slučaju tek moguć sekundarni efekat, u odnosu na primarni: upotrebu veće količine hranljivih-gradivnih materija od strane gljive.

mikorize na korenu ovih sadnica slabiji. Sa druge strane, poznato je da se gljive iz roda *Boletus* javljaju u starijim šumama ili šumskim kulturama. Smatra se da razlike koje postoje između pionirskih vrsta gljiva (onih koje naseljavaju korenove mladih biljaka) i onih koje se javljaju u starijim šumama, odnosno šumskim kulturama, leže većinom u njihovim zahtevima za ugljenikom. Dokazano je da razvijeni micelijalni sistemi gljiva koje se javljaju u starijim šumama imaju znatno veće zahteve za ugljenikom, koji jedino mogu da budu zadovoljeni od strane starijeg korenovog sistema - starijih biljaka (READ, 1999). Ovo bi bila karakteristika koja u samom početku eliminiše vrganje kao vrste za inokulaciju sadnica u rasadniku.

Kao što je u uvodu rečeno, prilikom postavljanja ogleda, bio je od značaja pokušaj da se mikoriza ostvari inokulacijom sporama, jer se pokazalo je rad sa vrganjima u kulturi dosta neizvesan i problematičan.

Može se još reći da rezultati ovih istraživanja mogu donekle da potvrde ovo stanovište, kao i postojanje razlika između potreba u ishrani različitih vrsta gljiva.

Scleroderma

Istraživanja RINCON *et al.* (2001) pokazuju da inokulacija sadnica *P. pinea* sporama *Scleroderma verrucosum* daje rezultate ukoliko se primeni više od 10^5 spora po sadnici. Procenat formiranih ektomikoriznih korenovih završetaka 5 meseci po inokulaciji iznosi 54-62 %, bez statistički značajnih razlika između tretmana. Prečnik u vratu korena sadnica bio je statistički značajno redukovano prilikom ovih tretmana (10^5 - 10^8), dok je visina nadzemnog izdanka u nekim od tretmana bila značajno veća (10^6 i 10^7). Ukupna suva masa bila je statistički značajno manja kod svih tretmana.

Na osnovu istraživanja PARLADE *et al.* (1996), da bi se dobio visok stepen mikorizacije korena posle 5 meseci, potrebno je izvršiti inokulaciju sa 10^5 spora *Scleroderma citrinum* po sadnici *P. pinaster*. Pokazalo se da i ova vrsta ima malo, ili nema efekta na porast kontejnerskih sadnica u rasadniku. Preporučuje se upotreba inokuluma spora (PARLADE *et al.*, 1996) ove vrste, jer ona formira krupna epigeična plodonosna tela sa velikim brojem spora, koja je lako prikupiti.

Nalazi ove vrste u Crnoj Gori za sada su retki i poslužili su za dobijanje čiste kulture gljive. Nismo imali na raspolaganju zrele spore koje bi mogle da posluže za inokulaciju sadnica. S obzirom na njihovu potencijalnu vrednost u mikorizaciji sadnica, treba im posvetiti više pažnje. Inokulacija micelijom u sprovedenim ogledima dala je dobre rezultate i ovaj tretman se, na osnovu stepena razvijenosti mikorize, u poređenju sa drugim tretmanima vegetativnim inokulumom, pokazao kao najuspešniji (ocena 2 za 1:8 i 1:4). Inokulacija nije značajno uticala na porast sadnica *P. nigra*.

Na osnovu rezultata koje smo dobili u ovom ogledu, bilo bi pogodno da se za rasadničku proizvodnju ektomikoriznih sadnica crnog bora velikog obima koristi inokulum spora *P. arhizus*, *S. granulatus* i *S. collinitus*.

Smatra se da je inokulum spora relativno obilan (mala količina inokuluma potrebna je za inokulaciju sadnica) i relativno jeftin (PARLADE *et al.*, 1996). U ovom ogledu mešali smo suve spore *P. arhizus* sa vermikulitom i dodavali ih u supstrat za setvu tokom pripreme substrata, neposredno pre setve semena. Za inokulaciju sadnica sporama *Suillus*-a korišćena je suspenzije spora u vodi, primenjena injektovanjem suspenzije u rizosveru sadnica crnog bora dva meseca po setvi (u vreme plodonošenja gljiva). Za potrebe rasadničke proizvodnje sadnica autori većinom preporučuju primenu suspenzije spora u vodi. One mogu da budu inkorporirane u vodu koja se koristi za zalivanje sadnica čak i kroz sisteme za zalivanje u staklenicima ili plastenicima (PARLADE *et al.*, 1996; TORES i HONRUBIA, 1994; CASTELLANO i MOLINA, 1989).

U našem materijalu, 1 g spora *P. arhizus* sadrži $14,3 \times 10^8$ spora (materijal sakupljen u Podgorici, 3.09.2009). Ovo znači da je oko 2 g spora dovoljno za inokulaciju oko 300 sadnica u koncentraciji 10^7 spora po biljci (LAZAREVIĆ, 2010). Jedan suvi sporokarp *P. arhizus*, prečnika oko 10 cm, ima masu od oko 65 g. Sa "jednogodišnjim urodom" sa ovog lokaliteta (u toku 2008., kao i u toku 2009., izmerili smo oko 150-200 g) može da se mikorizuje oko 20000 - 300 000 sadnica (10^6 - 10^7 spora/biljka). Glavni problem u budućem planiranju rasadničke proizvodnje je u tome što ne možemo da se oslonimo na

samo nekoliko nalaza ove gljive u prirodi. U toku 2010. i 2011. plodonosna tela *P. arhizus* na lokalitetu o kome govorimo se nisu pojavila.

U materijalu koji smo prikupili i koristili za inokulaciju, pokazalo se da jedno plodonosno telo *S. granulatus* prečnika oko 6 cm, prosečno sadrži oko 10^9 spora (Račama, 11. 07. 2009). Plodonosno telo *S. collinitus* prečnika oko 15 cm ima prosečno oko $2,4 \times 10^9$ spora (Građen 13.06.2009.). Ovo znači da sa sporama iz jednog šesirića *S. granulatus* može da se izvrši inokulacija 100 sadnica u koncentraciji 10^7 spora po biljci, odnosno 1000 sadnica u koncentraciji 10^6 spora po biljci; odnosno 240 - 2400 sadnica po plodonosnom telu odgovarajuće veličine *S. collinitus*. Za razliku od *P. arhizus*, možemo da računamo na ove dve vrste, kao na stabilan izvor ektomikoriznog inokuluma.

Mikoriza koju odlikuje razvijeni omotač i ekstramatrična micelija ostvarena je u našem ogledu putem inokulacije sporama, iako to u nekim slučajevima dovodi do manjeg porasta sadnice. Razvijena micelija na korenu, pogotovo ako je razgranata i bujna, u uslovima presadnje može spremno da započne usvajanje vode i hranljivih materija iz veće količine šumskog zemljišta. Zbog toga je to osobina kojoj smatramo da treba dati prednost, čak i na štetu porasta sadnice (kao na primer u slučaju *Suillus-a*).

Najniži nivo mikorize koji je potreban da bi se obezbedio njen uticaj na razvoj biljaka u poljskim uslovima i nakon iznošenja na teren, je slabo proučen. Za *P. arhizus*, smatra se da on iznosi oko 50% ektomikorizovanih završetaka korena (MARX, 1994). Sprovedena istraživanja pokazuju da je inokulacija sa 10^6 - 10^7 spora *P. arhizus* po sadnici *P. nigra* dovoljna za mikorizaciju korena. U slučaju inokulacije sa *S. granulatus* i *S. collinitus* može se reći da je dovoljno primeniti 10^6 spora po biljci.

Mikroskopija korenskih završetaka prilikom svake od izvedenih inokulacija ukazuje na prisustvo gljive u korenu biljke, na osnovu čega se može pretpostaviti da bi stabilniji uslovi spoljašnje sredine u procesu gajenja biljaka doprineli boljem razvoju omotača, kao i razvoju micelije gljive kroz substrat. Započeta istraživanja potrebno je nastaviti da bi se utvrdile minimalne doze inokuluma koje mogu da imaju efekte na mikorizaciju sadnica.

Kada se govori o inokulaciji vegetativnim inokulumom, treba nastaviti istraživanja koja, generalno, vode ka proizvodnji veće biomase micelije u laboratorijskim uslovima.

Neophodna su dalja istraživanja, dugoročni ogledi i posmatranja da bi se utvrdio uticaj različitih tretmana na popravljnje karakteristika kontejnerskih sadnica *P. nigra* u rasadnicima i šumskim kulturama, njihov rast i preživljavanje na terenu. Sva ta proučavanja imaju za cilj odabiranje (selekciju) ektomikoriznih gljiva i metoda inokulacije, koji su pogodna za unapređenje dosadašnje proizvodnje sadnica crnog bora za pošumljavanje. Ova istraživanja treba da unaprede dosadašnju praksu pošumljavanja crnim borom u Crnoj Gori i regoinu jugoistočne Evrope.

6.5. Zaključak

Sprovedena istraživanja pokazuju da tretmani sporama *P. arhizus*, *S. granulatus*, *S. collinitus*, *X. rubellus* (10^6 , 10^7 i 10^8 spora/sadnici), *B. luridus*, *B. fechtneri* i *B. aestivalis* (10^7 spora/sadnici), kao i vegetativnim inokulumom *P. arhizus*, *S. granulatus*, *Scleroderma* (1:16, 1:8 i 1:4) mogu da se primenjuju za dobijanje mikorizovanih kontejnerskih sadnica *P. nigra*.

Ovi tretmani različito utiču na promenu morfometrijskih parametara sadnica u odnosu na kontrolne sadnice.

Pokazalo se da je prečnik sadnica u vratu korena prilično ujednačen. Visine i mase nadzemnog izdanka su veće prilikom inokulacije micelijom nego sporama, kao i masa korena. Visina i masa nadzemnog izdanka sadnica inokulisanih sporama *S. granulatus* i *S. collinitus* je najmanja.

Posle 11 meseci, sve sadnice inokulisane sporama, kao i inokulumom micelije navedenih ektomikoriznih gljiva su bile kolonizovane sa oko 100% mikoriznih završetaka korena. Na osnovu vizuelne procene ektomikorizne morfologije, najbolje razvijena mikoriza zabeležena je na sadnicama tretiranim inokulumom spora *P. arhizus*, *S. granulatus* i *S. collinitus*.

Zbog gore navedenog, kao i zbog jednostavnosti primene i niske cene, može se preporučiti primena inokuluma spora ovih vrsta u rasadničkoj proizvodnji crnog bora, i to 10^6 - 10^7 spora *P. arhizus* i 10^6 spora *S. granulatus* i *S. collinitus* po sadnici.

Jednom usvojena metodologija rada i stečena iskustva u radu sa jednom vrstom (crnim borom kao modelom) lako mogu da se prenesu i prošire na druge vrste borova ili šumskog drveća u celini kada se za tim ukaže potreba.

7. Literatura

1. Abuzinadah R.A., Read D.J. (1986). The role of proteins in the nitrogen nutrition of ectomycorrhizal plants, Vol.I, Utilisation of peptides and proteins by ectomycorrhizal fungi, *New Phytologist* 103, 481-493.
2. Agerer, R. (1991). Characterisation of ectomycorrhiza. In *Methods in Microbiology* 23, Techniques for the Study of Mycorrhiza, eds. Noris, J.R., Read, D.J. Academic press, 25–73.
3. Agerer, R. (1987–2004). Colour atlas of ectomycorrhiza. Einhorn-Verlag. Schwabish Gmund, Munchen.
4. Agerer, R. (2001). Exploration types of ectomycorrhizae. *Mycorrhiza* 11, 107–114.
5. Agueda, B., Parlade, J., de Miguel, A.M., Martinez-Pena, F. (2006). Characterisation and identification of field ectomycorrhizae of *Boletus edulis* and *Cistus landariferr*, *Mycologia* 98, 1, 23-30.
6. Allen, E.B., Allen, M.F., Helm, D.J., Trappe, J.M., Molina, M., Rincon, E. (1995). Patterns and regulation of mycorrhizal plant and fungal communities. *Plant and Soil* 170, 47-62.
7. Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990). Basic local Alignment Search Tool, *Journal of Molecular Biology* 215 (3), 403–410.
8. Ashkannejhad, S., Horton T.R, (2006). Ectomycorrhizal ecology under primary succession on coastal sand dunes: interactions involving *Pinus contorta*, suilloid fungi and deer, *New Phytologist* 169, 345–354.
9. Baar, J., Horton, T.R., Kretzer, A.M., Bruns, T.D. (1999). Mycorrhizal Colonization of *Pinus muricata* From Resistant Propagules After a Stand-Replacing Wildfire. *New Phytologist* 143, 409–418.
10. Bengtsson, J. (2005). Which species? What kind of diversity? Which ecosystem functioning? Some problems in studies of relations between biodiversity and ecosystem function. *Applied Soil Ecology* 10, 191-199.
11. Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Wheeler, D.L. (2005). GenBank. *Nucleic Acids Res* 33, D34-D38.

12. Berman, J.T., Bledsoe, C.S. (1998). Soil transfers from valley oak (*quercus lobata* nee) stands increase ectomycorrhizal diversity and alter root and shoot growth on valley oak seedlings. *Mycorrhiza* 7, 223-235.
13. Blečić, V., Lakušić, R. (1969). Šume munike *Pinius heldreichii* Christ na Štitovu i Bjelasici U Crnoj Gori , *Glasnik* Republičkog zavoda za zaštitu prirode i Prirodnjačkog muzeja 2, Titograd, 5-10.
14. Blečić, V., Lakušić, R. (1976). Prodromus biljnih zajednica Crne Gore, *Glasnik* Republičkog zavoda za zaštitu prirode i Prirodnjačkog muzeja Titograd 9, 57-98.
15. Blečić, V., Lakušić, R. (1987). Vegetacijska karta SR Crne Gore, prilagođen izvod iz Karte prirodne potencijalne vegetacije SFR Jugoslavije (M 1:1000000) Skoplje 1983, u Lakušić, R. Šumske zajednice Jugoslavije Sr Crna Gora (388-395). Šumarska enciklopedija 3, Zagreb, 393.
16. Bowen, G.D. (1973). Mineral nutrition of ectomycorrhizae, u *Ectomycorrhiza, Their Ecology and Physiology.*, Ed. Marx G.C., Kozlowsky T.T. AP, 151-205.
17. Brundrett, M.C. (2004). Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biol. Rev.* 79, 473-495.
18. Brundrett, M.C. (2009). Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding global diversity of host plants by resolving conflicting informations and developing reliable means of diagnosis. *Plant Soil* 320, 37-77.
19. Bruns, T. D. (1995). Thoughts on the processes that maintain local species diversity of ectomycorrhizal fungi. *Plant Soil* 170, 63-73.
20. Bruns, T.D. (1995). Thoughts on the processes that maintain local species diversity of ectomycorrhizal fungi. *Plant Soil* 170, 63-73.
21. Bruns, T.D., Bidartondo, M.I., Taylor L.D. (2002). Host specificity in ectomycorrhizal communities: what do the exceptions tell us? *Integ. and Comp. Biol.*, 42, 352-359.
22. Bubák, F. (1915). Dritter Beitrag zur Pilzflora von Montenegro. *Bot. Kozl.* 14, 39-83.
23. Buscot, F., Munch, J.C., Charcosset, J.Y., Gardes, M., Nehls, U., Hampp, R. (2000). Recent advances in exploring physiology and biodiversity of ectomycorrhizas

- highlight the functioning of these symbioses in ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews* 24, 601- 614.
24. Castellano, M.A., Molina, R. (1989). Mycorrhizae. In: *The Container Tree Nursery Manual*, Vol 5. Agric. Handbk. 674. (Landis, T.D., Tinus, R.W., McDonald, S.E., Barnett, J.P. eds.). U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Washington DC, USA, 101-167.
 25. Castellano, M.A. (1994). Current status of outplanting studies using ectomycorrhiza–inoculated forest trees. In: *Mycorrhiza and plant health* (Pflenger F.L., Linderman R.G. eds.). APS press, USA, 261-281.
 26. Castellano, M.A. (1996). Outplanting performance of mycorrhizal inoculated seedlings. In: *Concepts in mycorrhizal research* (Mukerji KG, Ed.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 223-291.
 27. Cairney, J.W.G., Chambers, S.M. (1997). Interactions between *Pisolithus tinctorius* and its hosts: a review of current knowledge. *Mycorrhiza* 7, 117-131.
 28. Cairney, J.W.G., Chambers, S.M. (1997). Interactions between *Pisolithus tinctorius* and its hosts: a review of current knowledge, *Mycorrhiza* 7, 117-131.
 29. Cairney, J.W.G. (1999). Intraspecific physiological variation: implications for understanding functional diversity in ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 9, 125-135.
 30. Cline, M., Reid, P. (1982). Seed source and mycorrhizal fungus effects on growth of containerized *Pinus contorta* and *Pinus ponderosa* seedlings, *Forest Science*, vol 28, No 2, 237-250.
 31. Dahlberg, A., Jonsson, L., Nylund, J-E. (1997). Species diversity and distribution of biomass above and below ground among ectomycorrhizal fungi in oldgrowth Norway spruce forest in south Sweden. *Can. J. Bot.* 75, 1323-1335.
 32. Dahlberg, A., Finlay, R.D. (1999). Suillus. In: *Ectomycorrhizal fungi: Key genera in profile*. Ed. by J.G.W Cairney & S. Chambers. Springer, Heidelberg, 33-64.
 33. Dames, J.F., Starker, C.J., Sholes, M.C. (1999). Ecological and anatomical characterisation of some *Pinus patula* ectomycorrhizas from Mpumalanga, South Africa, *Mycorrhiza* 9, 9-24.

34. Daza, A., Manjon, J.L., Camacho, M., Romero de la Osa, L., Aguilar, A., Santmaria, C. (2006). Effect of carbon and nitrogen sources, pH and temperature on in vitro cultures of several isolates of *Amanita caesarea* (Scop.:Fr.) Pers. *Mycorrhiza* 16, 133-136.
35. Dixon, R., Garret, H., Cox, G., Marx, D., Sander, I. (1984). Inoculation of three *Quercus* species with eleven isolates of ectomycorrhizal fungi. Inoculation success and seedling growth relationships, *Forest Science*, 30/2, 364-372.
36. Dunabeitia, M.K., Hormilla, S., Garcia-Plazola, J.I., Txarterina, K., Arteche, U., Becerril, J.M. (2004). Differential response of three fungal species to environmental factors and their role in the mycorrhization of *Pinus radiata* D.Don, *Mycorrhiza* 14, 11-18.
37. El Karkouri, K., Martin, F., Mousain, D. (2002). Dominance of the mycorrhizal fungus *Rhizopogon rubescens* in a plantation of *Pinus pinea* seedlings inoculated with *Suillus collinitus*. *Ann. For. Sci.* 59, 197-204.
38. El Karkouri, K., Selosse, M-A, Mousain, D. (2006). Molecular markers detecting an ectomycorrhizal *Suillus collinitus* strain on *Pinus halepensis* roots suggest successful inoculation and persistence in Mediterranean nursery and plantation. *FEMS Microbiology Ecology* 55, 146-158.
39. Erland, S., Jonsson, T., Mahmood, S., Finlay, RD. (1999). Below-ground ectomycorrhizal community structure in two *Picea abies* forests in southern Sweden. *Scandinavian Journal of Forest Research* 14, 209-217.
40. Finlay, R.D, Read, D.J. (1986). The structure and function of vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. Translocation of ¹⁴C labelled carbon between plants interconnected by a common mycelium. *New Phytologist* 103, 143-156.
41. Fransson, P.M.A. (2001). Responses of ectomycorrhizal fungi to change in carbon and nutrient availability, doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
42. Garbaye, J. (1994). Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 128, 197-210.

43. Gardes, M., Bruns, T.D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes –application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2, 113-118.
44. Gardes, M., Bruns, T.D. (1996). Community structure of ectomycorrhizal fungi in *Pinus muricata* forest: above and belowground views. *Can. J Bot.* 74, 1572-1583.
45. Ghimire, S. R., Craven K.D. (2011). The Ectomycorrhizal Fungus *Sebacina vermifera*, Enhances Biomass Production of Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) Under Drought Conditions, *Appl. Environ. Microbiol.* doi:10.1128/AEM.05225-11.
46. Golubović-Ćurguz, V. (2008). Preživljavanje mikoriziranih sadnica smrčice (*Picea abies* L. Karst) i belog bora (*Pinus sylvestris* L.) na deponiji Majdanpeka, doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet.
47. Gomes, E.A., de Barros, E.G., Kasuya, M.C.M., Araujo, E.F. (1999). Molecular characterization of *Pisolithus* spp. isolate by r DNA PCR-RFLP. *Mycorrhiza* 8, 197-202.
48. Grubisha, L., Trappe, J.M., Molina, R., Spatafora, J.W. (2002). Biology of the ectomycorrhizal genus *Rhizopogon*. VI. Re-examination of infrageneric relationships inferred from phylogenetic analyses of ITS sequences, *Mycologia*, 94(4), 607–619.
49. Grubisha, L.C., Bergemann, S.E., Bruns, T.D. (2007). Host islands within the California Northern Channel Islands create fine-scale genetic structure in two sympatric species of the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Rhizopogon*, *Molecular Ecology* 16, 1811–1822.
50. Hacskaylo, E. (1973). Carbohydrate physiology of ectomycorrhizae. In: *Ectomycorrhizae, their ecology and function* (Marks GC, Kozloeski TT, eds) Academic Press, London, Great Britain, 207-230.
51. Hagerman, S. M., Jones, M.D., Bradfield, G.E., Gillespie, M., Durall, D.M. (1999). Effects of clear-cut logging on the diversity and persistence of ectomycorrhizae at a subalpine forest. *Can. J. For. Res.* 29, 124–134.
52. Hall, T.A. (1999). Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.

53. Harley, J.L., Smith, S.E. (1983). Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, London.
54. Horton, T. R., Cázares, E., Bruns, T. D. (1998). Ectomycorrhizal, vesicular-arbuscular and dark septate fungal colonization of bishop pine (*Pinus muricata*) seedlings in the first 5 months of growth after wildfire. Mycorrhiza, 811-18.
55. Horton, T.R., Bruns, T.D. (1998). Multiple host fungi are the most frequent and abundant ectomycorrhizal types in a mixed stand of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* D. Don) and bishop pine (*Pinus muricata* D. Don). New Phytologist 139(2), 331-339.
56. Horton, T.R., Bruns, T.D. (2001). The molecular evolution in mycorrhizal ecology: peeking into the black box. Molecular Ecology 10, 1855-1871.
57. Hutchison, L.J. (1990). Studies on the systematics of ectomycorrhizal fungi in axenic culture. II. The enzymatic degradation of selected carbon and nitrogen compounds. Canadian Journal of Botany 68, 1522-1530.
58. Ingleby, K., Masson, P.A., Last, F.T., Fleming, L.V., (1990). Identification of ectomycorrhizas, HMSO, London.
59. Izzo, A.D., Meyer, M., Trappe, J.M., North, M., Bruns, T.D. (2005). Hypogeous ectomycorrhizal fungal species on roots and in small mammal diet in a mixed-conifer forest. Forest Science, 51, 243–254.
60. Janković, M.M. (1960). Razmatranja o uzajamnim odnosima molike (*Pinus peuce*) i munike (*Pinus heldreichii*). kao i o njihovim ekološkim osobinama, posebno u odnosu na podlogu- Glasnik botaničkog zavoda i bašte Univ. Beograd, 1(2), 141-181.
61. Janković, M.M., Stefanović, K. (1971). Ekološki odnos reliktna i (sub)endemične balkanske vrste *Pinus heldreichii* prema karakteru geološke podloge i zemljišta u Jugoslaviji Ekologija, Vol 6 (1). 49-63.
62. Janković, M.M. (1973). Svet biljaka u prirodnim ekosistemima SR Srbije. Naučna konferencija “Čovek i životna sredina u SR Srbiji”, SANU, Beograd.
63. Janković, M.M. (1991). O veoma značajnoj potrebi uspostavljanja kontinuiranog vegetacijskog pojasa endemoreliktnih balkanskih borova *Pinus heldreichii* i *Pinus peuce* u planinama SR Srbije i Balkanskog poluostrva. Ecology 26, 61-67.

64. Jovanović, B. (1971). Dendrologija, Univerzitet u Beogradu, Šumarski fakultet, Beograd, 536.
65. Karadžić, D. (1995). Gljive Nacionalnog parka Durmitor, Beograd.
66. Karen, O., Hogberg, N., Dahlberg, A., Jonsson, L., Nylund, J-E. (1997). Inter-and intraspecific variation in the ITS region of rDNA of ectomycorrhizal fungi in Fennoscandia as detected by endonuclease analysis. *New Phytologist* 136, 313-325.
67. Kasom, G. (2004). Prilog poznavanju makromiceta Crne Gore. *Glasnik republičkog zavoda za zaštitu prirode* 27-28, 19-32.
68. Keča, N. (2005). Biodiverzitet *Armillaria* vrsta i njihova uloga u sušenju i propadanju stabala u četinarskim i lišćarskim šumama Srbije i Crne Gore, doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Šumarski fakultet.
69. Kim, C-G., Power, S.A., Bell, J.N.B. (2003). Effects of Cd on growth and glucose utilisation of ectomycorrhizal fungi in vitro, *Mycorrhiza*, vol.13, 223-226.
70. Kjølner, R., Bruns T.D.(2003). *Rhizopogon* spore bank communities: within and among Californian pine forests. *Mycologia* 95, 603–613.
71. Kjølner, R. (2006). Disproportionate abundance between ectomycorrhizal root tips and their associated mycelia. *FEMS Microbiol Ecol* 58, 214–224.
72. Kõljalg, U., Larsson, K-H., Kessy Abarenkov, K., Nilsson, H. R., Ian, J., Alexander I.J., Eberhardt, U., Erland, S., Høiland, K., Kjølner, R., Larsson, E., Pennanen, T., Sen, R., Taylor, A.F.S., Leho Tedersoo, L., Vrålstad, T., Ursing, M. B. (2005). UNITE: a database providing web-based methods for the molecular identification of ectomycorrhizal fungi, *New Phytologist* 166, 1063–1068.
73. Kontić, R. (1962). Neka zapažanja o vremenu sazrevanja munike. *Narodni Šumar (Sarajevo)* 16, 7-9.
74. Kranabetter, J. M. (2004). Ectomycorrhizal community effects on hybrid spruce seedling growth and nutrition in clearcuts, *Canadian Journal of Botany*, 2004, 82(7), 983-991, 10.1139/b04-077.

75. Landerweert, R., Leeflang P., Smit, E., Kuyper, T. (2005). Diversity of an ectomycorrhizal fungal community studied by a root tip and total soil DNA approach, *Mycorrhiza* 15, 1-6.
76. Landis, D.H. (1989). Disease and Pest Management, In: The Container Tree Nursery Manual, Vol 5. Agric. Handbook. 674. (Landis, T.D., Tinus ,R.W., McDonald, S.E., Barnett, J.P. eds.). U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Washington DC, USA. 1-99.
77. Laperrie F, Chilvers GA, Bhem CA, 1987. Oxalic acid synthesis by mycorrhizal fungus *Paxillus involutus* (Batch.ex. Fr.). *New Phytologist* 106, 39-146.
78. Last, F.T. (1983). The concept of succession in relation to the spread of sheathing mycorrhizal fungi in inoculated tree seedlings by means of mycorrhizal hyphae. *Physiol Plant* 3, 88-92.
79. Lazarević, J. (2009). Fungi from Montenegro potentially valuable in mycorrhization of coniferous, V Balkan Botanical Congress, Belgrade, Book of abstracts, 90-91.
80. Lazarević, J. (2009). Possibilities of hardwood and coniferous seedling mycorrhization in the field conditions in Podgorica, International Conference "Forestry in achieving millennium goals", Institute of Lowland forestry and Environment, Novi Sad, Proceedings, 331-337.
81. Lazarević, J. (2010). Seedlings mycorrhization under the treat of climate changes, International Scientific Conference, Forest Ecosystems and Climate Changes, Belgrade Proceedings, Volume 2, 221-226.
82. Lazarević, J. (2010). Mycorrhization of containerized *Pinus nigra* seedlings with autochthonous *Pisolithus arrhizus*, Proceedings First Serbian Forestry Congress "Future with Forests", Faculty of Forestry University of Belgrade, Belgrade (Serbia) 11–13 November, 348-354.
83. Lazarević, J., Perić, B., Perić, O. (2007). Distribution and diversity of ectomycorrhizal fungi in Montenegro, XV Congress of European Mycologists, Saint Petersburg, Russia, 16-21 September, Abstracts, 131-132.

84. Lewis, D.H., Harley, J.L.(1965). Carbonhydrate physiology of mycorrhizal roots of beech. III Movement of sugars between host and fungus. *New Phytologist* 64, 256-269.
85. Lilleskov, E. A., Bruns T. D. (2005). Spore dispersal of a resupinate ectomycorrhizal fungus, *Tomentella sublilacina*, via soil food webs, *Mycologia*, 97(4). 762–769.
86. Lindahl, B.D., Finlay, R.D., Cairney, J.W.G. (2005). Enzymatic activities of mycelia in mycorrhizal fungal communities In: Dighton, J., Oudemans, P., White, J. (eds). *The fungal community, its organisation and role in ecosystems*. New York: Marcel Decker 331-348.
87. Lu, X., Malajczuk, N., Dell, B. (1998). Mycorrhiza formation and growth of *Eucalyptus globulosus* seedlings inoculated with spores of various ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 8, 81-86.
88. Manian, S., Sreenivasaprasad, S., Bending, G.D., Mills, P.R. (2001). Genetic diversity and interrelationships among common European *Suillus* species based on ribosomal DNA sequences. *FEMS Microbiology Letters* 204, 117-121.
89. Mah, K., Tackaberry, L.E., Egger, K.N., Massicotte, H. B. (2001). The impacts of broadcast burning after clearcutting on the diversity of ectomycorrhizal fungi associated with hybrid spruce seedlings in central British Columbia, *Can. J. For. Res.* 31, 224–235.
90. Martin, M.P. (1996). Spec. Ed. no. 5. The genus *Rhizopogon* in Europe. Barcelona: Soc Catalana Micol, 173.
91. Marx, D.H. (1969). The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic onfections. I. Antagonism of ectomycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria, *Phytopathology* 59, 153-163.
92. Marx, D.H., Ruehle, J.L., Kenney, D.S., Cordell, C.E., Riffle, J.W., Molina, R.J., Pawuk, W.H., Navratil, S., Tinus R.W., Goodwin, O.C. (1982). Commercial vegetative inoculum of *Pisolithus tinctorius* and inoculation techniques for development of ectomycorrhizae on container-grown tree seedlings, *For. Sci.* 28/2, 373-400.

93. Marx D.H., Ruehle J.L., Cordell C.E. (1994). Methods for studying nursery and field response of trees to specific ectomycorrhiza, In Norris J.R., Read D.J., Varma A.K. (eds.), Techniques for mycorrhizal research, Methods in microbiology, Academic Press.
94. Matočec, N., Focht, I. (2000). On some autumnal discomycetes collected from Mt. Orjen, Montenegro 1982-1984. Mycol. Monten. III, 63-85.
95. Menkis, A., Allmer, J., Vasiliauskas, R., Lygis, V., Stenlid, J., Finlay, R. (2004). Ecology and molecular characterisation of dark septate fungi from roots, living stems, coarse and fine woody debris, Mycol. Res. 108 (8), 965-973.
96. Menkis, A., Vasiliauskas, R., Taylor, A.F.S., Stenlid, J., Finlay, R. (2005). Fungal communities in mycorrhizal roots of conifer seedlings in forest nurseries under different cultivation systems, assessed by morphotyping, direct sequencing and mycelial isolation, Mycorrhiza 16, 33-41.
97. Mohatt, K.R., Cripps, C.L., Lavin, M. (2008). Ectomycorrhizal fungi of whitebark pine (a tree in peril) revealed by sporocarps and molecular analysis of mycorrhizae from treeline forests in the Greater Yellowstone Ecosystem. Botany-Botanique. 86(1), 14-25.
98. Molina, R. (1979). Ectomycorrhizal inoculation of containerized Douglas-fir and lundgepole seedlings with six isolates of *Pisolithus tinctorius*. For Sci 25, 585-590.
99. Molina, R., Trappe, J.M. (1982). Patterns of ectomycorrhizal host specificity and potential among Pacific North West conifers and fungi. For.Sci 28, 423-458.
100. Molina et al, (1992). Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis: community-ecological consequences and practical implications. *In* Mycorrhizal functioning, an integrative plant–fungal process. Edited by M.F. Allen. Chapman & Hall, New York, 301–332.
101. Munnoz, J.A. (2005). *Boletus s. l.* In: Fungi Europaei Vol 1 Edizioni Candusso. Alassio, 951.
102. Nasholm & Persson, (2001). Plant acquisition in organic nitrogen in boreal forests. Physiologia plantarum 111, 419-426.

103. Nehls, U., Grunze, W., Willmann, M., Reichz, M., Kúster, H. (2007). Sugar for my honey: Carbonhydrate partitioning in ectomycorrhizal symbiosis. *Phytochemistry* 68, 82-91.
104. Nieto, M.P., Carbone, S.S. (2009). Characterisation of juvenile maritime pine (*Pinus pinaster* Ait) ectomycorrhizal fungal community using morphotyping, direct sequencing and fruitbodies sampling. *Mycorrhiza* 19, 91-98.
105. Nygren (2008). Functional diversity in nutrient acquisition by ectomycorrhizal fungi, doctoral thesis no. 2008:54, Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
106. Parlade, J., Pera, J., Alvarez, I.F. (1996). Inoculation of containerized *Pseudotsuga menziesii* and *Pinus pinaster* seedlings with spores of five species of ectomycorrhizal fungi, *Mycorrhiza* 6, 237-245.
107. Parlade, J., Pera, J., Lique, J. (2004). Evaluation of mycelial inocula of edible *Lactarius* species for the production of *Pinus pinaster* and *P. sylvestris* mycorrhizal seedlings under greenhouse conditions. *Mycorrhiza* 14, 171-176.
108. Pera, J., Alvarez, I.F. (1995). Ectomycorrhizal fungi of *Pinus pinaster*, *Mycorrhiza* 5, 193-200.
109. Perić, B. (1999a). 12 espèces de la subdivision des Ascomycotina, nouvelles pour le Monténégro, *Mycol. Monten.* (II) 1, 33-60.
110. Perić, B. (1999b). *Inocybe geophylla* i njena dva varijeteta u Podgorici, (20. prilog proučavanju makromiceta Crne Gore). *Poljoprivreda i šumarstvo*, 45 (3-4). 53-59.
111. Perić, B. (2002). Trios discomycetes, nouvelles pour la Flore Mycologique du Montenegro, *Mycol. Monten.* V, 93-118.
112. Perić, B. (2005). *Cantharellus lilacinopruinatus*, nouvelle espèce de la flore mycologique du Monténégro. *Mycol. Monten.* VIII, 7-12.
113. Perić, B. (2006). *Pulvinula laeterubra*, nouvelle espèce de la flore mycologique du Monténégro, *Bull. mycol. bot. Dauphiné-Savoie*, 45 (181), 17-24.
114. Perić, B. (2008a). *Pulvinula convexella*, nouvelle espèce pour la flore mycologique du Monténégro. *Bull. mycol. bot. Dauphiné-Savoie*, 47 (186), 23-30.

115. Perić, B. (2008b). *Sowerbyella fagicola* Moravec, une discomycète inédite de la flore mycologique du Monténégro. Bull. Soc. myc. Fr. 124 (3), 13-24.
116. Perić, B. (2008c). *Marcelleina persoonii* una specie nuova per la flora fungina del Montenegro. Rivista di Micologia 51(2), 165-173.
117. Perić, B. (2009). *Peziza lividula*, une espèce rare et nouvelle pour le Monténégro. Mycol. Monten. XII, 55-63.
118. Perić, B. (2010a). *Peziza subumbrina* – récolte d'une espèce rare au Monténégro. Bull. Soc. mycol. Fr. 126 (2), 123-133.
119. Perić, B. (2010b). Le genre *Helvella* L. (Ascomycota, Pezizales) dans le Monténégro. 1^o contribution-le sous genre *Elasticae*. Mycol. Monten. XIII, 41-78.
120. Perić, B. (2010c). *Helvella cupuliformis* (Ascomycota, Pezizales) nouvelle espèce de la flore mycologique du Monténégro. Ascomycete.org, 2(4), 51-56.
121. Perić, B. (2011a). *Peziza acroornata* (Ascomycota, Pezizales) – quatrième récolte européenne, première du Monténégro. Czech Mycol. 63(1), 55-64.
122. Perić, B. (2011b). *Helvella branzeiana* (Ascomycota, Pezizales) – première récolte Monténégrine d'une espèce rare Czech Mycol. 63(2), 175-185.
123. Perić, B. (2011c). *Gljive i Cvjetnice Crne Gore* CANU. (*Fungi and Flowering Plants of Montenegro*. Montenegrin Academy of Science and Arts). Podgorica.
124. Perić, B., Moreau P-A. (2009). *Melanogaster luteus*, un hypogé rare retrouvé au Monténégro. Mycol. Monten. XII, 77-83.
125. Perić, B., Perić, O. (1996). Introduzione alla micologia Montenegrina. Bollettino del Gruppo micologico G. Bresadola, (N.S.) 39 (3), 171-181.
126. Perić, B., Perić, O. (1997a). Diverzitet makromiceta Crne Gore. CANU - Glasnik Odjeljenja prirodnih nauka 11, 45-142.
127. Perić, B., Perić, O. (1997b). Petit etude de la Mycologie du Montenegro, Flora Mediterranea 7, 11-20.
128. Perić, B., Perić, O. (1997c). Gasteromycetes of Montenegro (Yugoslavia). Micologia e Vegetazione Mediterranea. 12 (2), 148-154.
129. Perić, B., Perić, O. (1998a). Les macromycètes du Monténégro (Cinq espèces

- nouvelles dans la région du Monténégro). Mycol. Monten. 1, 37-47.
130. Perić, B., Perić, O. (1998b). Champignons rares et intéressants récoltés au Parc National "Durmitor" au Monténégro. Bulletin Suisse de mycologie 5, 252-259.
 131. Perić, B., Perić, O. (1998c). Makromicete NP "Durmitor". CANU - Glasnik Odjeljenja prirodnih nauka 12, 71- 94.
 132. Perić, B., Perić, O. (1999a). Makromicete Crne Gore (18. prilog proučavanju makromiceta Crne Gore. Poljoprivreda i šumarstvo 45 (1-2). 47-67.
 133. Perić, B., Perić, O. (1999b). Prilog proučavanju makromiceta Crne Gore. Mycol. Monten. (II)1, 83-98.
 134. Perić, B., Perić, O. (2002a). Makromicete Crne Gore, 30. prilog, pet zanimljivih vrsta iz roda *Amanita*. CANU, Glasnik Odjeljenja prirodnih nauka 14, 151-176.
 135. Perić, B., Perić, O. (2002b). Makromicete Crne Gore, prilog proučavanju, n° 33, Mycol. Monten. V, 131-146.
 136. Perić, B., Perić, O. (2003). Makromicete Crne Gore, prilog proučavanju, n° 36, Mycol. Monten. VI, 73-95.
 137. Perić, B., Perić, O. (2004). Preliminarna crvena lista makromiceta Crne Gore 2°. Mycol. Monten. VII, 7-33.
 138. Perić, B., Perić, O. (2005). Makromicete Crne Gore, prilog proučavanju, n° 46. Mycol. Monten. VIII, 85-102.
 139. Perić, B., Perić, O. (2006a). *Boletus comptus* Simonini - Primo ritrovamento nel Montenegro ed ulteriore delimitazione della variabilità cromatica. Rivista di Micologia 49 (3). 235-244.
 140. Perić, B., Perić, O. (2006b). Contribution to the study of genus *Boletus s.l.* in Montenegro (Contribution to the study of macromycetes in Montenegro n° 50). Mycol. Monten. IX, 35-54.
 141. Perić, B., Perić, O. (2007). *Amanita gioiosa*, Una nuova entità della flora fungina del Montenegro. Bollettino C. M. "G. Carini" 54, 33-38.
 142. Perić, B., Perić, O. (2009). *Peziza nivalis*, deux récoltés nouvelles pour le Monténégro. Mycol. Monten. XII, 19-32.

143. Perić, B., Perić, O. (2010). *Boletus pulchrotinctus* Alessio, primo ritrovamento nel Montenegro. *Parliamo di funghi* 8 (1). 37-44.
144. Perić, B., Perić, O. (2011). Notes on Montenegrin species of *Geopora*. *Mycol. Monten.* XIV, 117-150.
145. Perić, B., Perić, O., Perić, I. (2000). Prilog proučavanju makromiceta Crne Gore. *Mycol. Monten.* III (1). 149–165.
146. Perić, B. (2011). *Gljive i cvjetnice Crne Gore*, CANU, Podgorica, 391.
147. Persson, Y., Vasaitis, R., Långström, B., Ohrn, P., Ihrmark, K., Stenlid, J. (2009). Fungi vectored by the bark beetle *Ips typographus* following hibernation under the bark of standing trees and in the forest litter. *Microbial Ecology* Oct., 58 (3). 651-9.
148. Peterson, R.L., Massicotte, H.B., Melville L.H. (2004). *Mycorrhizas: anatomy and cell biology*. NRC –Research press, Ontario, Canada, 173.
149. Pritsch, K., Boyle, H., Munch, J., Busco, C. (1997). Characterization and identification of black alder ectomycorrhizas by PCR/RFLP analyses of the rDNA internal transcribed spacer (ITS). *New Phytologist* 137, 357-369.
150. Radoglou, K., Dini-Papanastasi, O., Kostopolou, P., Spyroglou, G. (2009). Forest regeneration material: state of the art and a new European approach for pre-cultivated planting stock production, International Conference “Forestry in achieving millennium goals”, Institute of Lowland forestry and Environment, Novi Sad, Proceedings, 23-29.
151. Ranković, N. (2009) Pošumljavanje u Srbiji u periodu od 1961-2007. godine sa posebnim osvrtom na crni i beli bor. *Glasnik Šumarskog fakulteta*, br. 99, 115-134.
152. Read, D.J. (1998). Mycorrhiza – the state of the art. In: Varma A and Hock B (eds), *Mycorrhiza: Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology*. Springer Verlag, GmBh, 747.
153. Read, D.J. (1999). Mycorrhiza -The state of art in A. Varma, B. Hock, *Mycorrhiza*, 2nd Edition, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 3-34.
154. Read D.J., Perez-Moreno J. (2003). Mycorrhiza and nutrient cycling in ecosystem-a journey toward relevance? *New Phytologist* 157, 475-492.

155. Reddy, M.S., Natarajn, K. (1997). Coinoculation efficacy of ectomycorrhizal fungi on *Pinus patula* seedlings in a nursery, *Mycorrhiza* 7, 133-138.
156. Richard, F., Millot, S., Gardes, M., Selosse, M-A. (2005). Diversity and specificity of ectomycorrhizal fungi retrieved from an old-growth Mediterranean forest dominated by *Quercus ilex*. *New Phytologist* 166, 1011-1023.
157. Riffle JW, Tinus RW. 1982. Ectomycorrhizal characteristics, growth, and survival of artificially inoculated ponderosa and scots pine in a greenhouse and plantation, *For. Sci.* 28, 646-660.
158. Riffle, J.W., Tinus, R.W. (1982). Ectomycorrhizal characteristics, growth, and survival of artificially inoculated ponderosa and scots pine in a greenhouse and forest ponderosa and scots pine in a greenhouse and plantation, *For. Sci.* 28, 646-660. *Science* 28, 646-660.
159. Rinaldi, A.C., Comadini, O., Kuyper, T.W. (2008). Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff. *Fungal Diversity* 33, 1-45.
160. Rincon, A., Alvarez, I., Pera, J. (1999). Ectomycorrhizal fungi of *Pinus pinea* L. in northeastern Spain. *Mycorrhiza* 8, 271-276.
161. Rincon, A., Alvarez, I., Pera, J. (2001). Inoculation of containerized *Pinus pinea* L. seedlings with seven ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 11, 256-271.
162. Rincon, A., Ruiz-Diez, B., Garcia-Fraile, S., Lucas-Garcia, J.A., Fernandez-Pascual, M., Pueyo, J.J., de Felipe, M.R. (2005). Colonization of *Pinus halepensis* roots by *Pseudomonas fluorescens* and interaction with the ectomycorrhizal fungus *Suillus granulatus*. *FEMS Microbiology Ecology* 51, 303-311.
163. Rincon, A., de Felipe, M.R., Fernandez-Pascual, M. (2007). Inoculation of *Pinus halepensis* Mill. with selected ectomycorrhizal fungi improves seedling establishment 2 years after planting in degraded gypsum soil. *Mycorrhiza* 18, 23-32.
164. Rousseau, J.V.D., Sylvia, D.M., Fox, A.J. (1994). Contribution of ectomycorrhiza to the potential nutrient absorbing surface of pine. *New Phytologist* 128, 634-644.
165. Roux, P. (2006). Mille et un champignons, Sainte-Sigolene-France, 1224.

166. Ruiz-Diez, B., Rincon, A.M., de Felipe, M.R., Fernandez-Pascual, M. (2006). Molecular characterisation and evaluation of mycorrhizal capacity of *Suillus* isolates from Central Spain for the selection of fungal inoculants. *Mycorrhiza* 16, 465-474.
167. Sanches, F., Honrubia, M., Torres, P. (2001). Effects of pH, water stress and temperature on in vitro growth of ectomycorrhizal fungi from Mediterranean forests. *Cryptogamie Mycol.* 22 (4). 243-258.
168. Sarasini, M. (2005). *Gasteromycetes Astromiceti epigei* A.M.B. Centro Studi Micologici. Trento, 406.
169. Simard, S.W., Perry, D.A., Jones, M.D., Myrold, D.D., Durall, D.M., Molina, R. (1997). Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field, *Nature* 388, 579-582.
170. Simard, S.W., Jones, M.D., Durall, D.M., Perry, D.A., Myrold, D.D., Molina, R. (1997b). Reciprocal transfer of carbon isotopes, References between ectomycorrhizal *Betula papyrifera* and *Pseudotsuga menziesii*. *New Phytologist* 137, 529–542.
171. Selosse, M-A., Bauer, R., Moyersoen, B. (2002). Basal hymenomycetes belonging to the Sebacinaceae are ectomycorrhizal on temperate deciduous trees *New Phytologist* 155, 183–195.
172. Smith, S.E., Smith, F.A. (1990). Structure and function of the interfaces in biotrophic symbioses as they relate to nutrient transport. *New Phytologist* 114, 1-38.
173. Smith, S., Read D.J. (1997). *Mycorrhizal symbiosis*. London UK: Academic press, 605.
174. Steinfeld, D., Amaranthus M.P., Cazares, E. (2003). Survival of Ponderosa pine (*Pinus ponderosa* dougl. ex laws.) seedlings outplanted with *Rhizopogon* mycorrhizae inoculated with spores at the nursery. *Journal of arboriculture* 29(4). 197-208.
175. Stevanović, V. (1977). *Fitocenologija sa pregledom šumskih fitocenoza Jugoslavije*. Svjetlost, Sarajevo.
176. Stevanović, V., Jovanović, S., Lakušić, D. (1995). Diverzitet vegetacije Jugoslavije. U *Biodiverzitet Jugoslavije sa pregledom vrsta od međunarodnog značaja*. ed. Radović, I., Angelus, J. Ecolibri, Beograd. str. 219-241.

177. Stilinović, S., Tucović, A. (1972). Veštačke populacije munike (*Pinus heldreichii* Christ.) izvan njenog prirodnog areala u SR Srbiji. Zbornik radova sa Simpozijuma o munici, 361-368.
178. Stojičić, D. (2005). Morfo-fiziološki aspekti kulture izolovanih zigotskih embriona munike (*Pinus heldreichii* Christ.) i molike (*Pinus peuce* Gris.) *in vitro*, doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet.
179. Šijačić-Nikolić, M., Vilotić, D., Milovanović, J., Veselinović, M., Stanković, D. (2010). Application of superabsorbent polymers in the production of Scotch pine (*Pinus sylvestris* L.) and Austrian pine (*Pinus nigra* Arn.) seedlings. *Fresenius Environmental Bulletin* 19, 1180-1185.
180. Tamm, H., Pöldmaa, K., Kullman, B. (2010). Phylogenetic relationships in genus *Geopora* (*Pyronemataceae*, *Pezizales*). *Mycological Progress* DOI 10.1007/s11557-010-0659-4.
181. Taniguchi, T., Kataoka, R., Tamai, S., Yamanaka, N., Futai, K. (2009). Distribution of ectomycorrhizal and pathogenic fungi in soil along a vegetational change from Japanese black pine (*Pinus thunbergii*) to black locust (*Robinia pseudoacacia*). *Mycorrhiza* 19 (4). 231-238.
182. Taylor, D.L., Bruns, T.D. (1999). Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: Minimal overlap between the mature forest and resistant propagule communities. *Molecular Ecology* 8, 1837–1850.
183. Tedersoo, L., Hansen, K., Perry, B. A., Kjoller, R. (2006). Molecular and morphological diversity of pezizalean Ectomycorrhiza, *New Phytologist* 170, 581–596.
184. Tedersoo, L., May, T.W., Smith, M.E. (2010). Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza* 20, 217-263.
185. Tomić, Z. (1992). Šumske fitocenoze Srbije, Šumarski fakultet, Beograd.
186. Torres, P., Honrubia, M. (1994). Inoculation of containerized *Pinus halepensis* (Miller) seedlings with basidiospores of *Pisolithus arbizus* (Pers) Rauschert,

- Rhizopogon roseolus* (Corda) Th M Fr and *Suillus collinitus* (Fr) O Knutze, Ann Sci For 51, 521-528.
187. Torres, P., Honrubia, M., (1997). Changes and effects of a natural fire on ectomycorrhizal inoculum potential of soil in *Pinus halepensis* forest, Forest ecology and Management 96, 189-196.
188. Torres, P., Honrubia, M. (1994). Basidiospore viability in stored slurries. Mycological Research 98 (5). 527-530.
189. Tortić, M. (1974). Mali prilog ljetnoj flori makromiceta Crne Gore. Tokovi 9, Zbornik radova sa simpozija o flori i vegetaciji jugoistočnih Dinarida, Andrijevića VII 1973, 207-214.
190. Tortić, M. (1988). Makromiceti Crne Gore, CANU, Glasnik odjeljenja prirodnih nauka 6, 113-138.
191. Trappe, J.M., Claridge, A.W., Claridge, D.L., Liddle, L. (2008). Desert truffles of Australian outback: ecology, ethnomycology and Taxonomy. Econ. Bot. 62, 497-506.
192. Trusty, P. E. (2009). Impact of severe fire on ectomycorrhizal fungi of whitebark pine seedlings, Master Thesis, Montana State University Bozeman, Montana, 142.
193. Van Vooren, N. (2009). Description de *Peziza gerardii* (*Ascomycota Pezizales*) et présentation d'une récolte à petites spores. Mycol. Monten. 12, 33-40.
194. Vasiliaskas, R., Menkis, A., Finlay, R.D., Stenlid, J. (2007). Wood decay fungi in living roots of coniferous seedlings. New Phytologist 174, 441-446.
195. Vidaković M. (1982). Četinjače-morfologija i varijabilnost. Jugoslavenska Akademija Znanosti i Umjetnosti, Zagreb, 428-435.
196. Visser, S. (1995). Ectomycorrhizal fungal succession in jack pine stands following wild –fire. New Phytologist 129, 389-401.
197. Veličković D. (2000). Osnovi Biohemije. Univerzitet u Beogradu, Beograd, 160-171.
198. Vukićević, E. (1974). Dekorativna dendrologija. Naučna knjiga, Beograd.
199. Wallander, H., Mahmood, S., Hagerberg, D., Johansson, L., Pallon, J. (2003). Elemental composition of ectomycorrhizal mycelia identified by PCR-RFLP analysis and grown in contact with apatite or wood ash in forest soil, FEMS Microbiology Ecology 44, 57-65.

200. Warcup, J.H. (1990). Occurrence of ectomycorrhizal and saprophytic discomycetes after a wild fire in a eucalypt forest. *Mycological Research* 94, 1065-1069.
201. Walbert, K., Ramsfield, T. D., Ridgway, H. J., Jones, E. E. (2010). Ectomycorrhiza of *Pinus radiata* (D. Don 1836) in New Zealand—an above and belowground assessment, *Australasian Mycologist* 29, 7–16.
202. Zhang Z., Schwartz S., Wagner L., Miller W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput Biol.* 7 (1-2). 203-214.
203. Zotti, M., Di Piazza, S., Vizzini, A. (2010). First records of *Rhizopogon rocabrunae* and *R. pumilionum* (*Boletales*) from Italy. *Mycotaxon* 113, 291–296.
204. [www. index fungorum.org](http://www.index fungorum.org)

Prilog 1. Taksoni gljiva zabeleženi u Crnoj Gori, unutar ektomikoriznih rodova Ascomycota i Basidiomycota i njihovo rasprostranjenje *

TAKSON	medit. š i kult borova	termofil. submed. š. lišč	mezofil. š mezij. bukve	borealne četinarske šume	relikt š balk.h borova	LITERATURNI IZVOR
ASCOMYCOTA						
PEZIZALES						
<i>Humaria</i> (Pyronemataceae)						
<i>H. hemisphaerica</i> (F.H.Wigg)Fuekel			+			PERIĆ i PERIĆ, 1999b; PERIĆ <i>et al.</i> , 2000
<i>Geopora</i> (Pyronemataceae)						
<i>G. arenicola</i> (Lév.) Kers	+					PERIĆ i PERIĆ, 2011
<i>G. cooperi</i> Harkn.	+					PERIĆ i PERIĆ, 2011
<i>G. foliacea</i> (Schaeff.) S. Ahmad	+					PERIĆ, 2002; PERIĆ i PERIĆ, 2011
<i>G. sumneriana</i> (Cooke) M.Torre	+					PERIĆ i PERIĆ, 2011
<i>G. tenuis</i> (Fuekel) T. Schumach.		+ ^c				PERIĆ i PERIĆ, 2011
<i>Otidea</i> (Pyronemataceae)						
<i>O. bufonia</i> (Pers.) Boud.	+	+				PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 2002
<i>O. grandis</i> (Pers.) Rehm	+					PERIĆ i PERIĆ, 2005
<i>O. leporina</i> (Batsch) Fuekel			+			MATOČEC i FOCHT, 2000
<i>O. onotica</i> (Pers.) Fuekel			+			KARADŽIĆ, 1995
<i>Marcelleina</i> (Pezizaceae)						
<i>M. personii</i> (P. Crouan & H. Crouan) Brumm.			+			PERIĆ, 2008c
<i>Pulvinula</i> (Pezizaceae)						
<i>P. convexella</i> (P. Karst.) Pfister				+		PERIĆ, 2008
<i>P. laetirubra</i> (Rehm) Pfister	+					PERIĆ, 2006
<i>Sarcosphaera</i> (Pezizaceae)						

TAKSON	medit. š i kult borova	termofil. submed. š. lišč	mezofil š mezij, bukve	borealne četinarske šume	relikt š balk.h borova	LITERATURNI IZVOR
<i>S. coronaria</i> (Jacq.) J. Schröt.	+					PERIĆ i PERIĆ, 1997a kao <i>S. eximia</i> (Dur. ex Lev.) Maire; 2002b, 2005
<i>S. eximia</i> var. <i>nivea</i> M.M. Moser			+			PERIĆ i PERIĆ, 1997
<i>Sowerbyella</i> (Pyrenomataceae)						
<i>S. fagicola</i> J. Moravec			+			PERIĆ, 2008b
<i>Trichophaea</i> (Pyrenomataceae)						
<i>T. hemisphaerioides</i> (Mouton) Graddon	+					PERIĆ 2002; PERIĆ i PERIĆ, 2005
<i>Tarzetta</i> (Pyrenomataceae)						
<i>T. catinus</i> (Holmsk.)Korf & Rogers		+				PERIĆ, 1999a; PERIĆ <i>et al.</i> , 2000
<i>T. cupularis</i> (L.) Svrček	+					PERIĆ i PERIĆ, 1997b
<i>T. gaillardiana</i> (Boud.) Korf & J.K. Rogers		+				PERIĆ i PERIĆ, 2002b
<i>Peziza</i> (Pezizaceae)						
<i>P. acroornata</i> Dougoud & J. Moravec			+ ^a			PERIĆ, 2011a
<i>P. arvernensis</i> Boud.			+			PERIĆ i PERIĆ, 2003, 2005
<i>P. badiofusca</i> (Boud.) Dennis		+				PERIĆ i PERIĆ, 1997a
<i>P. berthetiana</i> Donadini	+					PERIĆ i PERIĆ, 2002b
<i>P. cerea</i> Sowerby			+			PERIĆ, 1999a
<i>P. domiciliana</i> Cooke		+				PERIĆ i PERIĆ, 2002, 2004
<i>P. fimeti</i> (Fuckel) E.C. Hansen	+					PERIĆ i PERIĆ, 1997a
<i>P. gerardii</i> Cooke						VAN VOOREN, 2010
<i>P. lividula</i> W. Phillips			+			PERIĆ, 2009
<i>P. michelii</i> (Boud.) Dennis			+			PERIĆ i PERIĆ, 1997a

TAKSON	medit. š i kult borova	termofil. submed. š. lišč	mezofil š mezij, bukve	borealne četinarske šume	relikt š balk.h borova	LITERATURNI IZVOR
<i>P. micropus</i> Pers.	+					PERIĆ i PERIĆ, 1997a
<i>P. nivalis</i> (R. Heim & L. Remy) M.M Moser					+ ^b	PERIĆ i PERIĆ, 1999a, 2009
<i>P. phyllogena</i> Cooke		+				PERIĆ i PERIĆ, 2002b kao <i>P. badiocconfusa</i> (Boud.) Dennis
<i>P. repanda</i> Wahlenb.		+				PERIĆ i PERIĆ, 1999a; PERIĆ <i>et al.</i> 2000
<i>P. saniosa</i> Schrad.	+					PERIĆ i PERIĆ, 2002b
<i>P. subumbrina</i> Boud.			+ ^a			PERIĆ, 2010a
<i>P. tenacella</i> W. Phillips	+		+			MATOČEC i FOCHT, 2000; PERIĆ i PERIĆ, 2002b, 2003, 2005
<i>P. varia</i> (Hedw.) Fr.		+				PERIĆ i PERIĆ, 2002b
<i>Helvella</i> (Helvellaceae)						
<i>H. albella</i> Quéf.	+	+				PERIĆ i PERIĆ 2005; PERIĆ, 2010b
<i>H. atra</i> J. König	+	+	+			PERIĆ, 2010b
<i>H. branzeiana</i> Svrček & J. Moravec			+			PERIĆ 2010b, 2011b
<i>H. crispa</i> (Scop.) Fr.			+			PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 1999a, 2005
<i>H. cupuliformis</i> Dissing & Nannf.						PERIĆ, 2010c
<i>H. elastica</i> Bull.	+	+	+			PERIĆ i PERIĆ ,1997a; PERIĆ, 2010b
<i>H. ephippium</i> Lév.		+	+			PERIĆ, 2010b
<i>H. lacunosa</i> Afzel.	+	+	+			KARADŽIĆ, 1995; PERIĆ i PERIĆ, 1997a kao kao <i>H. sulcata</i> Afzel.; PERIĆ i PERIĆ ,2005, PERIĆ <i>et al.</i> , 2000
<i>H. latispora</i> Boud.	+	+	+			PERIĆ, 2010b
<i>H. leucopus</i> Scop.			+			KARADŽIĆ, 1995, kao <i>Leptopodia monachella</i>

TAKSON	medit. š i kult borova	termofil. submed. š. lišč	mezofil š mezij, bukve	borealne četinarske šume	relikt š balk.h borova	LITERATURNI IZVOR
<i>H. sulcata</i> Afz. var. <i>cinerea</i> (Afzel.) Bres.		+				PERIĆ i PERIĆ, 1999a, 1999b, 2002 kao <i>lacunosa</i> Afzel var. <i>cinerea</i> , 2002b
<i>Wynnella</i> (<i>Helvellaceae</i>)						
<i>W. auricula</i> (Schaeff.) Boud.				+		TORTIĆ, 1974; KARADŽIĆ, 1995 kao <i>Otidea auricula</i> (Schaeff.) Sacc.
BASIDIOMYCOTA AGARICALES <i>Amanita</i> Pers.(<i>Amanitaceae</i>)						
<i>A. battarrae</i> (Boud.) Bon		+	+	+		KARADŽIĆ, 1995; PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 1999a kao <i>A. umbrinolutea</i> (Secr. ex. Gill.) Bataille
<i>A. caesarea</i> (Scop.) Pers.		+	+			KARADŽIĆ, 1995; PERIĆ i PERIĆ, 2003, 2004, 2005; LAZAREVIĆ, 2010
<i>A. ceciliae</i> (Berk. & Broome) Bas		+				PERIĆ i PERIĆ, 2002b kao <i>A. strangulata</i> (Fr.) Quél.
<i>A. citrina</i> var. <i>alba</i> (Pers.) Quél. & Bataille		+				PERIĆ i PERIĆ, 2002b
<i>A. crocea</i> (Quél.) Singer	+	+	+			PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 1999a, 2002b, 2005
<i>A. decipiens</i> (Trimbach) Jackquet.		+				PERIĆ i PERIĆ, 2002a, 2004
<i>A. eliae</i> Quél.			+			PERIĆ i PERIĆ, 1997a
<i>A. excelsa</i> (Fr.) Bertill.			+			PERIĆ i PERIĆ, 1997a
<i>A. excelsa</i> var. <i>spissa</i> (Fr.) Neville & Poumarat				+		KARADŽIĆ, 1995 kao <i>A. spissa</i> Fr.
<i>A. franchetii</i> (Boud.) Fayod		+	+			PERIĆ <i>et al.</i> , 2000, kao <i>A. aspera</i> ; PERIĆ i PERIĆ, 2004
<i>A. fulva</i> Fr.		+	+			PERIĆ i PERIĆ, 1997a
<i>A. gioiosa</i> S. Curreli		+				PERIĆ i PERIĆ, 2007
<i>A. lividopallescens</i> (Secr. ex Boud.) Kühner & Romagn.		+				PERIĆ i PERIĆ, 1999a, 1999b, 2002a, 2005; PERIĆ <i>et al.</i> 2000
<i>A. mairei</i> Foley		+				PERIĆ <i>et al.</i> , 2000
<i>A. muscaria</i> (L.) Lam.			+	+		KARADŽIĆ, 1995; PERIĆ i PERIĆ, 1997a;

TAKSON	medit. š i kult borova	termofil. submed. š. lišč	mezofil š mezij, bukve	borealne četinarske šume	relikt š balk.h borova	LITERATURNI IZVOR
						LAZAREVIĆ, 2010,
<i>A. ovoidea</i> (Bull.) Link	+	+				PERIĆ i PERIĆ, 1999b, 2002a, 2002b, 2004
<i>A. pantherina</i> (DC.) Krombh,		+	+			KARADŽIĆ, 1995; PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 1999a, 1999b, 2002b, 2005, PERIĆ <i>et al.</i> , 2000 kao <i>A. pantherina</i> f. <i>robusta</i> Pearson, 1997b, 1999b; LAZAREVIĆ, 2010,
<i>A. phalloides</i> (Vail ex Fr.) Link		+	+			KARADŽIĆ 1995; PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 1999b; PERIĆ <i>et al.</i> , 2000
<i>A. rubescens</i> Pers.		+	+	+		KARADŽIĆ, 1995; PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 1999a, 1999b, 2002b, 2005; PERIĆ <i>et al.</i> , 2000
<i>A. solitaria</i> (Bull.) Fr.		+				PERIĆ i PERIĆ, 2002a, 2002b, 2004; PERIĆ <i>et al.</i> , 2000
<i>A. strobiliformis</i> (Paul. ex Vittad.) Bertill.		+				TOTRIĆ, 1988
<i>A. vaginata</i> (Bull.) Lam.	+	+	+	+	+ ^a	KARADŽIĆ, 1995; PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 1999a, 1999b, 2002; 2002b kao <i>A. vaginata</i> var. <i>plumbea</i> ; 2005; PERIĆ <i>et al.</i> , 2000 kao <i>A. plumbea</i> (Schaeff.) Secretan; LAZAREVIĆ, 2010
<i>A. vaginata</i> var. <i>alba</i> (De Seynes) Gillet	+	+				PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 1999b, 2002b, 2005
<i>A. verna</i> (Bull.) Lam.			+			PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 2004
<i>A. verna</i> var. <i>decepiens</i> Timbach		+				PERIĆ i PERIĆ, 1999 b
<i>A. vittadinii</i> (Moretti) Vittad.		+				PERIĆ i PERIĆ, 2002a, 2002b, 2003, 2004.
<i>Cortinarius</i> (Pers.) Gray. (<i>Cortinariaceae</i>)						
<i>C. bulliardii</i> (Pers.) Fr.		+				PERIĆ i PERIĆ, 1999b, 2004; PERIĆ 2011c.
<i>C. caperatus</i> (Pers.) Fr.			+	+		KARADŽIĆ 1995, PERIĆ i PERIĆ, 1999b, 2004 kao <i>Rozites caperatus</i> (Pers.) Karst.
<i>C. fragrans</i> Gaugué		+				PERIĆ i PERIĆ, 1999b
<i>C. glaucopus</i> (Schaff.) Fr.				+		KARADŽIĆ, 1995
<i>C. guttatus</i> Rob. Henry				+		KARADŽIĆ, 1995
<i>C. hinnuleus</i> Fr.		+	+			PERIĆ i PERIĆ, 1999a, 2000

TAKSON	medit. š i kult borova	termofil. submed. š. lišč	mezofil š mezij, bukve	borealne četinarske šume	relikt š balk.h borova	LITERATURNI IZVOR
<i>C. hercynicus</i> (Pers.) M.M. Moser				+		KARADŽIĆ, 1995
<i>C. largus</i> Fr.			+			PERIĆ i PERIĆ, 2003, kao <i>C. nemorensis</i> (Fr.) Lange
<i>C. odorifer</i> Britzelm.				+		KARADŽIĆ, 1995
<i>C. orellanus</i> Fr.			+			PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 2004
<i>C. praestans</i> Cordier			+			PERIĆ i PERIĆ, 1999b, 2004
<i>C. rubellus</i> Cooke				+		KARADŽIĆ, 1995, kao <i>C. speciosissimus</i> Kühn. & Romagn.
<i>C. spilomeus</i> (Fr.) Fr.				+		PERIĆ i PERIĆ, 1997a
<i>C. trivialis</i> J.E. Lange		+				PERIĆ i PERIĆ, 1999a, PERIĆ <i>et al.</i> , 2000
<i>C. variiformis</i> Malençon			+			KARADŽIĆ, 1995 kao <i>C. varius</i> (Schaeff.) Fr.
<i>C. vitellinus</i> M.M. Moser					+	PERIĆ i PERIĆ, 1999b; LAZAREVIĆ, 2010
<i>C. zinziberatus</i> (Scop.) Fr.		+	+			PERIĆ i PERIĆ, 1997a
<i>Entoloma</i> (Fr.) P. Kumm. (<i>Entolomataceae</i>)						
<i>E. chalybaeum</i> var. <i>lazulinum</i> (Fr.) Noordel.		+				PERIĆ i PERIĆ, 2002b
<i>E. chloroxanthum</i> G. Stev.	+					PERIĆ i PERIĆ, 2005 kao <i>E. incanum</i> (Fr.) Hesler
<i>E. clypeatum</i> (L.) P. Kumm.			+			PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 1999b
<i>E. hirtipes</i> (Schumach.)M.M. Moser				+		PERIĆ i PERIĆ, 1997a
<i>E. incanum</i> (Fr.) Hesler	+					PERIĆ i PERIĆ, 2005
<i>E. lividoalbum</i> (Küh. & Romagn.) Kubička			+			PERIĆ i PERIĆ, 1999b
<i>E. nitidum</i> Quéf.			+			PERIĆ & PERIĆ, 1997a
<i>E. occultopigmentatum</i> Arnolds & Noordel.	+	+				PERIĆ <i>et al.</i> , 2000
<i>E. politum</i> (Pers.) Donk		+	+			PERIĆ <i>et al.</i> , 2000
<i>E. sepium</i> (Noul.& Dass.) Richon & Roze			+			PERIĆ i PERIĆ, 1997a; PERIĆ <i>et al.</i> 2000
<i>E. sericeoides</i> (J.E. Lange) Noordel.		+				PERIĆ i PERIĆ, 1997a

TAKSON	medit. š i kult borova	termofil. submed. š. lišč	mezofil š mezij, bukve	borealne četinarske šume	relikt š balk.h borova	LITERATURNI IZVOR
<i>E. sinuatum</i> (Bull.) P. Kumm.		+	+			PERIĆ i PERIĆ, 2003, 2005
<i>Hebeloma</i> (Fr.) P. Kumm. (<i>Strophariaceae</i>)						
<i>H. crustuliniforme</i> (Bull.) Quéf.			+			PERIĆ i PERIĆ, 2005
<i>H. sinapizans</i> (Fr.) Sacc.		+	+			PERIĆ i PERIĆ, 1999a, 1999b, 2005; PERIĆ <i>et al.</i> , 2000; LAZAREVIĆ, 2010
<i>H. radicosum</i> (Bull.) Ricken			+		+	PERIĆ i PERIĆ, 1999b
<i>Hygrophorus</i> Fr. (<i>Hygrophoraceae</i>)						
<i>H. capreolarius</i> Kalchbr.				+		KARADŽIĆ, 1995
<i>H. chrysodon</i> (Batsch) Fr.			+	+		KARADŽIĆ, 1995; PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 1999b, 2003, 2005
<i>H. cossus</i> (Sowerby) Fr.		+				PERIĆ i PERIĆ, 1999b
<i>H. gliocyclus</i> Fr.					+	PERIĆ i PERIĆ, 2004, 2005
<i>H. eburneus</i> (Bull.) Fr.			+ ^c	+		PERIĆ i PERIĆ, 1999b, 2004, 2005, PERIĆ <i>et al.</i> , 2000; KASOM, 2004; LAZAREVIĆ, 2010,
<i>H. erubescens</i> (Fr.) Fr.						PERIĆ i PERIĆ, 1997a
<i>H. hypothejus</i> (Fr.) Fr.			+ ^c		+	PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 1999a, 2004; PERIĆ <i>et al.</i> , 2000
<i>H. latitabundus</i> Britzelm.			+ ^c			PERIĆ i PERIĆ, 1999b
<i>H. marzuolus</i> (Fr.) Bres.			+	+		KARADŽIĆ, 1995; PERIĆ i PERIĆ, 2002, 2004
<i>H. olivaceoalbus</i> Fr.	+					PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 2004
<i>H. penarius</i> Fr.		+				PERIĆ i PERIĆ, 1997a
<i>H. persoonii</i> Arnolds		+				PERIĆ i PERIĆ, 1997a kao <i>H. dichrous</i> Kuhn. & Romagn.; PERIĆ, <i>et al.</i> , 2000
<i>H. piceae</i> Kühner				+		KARADŽIĆ, 1995
<i>H. poetarum</i> R. Heim			+			PERIĆ i PERIĆ, 2004
<i>H. pudorinus</i> (Fr.) Fr.			+	+		KARADŽIĆ 1995; PERIĆ i PERIĆ, 2004
<i>H. russula</i> (Schaeff.) Kauffman		+				PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 1999b, 2004
<i>Inocybe</i> (Fr.) Fr. (<i>Inocybaceae</i>)						

TAKSON	medit. š i kult borova	termofil. submed. š. lišč	mezofil š mezij, bukve	borealne četinarske šume	relikt š balk.h borova	LITERATURNI IZVOR
<i>I. adequata</i> (Britzelm.) Sacc.		+	+			PERIĆ & PERIĆ, 1997a, 1999a kao <i>I. jurana</i> Pat.
<i>I. asterospora</i> Quél.	+		+			PERIĆ i PERIĆ, 1997a
<i>I. cervicolor</i> (Pers.) Quél.	+	+				PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 1999b kao <i>I. bongardii</i> (Weinm.) Quél.
<i>I. fuscidula</i> var. <i>fuscidula</i> Velen.	+					PERIĆ i PERIĆ, 1997a kao <i>I. brunneoatra</i> (R. Heim) P.D. Orton
<i>I. geophylla</i> (Fr.)Karst. var. <i>geophylla</i>	+					PERIĆ, 1999b
<i>I. geophylla</i> var. <i>lilacina</i> Gillet	+	+				PERIĆ ,1999b, PERIĆ & PERIĆ, 2005, PERIĆ <i>et al.</i> 2000
<i>I. grata</i> (Weinm.) Gillet	+					PERIĆ i PERIĆ, 1997a
<i>I. griseolilacina</i> J.E. Lange	+	+				PERIĆ i PERIĆ, 1999b objavljena kao <i>I. geophylla</i> var. <i>violacea</i> . rev. B. Perić
<i>I. maculata</i> Boud.			+			PERIĆ i PERIĆ, 1997a
<i>I. rimosa</i> (Bull.) P. Kumm.	+			+		KARADŽIĆ 1995; PERIĆ i PERIĆ, 1997a kao <i>I. fastigiata</i> Quél.
<i>I. sindonia</i> (Fr.) P. Karst.			+			PERIĆ i PERIĆ, 2005
Laccaria Berk. & Broome (<i>Hydnangiaceae</i>)						
<i>L. amethystina</i> (Huds.) Cooke		+	+	+	+	TOTRIĆ, 1988; KARADŽIĆ, 1995; PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 1999a, 1999b; PERIĆ <i>et al.</i> , 2000, LAZAREVIĆ, 2010
<i>L. laccata</i> (Scop.) Cooke	+	+	+			TORTIĆ 1988; PERIĆ i PERIĆ 1997a, 1999a, 1999b; PERIĆ <i>et al.</i> , 2000
Tricholoma (Fr.) Staude (<i>Tricholomataceae</i>)						
<i>T. acerbum</i> (Bull.) Vent.		+				PERIĆ i PERIĆ, 2004, 2005
<i>T. albobrunneum</i> (Pers.) Kumm.	+					PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 2005; LAZAREVIĆ, 2010
<i>T. aurantium</i> (Schaeff.) Ricken				+		KARADŽIĆ, 1995
<i>T. batschii</i> Gulden	+	+			+	PERIĆ & PERIĆ, 1997a; PERIĆ & PERIĆ, 2002b; LAZAREVIĆ, 2010
<i>T. caligatum</i> (Viv.) Ricken	+					PERIĆ & PERIĆ, 2004; PERIĆ <i>et al.</i> , 2000

TAKSON	medit. š i kult borova	termofil. submed. š. lišč	mezofil š mezij, bukve	borealne četinarske šume	relikt š balk.h borova	LITERATURNI IZVOR
<i>T. equestre</i> (L.) P. Kumm.	+		+	+		KARADŽIĆ, 1995; PERIĆ i PERIĆ, 1997a kao <i>T. flavovirens</i> (Pers.)Lund, 1999b
<i>T. gausapatum</i> (Fr.) Quél.			+	+		KARADŽIĆ, 1995
<i>T. imbricatum</i> (Fr.) Quél.					+	PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 1999b, 2003; LAZAREVIĆ, 2009, 2010
<i>T. portentosum</i> (Fr.) Quél.				+		KARADŽIĆ, 1995
<i>T. sculpturatum</i> (Fr.) Quél.		+	+			PERIĆ i PERIĆ, 1999b, 2000
<i>T. sciodes</i> (Pers.) C. Martin			+			PERIĆ i PERIĆ, 1997a
<i>T. sejunctum</i> (Sowerby) Quél.		+				PERIĆ i PERIĆ, 2004; PERIĆ <i>et al.</i> , 2000
<i>T. sulphureum</i> (Bull.) P. Kumm.	+ ^e	+ ^c	+ ^c	+ ^c		KARADŽIĆ, 1995; PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 2000
<i>T. sulphureum</i> var. <i>coronarium</i> (Pers.) Sacc.			+			PERIĆ <i>et al.</i> , 2000
<i>T. terreum</i> (Schaeff.) P. Kumm.	+	+			+	KARADŽIĆ, 1995; PERIĆ i PERIĆ, 1997, 2000, 2002, 2003, 2005
<i>T. ustaloides</i> Romagn.	+					PERIĆ i PERIĆ, 2000
<i>T. viridifucatum</i> Bon		+ ^c				PERIĆ i PERIĆ, 2005
<i>T. vaccinum</i> (Schaeff.) P. Kumm.	+			+		KARADŽIĆ, 1995; PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 2002b, 2004
BOLETALES						
<i>Boletus</i> Dill. ex L. : Fr. (<i>Boletaceae</i>)						
<i>B. aereus</i> Bull. : Fr.		+	+			PERIĆ i PERIĆ, 2004, 2006b
<i>B. aestivalis</i> Paulet : Fr.		+	+ ^f			KARADŽIĆ, 1995; PERIĆ i PERIĆ, 2006b
<i>B. appendiculatus</i> Schaeff.						KARADŽIĆ, 1995, PERIĆ i PERIĆ, 2004, 2006b
<i>B. calopus</i> Pers. : Fr.		+	+ ^f	+		KARADŽIĆ, 1995; PERIĆ i PERIĆ, 2006b
<i>B. comptus</i> Simonini		+				PERIĆ i PERIĆ, 2006a, 2006b
<i>B. edulis</i> Bull. : Fr. f. <i>edulis</i>		+	+	+		KARADŽIĆ, 1995; PERIĆ i PERIĆ, 2006b
<i>B. erythropus</i> Pers. var. <i>erythropus</i>		+	+	+		TORTIĆ, 1988; KARADŽIĆ, 1995; PERIĆ i PERIĆ, 2006b
<i>B. fechtneri</i> Velen.		+	+ ^f			PERIĆ i PERIĆ, 2004, 2006b; LAZAREVIĆ, 2010

TAKSON	medit. š i kult borova	termofil. submed. š. lišč	mezofil š mezij, bukve	borealne četinarske šume	relikt š balk.h borova	LITERATURNI IZVOR
<i>B. fragrans</i> Vittad.		+				PERIĆ i PERIĆ, 2006b
<i>B. legaliae</i> Pilat						LAZAREVIĆ, 2010; B. PERIĆ, 2011
<i>B. lupinus</i> Fr.		+				PERIĆ i PERIĆ, 2004, 2006b
<i>B. luridus</i> Schaeff.: Fr. var. <i>luridus</i>	+	+				TORTIĆ, 1988; KARADŽIĆ, 1995; PERIĆ & PERIĆ, 2006b; LAZAREVIĆ, 2010
<i>B. luridus</i> f. <i>lupinus</i> Pelter. ex Gilb.	+					PERIĆ i PERIĆ 2006b
<i>B. pinophilus</i> Pilát & Dermek			+			KARADŽIĆ, 1995 kao <i>B. pinicola</i> ; PERIĆ i PERIĆ, 2006b
<i>B. pseudoregius</i> Huber ex Estad.		+				PERIĆ i PERIĆ, 2006b
<i>B. pulchrotinctus</i> Alessio		+				PERIĆ i PERIĆ, 2006b, 2010
<i>B. queletii</i> var. <i>lateritius</i> (Bres. et Schulz.) Gilb.		+				TORTIĆ, 1988 kao <i>B. queletii</i> ; PERIĆ i PERIĆ, 2006b
<i>B. radicans</i> Pers. : Fr.		+				PERIĆ i PERIĆ, 2004 kao <i>B. albidus</i> , 2006b; LAZAREVIĆ, 2010
<i>B. regius</i> Krombh.			+			PERIĆ i PERIĆ, 2004, 2006b
<i>B. rhodopurpureus</i> Smotl. f. <i>rhodopurpureus</i>			+ ^f			PERIĆ i PERIĆ, 2006b
<i>B. rhodoxanthus</i> Krombh.			+ ^f			PERIĆ i PERIĆ, 2006b
<i>B. rubrosanguineus</i> (Walty) Cheype			+			PERIĆ i PERIĆ, 2006b
<i>B. satanas</i> Lenz		+				KARADŽIĆ, 1995; KASOM, 2004; PERIĆ i PERIĆ, 2004, 2006
<i>B. separans</i> Peck		+				PERIĆ i PERIĆ, 2006
<i>B. spretus</i> Bertéa		+				KARADŽIĆ, 1995 kao <i>B. splendidus</i> ; PERIĆ i PERIĆ, 2006
<i>B. subappendicularis</i> Dermek, Lazebn. & J. Veselský			+			PERIĆ i PERIĆ, 2004, 2006
<i>Leccinum</i> Gray (<i>Boletaceae</i>)						
<i>L. aurantiacum</i> (Bull.) S.F. Gray			+ ^g			KARADŽIĆ, 1995; PERIĆ i PERIĆ, 2006b

TAKSON	medit. š i kult borova	termofil. submed. š. lišč	mezofil š mezij, bukve	borealne četinarske šume	relikt š balk.h borova	LITERATURNI IZVOR
<i>Leccinum pseudoscabrum</i> (Kallenb.) Šutara			+ ^g			PERIĆ i PERIĆ, 2006b kao <i>L. carpini</i> (R. Schultz in Michael) M.M. Moser ex D.A. Reid
<i>L. scabrum</i> (Bull.) Gray.			+ ^g			KARADŽIĆ, 1995; PERIĆ i PERIĆ, 2006b; LAZAREVIĆ, 2010
<i>L. versipelle</i> (Fr. & Hök) Snell			+ ^g			PERIĆ i PERIĆ, 2006b
<i>L. vulpinum</i> Watling			+ ^c			PERIĆ i PERIĆ, 2006b
<i>Leccinellum</i> Bresinsky & Manfr. Binder (<i>Boletaceae</i>)						
<i>Leccinellum griseum</i> (Quél.) Bresinsky & Manfr. Binder				+		KARADŽIĆ, 1995 kao <i>Leccinum griseum</i> (Quél.) Singe
<i>Phylloporus</i> Quél. (<i>Boletaceae</i>)						
<i>Phylloporus pelletieri</i> (Lév.) Quél.				+		PERIĆ i PERIĆ, 2006b, kao <i>Xerocomus pelletieri</i> (Lév.) Binder
<i>Porphyrellus</i> E.-J. Gilbert (<i>Boletaceae</i>)						
<i>P. porphyrosporus</i> (Fr.) Gilb.				+		TORTIĆ, 1988, kao <i>Porphyrellus pseudoscaber</i> (Secr.) Sing.; PERIĆ i PERIĆ 2006b
<i>Strobilomyces</i> Berk. (<i>Boletaceae</i>)						
<i>S. strobilaceus</i> (Scop. :Fr.) Berk.			+			PERIĆ i PERIĆ, 2006b
<i>Tylopilus</i> P. Karst. (<i>Boletaceae</i>)						
<i>T. felleus</i> (Bull.: Fr.) P. Karst				+		PERIĆ i PERIĆ, 2006b
<i>T. pseudoscaber</i> Secr. ex A.H. Sm. & Thiers				+		KARADŽIĆ 1995
<i>Xerocomus</i> Quél. (<i>Boletaceae</i>)						
<i>X. impolitus</i> (Fr.) Quél.		+	+			PERIĆ i PERIĆ, 2004 kao <i>Boletus impolitus</i> Fr.; 2006b; KASOM 2004
<i>X. chrysenteron</i> (Bull.) Quél.		+	+			PERIĆ i PERIĆ, 2006b, kao <i>Boletus chrysenteron</i>
<i>X. ferrugineus</i> (Schaeff.) Bon		+	+			PERIĆ i PERIĆ, 2006b, kao <i>Boletus ferrugineus</i>
<i>X. porosporus</i> Imler			+			PERIĆ i PERIĆ, 2006b, kao <i>Boletus porosporus</i>
<i>X. pruinatus</i> (Fr.) Quél.				+		PERIĆ i PERIĆ, 2006b, kao <i>Boletus pruinatus</i>

TAKSON	medit. š i kult borova	termofil. submed. š. lišč	mezofil š mezij, bukve	borealne četinarske šume	relikt š balk.h borova	LITERATURNI IZVOR
<i>X. rubellus</i> (Krombh.) Quél.		+				PERIĆ i PERIĆ, 2006b, kao <i>Boletus rubellus</i>
<i>X. subtomentosus</i> (L.: Fr.) Quél.		+	+			KARADŽIĆ, 1995, kao <i>B. subtomentosus</i> ; PERIĆ i PERIĆ, 2006b
<i>Gyrodon</i> Opat. (<i>Gyrodontaceae</i>)						
<i>G. lividus</i> (Bull.) Fr.			+			PERIĆ i PERIĆ, 2004, 2006b
<i>Alpova</i> Dodge(<i>Paxillaceae</i>)						
<i>A. komoviana</i> B. Perić & P.-A. Moreau			+ ^a			MOREAU <i>et al.</i> , 2012.
<i>Melanogaster</i> Corda (<i>Paxillaceae</i>)						
<i>M. odoratissimus</i> (Vittad.) Tul.		+				LAZAREVIĆ, 2009
<i>M. luteus</i> Zeller			+ ^a			PERIĆ i MOREAU, 2009
<i>Paxillus</i> Fr. (<i>Paxillaceae</i>)						
<i>P. lividus</i> Cooke			+			PERIĆ i PERIĆ, 1997a
<i>P. involutus</i> (Batsch) Fr.			+ ^b			PERIĆ i PERIĆ, 1997a
<i>Gyroporus</i> Quél. (<i>Gyroporaceae</i>)						
<i>G. castaneus</i> (Bull.) Quél.		+ ^c	+			PERIĆ i PERIĆ, 2004, 2006b
<i>G. cyanescens</i> (Bull.) Quél.			+			PERIĆ i PERIĆ, 2004, 2006b
<i>Pisolithus</i> Alb. & Schwein. (<i>Sclerodermataceae</i>)						
<i>P. arhizus</i> (Scop.) Rauchert		+				PERIĆ i PERIĆ, 1999b 2004; LAZAREVIĆ 2009, 2010
<i>Scleroderma</i> Pers. (<i>Sclerodermataceae</i>)						
<i>S. areolatum</i> Ehrenb.		+				PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 1999b
<i>S. bovista</i> Fr.	+	+			+	PERIĆ i PERIĆ, 2002b, PERIĆ <i>et al.</i> , 2000
<i>S. citrinum</i> Pers.		+	+ ^c			PERIĆ i PERIĆ, 1997a kao <i>S. aurantium</i> L. Pers, 1999b; PERIĆ <i>et al.</i> , 2000
<i>S. polyrhizum</i> (J.F. Gmel.) Pers.		+				PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 2002b
<i>S. verrucosum</i> (Bull.) Pers.		+				PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 1999b

TAKSON	medit. š i kult borova	termofil. submed. š. lišč	mezofil š mezij, bukve	borealne četinarske šume	relikt š balk.h borova	LITERATURNI IZVOR
<i>Chroogomphus</i> (Singer) O.K. Mill. (<i>Gomphidiaceae</i>)						
<i>C. rutilus</i> (Schaeff.) O.K. Mill.		+ ^c	+ ^c	+	+	KARADŽIĆ, 1995; PERIĆ i PERIĆ, 1999a, 1999b, PERIĆ <i>et al.</i> , 2000
<i>Gomphidius</i> Fr. (<i>Gomphidiaceae</i>)						
<i>G. glutinosus</i> (Schaeff.) Fr.			+ ^c			PERIĆ i PERIĆ, 1999b
<i>Rhizopogon</i> Fr. & Nordholm (<i>Rhizopogonaceae</i>)						
<i>R. roseolus</i> (Corda) Th. Fr.	+				+	PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 1997c, 2004 kao <i>R. vulgaris</i> (Vitt.) M. Lange; PERIĆ i PERIĆ, 1998a
<i>Suillus</i> Micheli ex Adans. (<i>Suillaceae</i>)						
<i>S. bellinii</i> (Inzenga) Watling	+					PERIĆ i PERIĆ, 2006b
<i>S. bovinus</i> (Pers.) Roussel				+ ^c		KARADŽIĆ, 1995
<i>S. collinitus</i> (Fr.) Kuntze	+				+	PERIĆ i PERIĆ, 2006b; LAZAREVIĆ 2010
<i>S. collinitus</i> var. <i>velatipes</i> Contu, Lavorato & Simonini	+					PERIĆ i PERIĆ, 2006b
<i>S. granulatus</i> (L.) Roussel	+	+ ^c	+ ^c		+	KARADŽIĆ, 1995; PERIĆ & PERIĆ 2006b; LAZAREVIĆ, 2010
<i>S. grevillei</i> (Klotzsch) Singer				+ ^c		KARADŽIĆ, 1995
<i>S. luteus</i> (L.) Roussel			+ ^c	+ ^c		KARADŽIĆ, 1995, PERIĆ i PERIĆ, 2006b
<i>S. mediterraneensis</i> (Jacquet. & J. Blum) Redeuilh	+					PERIĆ i PERIĆ, 2006b; LAZAREVIĆ, 2010
CANTHARELLALES						
<i>Cantharellus</i> Fr. (<i>Cantharellaceae</i>)						
<i>C. amethysteus</i> (Quél.) Sacc.				+		PERIĆ & PERIĆ, 1997a
<i>C. cibarius</i> Fr.		+	+	+		BUBÁK, 1903; TORTIĆ, 1974; KARADŽIĆ, 1995; PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 1999a, 1999b, 2000, 2005, kao <i>C. cibarius</i> var. <i>bicolor</i> Maire
<i>C. cinereus</i> (Pers.) Fr.		+ ^c				PERIĆ i PERIĆ, 1999b, 2004
<i>C. cornucopioides</i> (L.) Pers.		+				PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 2000, 2005

TAKSON	medit. š i kult borova	termofil. submed. š. lišč	mezofil š mezij, bukve	borealne četinarske šume	relikt š balk.h borova	LITERATURNI IZVOR
<i>C. friesii</i> Quél.			+			PERIĆ i PERIĆ, 1997a
<i>C. lilacinopruinatus</i> Hermitte, Eysart. & Poumarat		+				PERIĆ, 2005
<i>C. luteocomus</i> H.E. Bigelow	+	+				PERIĆ i PERIĆ, 2004 kao <i>C. lutescens</i> var <i>luteocomus</i> (Big.) Bon & Pac., 2005
<i>C. lutescens</i> Fr.	+	+	+ ^f			PERIĆ i PERIĆ, 1997, 1999b, 2000, 2004; KASOM, 2004 kao <i>C. tubaeformis</i> var. <i>lutescens</i> Fr.
<i>Craterellus</i> Pers. (<i>Cantharellaceae</i>)						
<i>C. cornucopioides</i> (L.) Pers.		+	+ ^f			PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 1999b, 2004
<i>Clavulina</i> J. Schröt. (<i>Clavulinaceae</i>)						
<i>C. coralloides</i> (L.) J. Schröt.		+				PERIĆ i PERIĆ, 1999b, 2000 kao <i>C. cristata</i>
<i>C. rugosa</i> (Bull.) J. Schröt.					+	PERIĆ i PERIĆ, 1999b, 2000
GOMPHALES						
<i>Gomphus</i> Pers. (<i>Gomphaceae</i>)						
<i>G. clavatus</i> (Pers.) Gray				+	+	KARADŽIĆ, 1995; PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 2004
<i>Ramaria</i> Fr. ex Bonord. (<i>Gomphaceae</i>)						
<i>R. aurea</i> (Schaef.) Quél.		+		+		BUBÁK, 1915; KARADŽIĆ, 1995; PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 1999b
<i>R. fennica</i> (P. Karst.) Ricken		+	+			PERIĆ i PERIĆ, 1999b
<i>R. flaccida</i> (Fr.) Bourdot	+					PERIĆ i PERIĆ, 1997a
<i>R. flava</i> (Schaeff.) Quél.			+	+		KARADŽIĆ, 1995; PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 1999a, 1999b
<i>R. fennica</i> var. <i>griseolilacina</i> Schild			+			PERIĆ i PERIĆ, 2005 kao <i>R. fumigata</i>
<i>R. formosa</i> (Pers.) Quél.		+				PERIĆ & i PERIĆ, 1999b, 2004
<i>R. pallida</i> (Schaeff.) Ricken			+	+		KARADŽIĆ, 1995
<i>R. sanguinea</i> (Pers.) Quél.		+				PERIĆ i PERIĆ, 2005
<i>R. stricta</i> (Pers.) Quél.	+					PERIĆ i PERIĆ, 2005

TAKSON	medit. š i kult borova	termofil. submed. š. lišč	mezofil š mezij, bukve	borealne četinarske šume	relikt š balk.h borova	LITERATURNI IZVOR
RUSSULALES						
<i>Lactarius</i> Pers. (<i>Russulaceae</i>)						
<i>L. acris</i> (Bolton) Gray			+			PERIĆ & PERIĆ, 1997a, 2004; KASOM, 2004
<i>L. aurantiacus</i> (Pers.) Gray				+		KARADŽIĆ, 1995 kao <i>L. mitissimus</i> Fr.
<i>L. azonites</i> (Bull.) Fr.			+			PERIĆ i PERIĆ, 1997a kao <i>L. fuliginosus</i> Fr.
<i>L. blennius</i> (Fr.) Fr.			+			PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 2003
<i>L. bresadolanus</i> Singer				+		KARADŽIĆ, 1995
<i>L. circellatus</i> Fr.		+				PERIĆ i PERIĆ, 1997a
<i>L. chrysorheus</i> Fr.	+	+				PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 2000
<i>L. controversus</i> (Pers.) Pers.			+ ^B			KARADŽIĆ, 1995
<i>L. deliciosus</i> (L.) Gray	+		+ ^c	+	+	KARADŽIĆ, 1995; PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 1999a, 1999b, 2000
<i>L. deterrimus</i> Gröger				+		KARADŽIĆ, 1995, PERIĆ i PERIĆ, 1997a
<i>L. fuliginosus</i> (Fr.) Fr.			+			PERIĆ i PERIĆ, 1997a kao <i>L. azonites</i> (Bull.) Fr., 2004
<i>L. fluens</i> Boud.	+		+ ^c			PERIĆ i PERIĆ, 2000
<i>L. mairei</i> Malençon		+				PERIĆ i PERIĆ, 2000, 2004.
<i>L. pallidus</i> Pers.			+			PERIĆ i PERIĆ, 1997a
<i>L. picinus</i> Fr.				+		PERIĆ i PERIĆ, 1997a
<i>L. piperatus</i> (L.) Pers.		+	+			PERIĆ & PERIĆ, 1999b, 2000, 2005
<i>L. pubescens</i> (Fr.) Fr.			+			KARADŽIĆ, 1995
<i>L. rufus</i> (Scop.) Fr.				+		KARADŽIĆ, 1995
<i>L. salmonicolor</i> Heim & Leclair			+	+		KARADŽIĆ, 1995; PERIĆ i PERIĆ, 1997a
<i>L. sanguifluus</i> (Paulet) Fr.	+			+	+	PERIĆ i PERIĆ, 1999a, 1999b, 2000; LAZAREVIĆ, 2009
<i>L. scrobiculatus</i> (Scop.) Fr.				+		KARADŽIĆ, 1995; PERIĆ i PERIĆ, 1997a
<i>L. semisanguifluus</i> Heim & Leclair	+		+	+	+	KARADŽIĆ, 1995; PERIĆ & PERIĆ, 1997a, 2005; LAZAREVIĆ, 2010

TAKSON	medit. š i kult borova	termofil. submed. š. lišč	mezofil š mezij, bukve	borealne četinarske šume	relikt š balk.h borova	LITERATURNI IZVOR
<i>L. spinosulus</i> Quél. & Le Bret.			+			TOTRIĆ, 1974 kao <i>L. lilacinus</i> Lasch
<i>L. torminosus</i> (Schaeff.) Gray			+ ^b			KARADŽIĆ, 1995
<i>L. turpis</i> (Wenim.) Fr.						KARADŽIĆ, 1995; PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 199b kao <i>L. necator</i> (Bull.) P. Karst.
<i>L. uvidus</i> (Fr.) Fr.		+	+			PERIĆ i PERIĆ, 1997a
<i>L. vinosus</i> Quél.	+					PERIĆ i PERIĆ, 1997a
<i>L. vellereus</i> (Fr.) Fr.		+ ^c		+		KARADŽIĆ, 1995, PERIĆ i PERIĆ, 1999 b
<i>L. volemus</i> (Fr.) Fr.		+	+	+		KARADŽIĆ, 1995; PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 1999b, 2000, 2004; LAZAREVIĆ, 2010
<i>L. zonarius</i> var. <i>scrobipes</i> Kühn. & Romagn.		+	+			PERIĆ i PERIĆ, 1997a
<i>Russula</i> Pers. (<i>Russulaceae</i>)						
<i>R. alutacea</i> (Fr.) Fr.			+			TORTIĆ, 1988
<i>R. anthracina</i> Romagn.	+	+				PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 1999b, 2000
<i>R. aurea</i> Pers.		+	+			PERIĆ i PERIĆ, 1999a, 1999b, 2004, kao <i>R. aurata</i> (With.) Fr., 2005; KASOM, 2004
<i>R. azurea</i> Bres.				+		KARADŽIĆ, 1995
<i>R. carminipes</i> J. Blum		+				PERIĆ i PERIĆ, 1999b
<i>R. cyanoxantha</i> (Schaeff.) Fr.		+	+	+		KARADŽIĆ, 1995; PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 1999a, 1999b, 2000, 2002b
<i>R. delica</i> Fr.	+		+	+		TORTIĆ, 1988; KARADŽIĆ, 1995; PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 1999b
<i>R. emetica</i> (Schaeff.) Pers.		+	+			PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 1999b, 2005
<i>R. foetens</i> (Pers.) Pers.			+	+		TORTIĆ, 1974; KARADŽIĆ, 1995
<i>R. ionochlora</i> Romagn.			+			KARADŽIĆ, 1995 kao <i>R. grisea</i> (Pers.) Fr.
<i>R. grata</i> Britzelm.			+			PERIĆ i PERIĆ, 1997a kao <i>R. laurocerasi</i> Melz.
<i>R. laurocerasi</i> var. <i>fragrans</i> (Romagn.) Kuyér & Vuure			+			PERIĆ i PERIĆ, 1997a

TAKSON	medit. š i kult borova	termofil. submed. š. lišč	mezofil š mezij, bukve	borealne četinarske šume	relikt š balk.h borova	LITERATURNI IZVOR
<i>R. maculata</i> Quél. & Roze		+	+			PERIĆ & PERIĆ, 1999b
<i>R. nigricans</i> Fr.			+	+		KARADŽIĆ, 1995
<i>R. olivacea</i> (Schaeff.) Fr.			+			KARADŽIĆ, 1995; PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 2004; KASOM, 2004
<i>R. paludosa</i> Britzelm.			+			TORTIĆ 1988
<i>R. queletii</i> Fr.	+					PERIĆ i PERIĆ, 1997a
<i>R. romellii</i> Maire		+		+		PERIĆ i PERIĆ, 1997a; KARADŽIĆ, 1995, PERIĆ i PERIĆ, 1997a kao <i>R. integra</i> (L.) Fr.
<i>R. rosea</i> Pers.		+	+	+		KARADŽIĆ, 1995; PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 2005 kao <i>R. lepida</i> Fr.
<i>R. sanguinaria</i> (Schumach.) Rauschert		+	+	+ ^c	+	TORTIĆ, 1988 kao <i>R. rosacea</i> (Pers.) Fr.; PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 1999a kao <i>R. sanguinea</i> (Bull.) Fr., 2000, 2005
<i>R. sardonias</i> Fr.	+		+ ^b			PERIĆ i PERIĆ, 2000 kao <i>R. drimeia</i> Cooke
<i>R. solaris</i> Ferd. & Winge			+			LAZAREVIĆ, 2010
<i>R. vesca</i> Fr.			+			PERIĆ i PERIĆ, 1997a
<i>R. violeipes</i> Quél.			+	+		PERIĆ i PERIĆ, 1997a kao <i>R. amoena</i> Quél.
<i>R. virescens</i> (Schaeff.) Fr.	+		+	+		JAAP, 1916, KARADŽIĆ, 1995, PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 1999b, 2000, 2005
<i>R. risigallina</i> (Batsch) Sacc.			+			PERIĆ & PERIĆ, 1997a kao <i>R. vitellina</i> (Pers.) Fr.
<i>R. xerampelina</i> (Schaeff.) Fr.				+		KARADŽIĆ, 1995
THELEPHORALES						
<i>Hydnellum</i> P. Karst. (<i>Bankeraceae</i>)						
<i>H. aurantiacum</i> (Batsch.) P. Karst.				+		KARADŽIĆ, 1995, PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 2004
<i>H. caeruleum</i> (Hornem) P. Karst.				+		PERIĆ i PERIĆ, 1998b, 2004
<i>H. ferrugineum</i> (Fr.) P. Karst.				+		KARADŽIĆ, 1995; PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 1998c, 2004
<i>H. goegenium</i> (Fr.) Banker				+		PERIĆ i PERIĆ, 1998c, 2004 kao <i>Hydnum goegenium</i> Fr.

TAKSON	medit. š i kult borova	termofil. submed. š. lišč	mezofil š mezij, bukve	borealne četinarske šume	relikt š balk.h borova	LITERATURNI IZVOR
Sarcodon Quél ex P. Karst. (<i>Bankeraceae</i>)						
<i>S. imbricatus</i> (L.) P. Karst.				+		KARADŽIĆ, 1995, PERIĆ & PERIĆ, 1997a, 2004
<i>S. joeides</i> (Pass.) Bataille			+			PERIĆ & PERIĆ, 2004
<i>S. leucopus</i> (Pers.) Geest & Nannf.			+	+		KARADŽIĆ 1995, PERIĆ i PERIĆ, 1997a, 2004
<i>S. scabrosus</i> (Fr.) P. Karst.	+					PERIĆ i PERIĆ, 2004, PERIĆ <i>et al.</i> , 2000 kao <i>Hydnum scabrosum</i> (Fr.) Karsten
Phellodon P. Karst. (<i>Bankeraceae</i>)						
<i>P. niger</i> (Fr.) P. Karst.	+					PERIĆ i PERIĆ, 2004, PERIĆ & PERIĆ, 2002b kao <i>Calodon niger</i> (Fr.) Quél.
Thelephora Ehrh. ex Willd. (<i>Thelephoraceae</i>)						
<i>T. atra</i> Weinm.					+	PERIĆ <i>et al.</i> , 2000
<i>T. penicillata</i> (Pers.) Fr.					+	PERIĆ <i>et al.</i> 2000
<i>T. terrestris</i> Ehrh.			+		+	PERIĆ i PERIĆ, 1999 b, PERIĆ <i>et al.</i> , 2000

Napomena: Nalazi koji su vezani jedino za specifičnog domaćina (*Pinus peuce*, *Castanea sativa*) ili azonalnu i pionirsku vegetaciju (*Pinus nigra*, *Populus tremula*, *Betula alba*): **a**-*Alnus incana*, **b** -*Juniperus nana*, **c**- *Castanea sativa*, **d**- *Pinus peuce*, **e**- *Pinus nigra*, **f**- *Quercus petraea*, **g**- *Populus tremula*, *Betula alba*.

Biografija

Jelena Lazarević rođena je u Aranđelovcu (R. Srbija), 25. 10. 1971.

Diplomirala je na Šumarskom fakultetu Univerziteta u Beogradu 1996. godine na Odseku za pejzažnu arhitekturu (8,92). Magistarsku tezu pod naslovom »**Bioekologija fitopatogene gljive *Herpotrichia juniperi* (Duby) Petrak**« odbranila je 2001. Godine na Šumarskom fakultetu Univerziteta u Beogradu na katedri za zaštitu šuma.

Bila je angažovana kao stipendista Ministarstva za nauku i tehnologiju na projektu »Unapređenje i optimalno korišćenje šumskih potencijala i funkcija šuma i šumskih područja Srbije« na Šumarskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na katedri za zaštitu šuma (1999-2001). Radila je kao stručni saradnik u Saveznom ministarstvu privrede i unutrašnje trgovine u sektoru za vinogradarstvo, voćarstvo, šumarstvo i preradu (2003-2003), kao i u Ministarstvu poljoprivrede, vodoprivrede i šumarstva R Srbije u sektoru za analitiku, ekonomiku i agrarnu politiku (2004).

Od oktobra 2004. godine radi na Biotehničkom fakultetu Univerziteta Crne Gore u Podgorici, kao viši istraživač za šumarstvo.

Autor je i koautor oko 40 naučnih i stručnih radova.

Jelena Lazarević je udata i majka je Strahinje (7) i Rastka (5) Laković.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а **Јелена Лазаревић**

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Ектомикориза четинарских врста дрвећа у Црној Гори са посебним освртом на микоризу мунике –*Pinus heldreichii* Christ.

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 4. марта 2013.

Јелена Лазаревић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: **Јелена Лазаревић**

Број уписа _____

Студијски програм _____

Наслов рада: **Ектомикориза четинарских врста дрвећа у Црној Гори са посебним освртом на микоризу мунике –*Pinus heldreichii* Christ.**

Ментор : Проф. Др Ненад Кеча, ванредни професор Шумарског факултета

Потписани: **Јелена Лазаревић**

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 4. марта 2013.

Јелена Лазаревић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Ектомикориза четинарских врста дрвећа у Црној Гори са посебним освртом на микоризу мунике –*Pinus heldreichii* Christ.

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 4. марта 2013.

Јелена Лазаревић