

**NASELJENOST KORENA TOPOLA EKTOMIKORIZNIM,
ARBUSKULARNO MIKORIZNIM I TAMNIM SEPTIRANIM
ENDOFITSKIM GLJIVAMA**

Marina Katanić¹, Branislav Kovačević¹, Natalia Glowska², Elena Paoletti³,
Sreten Vasić¹, Milan Matavulj⁴, Hojka Kraigher⁵

Izvod: Cilj rada je bio da se odredi i uporedi stepen kolonizacije korena topola ektomikoriznim (ECM), arbuskularno mikoriznim (AM) i tamnim septiranim endofitskim gljivama (END) i ispita uticaj stanišnih uslova na ove parametre. Za istraživanje su odabrana četiri lokaliteta: na prvom lokalitetu „Rasadnik” je gajen klon bele topole umnožen *in vitro*, drugi lokalitet „Koviljski rit” je predstavljao prirodno stanište autohtone bele topole, treći lokalitet „Timok” je bio zagađen pirinom jalovinom, sadržao teške metale i imao nizak pH, dok je četvrti lokalitet „Antella” predstavljao ogledno polje u kome je ispitan uticaj povišene koncentracije ozona na klon osetljiv na ozon. Na „Timoku” uopšte nije zabeleženo prisustvo AM gljiva, dok je njihova najveća naseljenost bila u „Antelli” i iznosila 24,76%. Vrednost naseljenosti AM gljiva dužinom korena topola i odnos AM/ECM su se značajno razlikovali između ova dva lokaliteta. Sa druge strane, naseljenost korena topola ECM gljivama je na analiziranim lokalitetima bila veoma ujednačena i kretala se od 16,7% u „Koviljskom ritu” do 21,84% u „Antelli”. Tamne septirane endofitske gljive su naseljavale korene topola na analiziranim staništima u manjoj meri i kolonizacija ovim gljivama se kretala od 1,38% u „Rasadniku” do 6,09 % u „Koviljskom ritu”. Prema Spearman-ovom koeficijentu međuzavisnost između kolonizacije korena AM, ECM i END gljivama ni na jednom od analiziranih lokaliteta nije bila statistički značajna. Kolonizacija korena topola mikoriznim i endofitskim gljivama se nije pokazala zadovoljavajućim parametrom u svrhe mikobioindikacije te bi u daljim istraživanjima trebalo analizirati i ukupnu biomasu i dužinu analiziranih korena.

¹ Marina Katanić istraživač saradnik, Branislav Kovačević viši naučni saradnik, dipl. inž. Sreten Vasić, Univerzitet u Novom Sadu, Institut za nizijsko šumarstvo i životnu sredinu, Antona Čehova 13, 21000 Novi Sad, Srbija

² Natalia Glowska istraživač saradnik Instytut Biologii Środowiska, Univerzitet Kazimierz Wielki, Chodkiewicza 30, Bydgoszcz, Poljska

³ Elena Paoletti viši naučni saradnik, Istituto per la Protezione delle Piante, Italijanski nacionalni odbor za istraživanje, Via Madonna del Piano 10, I-50019 Sesto Fiorentino, Florence, Italy

⁴ Milan Matavulj redovni profesor, Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad, Srbija

⁵ Hojka Kraigher, naučni savetnik Gozdarski inštitut Slovenije, Večna pot 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

Ključne reči: ektomikoriza, arbuskularna mikoriza, tamne septirane endofitske gljive, topole, kolonizacija

COLONIZATION OF POPLAR ROOTS WITH ECTOMYCORRHIZAL, ARBUSCULAR MYCORRHIZAL AND DARK SEPTATED ENDOPHYTIC FUNGI

Abstract: *The aim of this study was to determine and compare the level of colonization of poplar roots with ectomycorrhizal (ECM), arbuscular mycorrhizal (AM) and dark septated endophytic fungi (END) and to study the effects of site conditions on these parameters. Four sites with poplars were selected: at the first location „Rasadnik” a white poplar clone multiplied in vitro was grown, the second site „Koviljski rit” was a natural habitat of native white poplar, the soil at the third site „Timok” was contaminated with pyrite tailings, contained heavy metals and had a low pH, while the fourth site „Antella” was a post-agricultural field in which ambient ozone impacts on an ozone-sensitive clone were investigated. The presence of AM fungi was not observed at the „Timok site while a high number was recorded in „Antella” where it amounted 24.76%. The value of poplar root length colonization with AM fungi and AM / ECM ratio significantly differed between the two sites. On the other hand, poplar root length colonization with ECM fungi was even, ranging from 16.7% in „Koviljski rit” to 21.84% in „Antella”. Dark septated endophytic fungi inhabited the poplar roots on analyzed habitats to a lesser extent and colonization of these species ranged from 1.38% in „Rasadnik” to 6.09% in the „Koviljski rit”. No significant correlation between root colonization with AM, END and ECM fungi was found at any of the analyzed localities. Since colonization of roots with mycorrhizal and endophytic fungi was not a reliable parameter for mycobioremediation, the total biomass and root length should be determined in further research as well .*

Key words: *ectomycorrhiza, arbuscular mycorrhiza, dark septated endophytic fungi, poplars, colonization*

UVOD

Topole su široko rasprostranjene brzorasteće drvenaste vrste sa visokim biotehnološkim potencijalom (Klopfenstein et al., 1997). Koriste se u agrošumarskim sistemima (Eichhorn et al., 2006), u zasadima kratke ophodnje za dobijanje biomase (Klašnja et al., 2006) i imaju značajnu ulogu u fitoremedijaciji (Newman et al., 1997). Topole obrazuju funkcionalnu mikoriznu asocijaciju sa ektomikoriznim (ECM) i arbuskularno mikoriznim (AM) gljivama u isto vreme (Molina et al., 1992), što olakšava rast i zasnivanje zasada topola u ekstremnim uslovima i čini ih pogodnim za svrhe pošumljavanja i remedijacije (Khan et al., 2006). Razlike u preferenciji staništa, koje se javljaju kod AM i ECM gljiva, mogu da doprinesu širokoj ekološkoj valenci i širokoj geografskoj distribuciji biljnih vrsta sa dvojnomo kolonizacijom (Neville et al., 2002).

Sa uviđanjem ozbiljnosti negativnih posledica povećanja koncentracije CO₂ u atmosferi, dobijaju na značaju istraživanja primene topola kao potencijalnih potrošača ugljenika zahvaljujući brzom formiranju biomase. Vršeći ogled sa

topolama, Godbold et al., (2006) su ustanovili da bi promet vankorenskog micelijuma mikorize mogao da bude osnovni mehanizam ulaska ugljenika u organsku materiju zemljišta zahvaljujući slabo razgradivim jedinjenjima hitinu i glomalinu koje sadrže mikorizne gljive.

Kod velikog broja vrsta i hibrida topola opažen je varijabilan odnos između ECM i AM u dvojnjoj mikoriznoj kolonizaciji (Vozzo i Hacskały, 1974; Neville et al., 2002; Khasa et al., 2002; Gehring et al., 2006). Utvrđeno je da različiti faktori kao što su starost biljke (Paul i Clark, 1996), potencijal inokuluma gljiva (van der Heijden i Vosatka, 1999), vlaga u zemljištu (Lodge, 1989; Gehring et al. 2006; Karlinski et al., 2010) i dubrenje azotom (Kosola et al., 2004) mogu da utiču na karakter ECM/AM kolonizacije. Uticaj dubine zemljišta na stepen ECM/AM kolonizacije nije u potpunosti rasvetljen. Neville et al. (2002) su kod *Populus tremuloides* uočili negativnu korelaciju između naseljenosti ECM i AM gljivama i sugerisali da one preferiraju različite slojeve zemljišta. Međutim, Saravesi et al. (2011) su opazili prisustvo AM spora u ECM plaštu i zaključili da oba tipa mikorize mogu da koegzistiraju u istom segmentu korena. Tagu et al. (2001, 2005) su uočili da je obrazovanje ECM kod topola pod genetičkom kontrolom, dok su Takács et al. (2005) utvrdili da kolonizacija AM gljiva takođe zavisi od genotipa topole. Tamne septirane endofitske (END) gljive su imale značajan efekat na ECM/AM kolonizaciju, dok se uticaj vlage na ovaj odnos pokazao značajnijim i od zagađenja (Karlinski et al., 2010), kao i od genetike biljaka (Gehring et al. 2006). Fertilizacija je takođe imala efekta na ECM/AM kolonizaciju tako što je dodatak azota uslovio povećanje naseljenosti ECM i smanjenje kolonizacije AM gljivama (Kosola et al., 2004).

Cilj rada je bio da se odredi i uporedi stepen kolonizacije korena topola ektomikoriznim, arbuskularno mikoriznim i tamnim septiranim endofitskim gljivama na različitim lokalitetima i ispita uticaj stanišnih uslova na ove parametre.

MATERIJAL I METOD

Na lokalitetu „Rasadnik” istraživanja su urađena u zasadu bele topole (*Populus alba* L.) starom dvadesetak godina, klonskog porekla nastalom u kulturi tkiva. Lokalitet se nalazi na Oglednom dobru Instituta za nizijsko šumarstvo i životnu sredinu, pored sela Kać u blizini Novog Sada (koordinate lokaliteta su: N 45° 17', E 19° 53'). Nadmorska visina lokaliteta je 74 m, a klima je umereno kontinentalna. Prosečna godišnja količina padavina je 647,3 mm, dok je prosečna godišnja temperatura vazduha 11,4°C (prema Republičkom hidrometeorološkom zavodu Srbije za Rimske Šančeve).

Lokalitet „Koviljski rit” je prirodno stanište autohtone bele topole (*Populus alba* L.) i nalazi se u blizini sela Kovilj (koordinate lokaliteta su: N 45° 12', E 19° 58'). Nadmorska visina lokaliteta je 75m, dok su klima i podaci o padavinama i temperaturi slični kao na prethodnom lokalitetu.

Lokalitet „Timok” se nalazi u Istočnoj Srbiji na obali reke Timok (koordinate lokaliteta su: N 44° 00', E 22° 21'). Nadmorska visina je 181m, klima umereno kontinentalna sa prosečnom godišnjom količinom padavinama od 581,4 mm. Prosečna godišnja temperatura je 11°C (podaci za Zaječar prema Republičkom hidrometeorološkom zavodu Srbije). Na staništu koje je zagađeno piritnom jalovinom i ima nizak pH zajedno rastu *P. alba*, *P. nigra*, *P. tremula* i njihovi hibridi. Koncentracije bakra u zemljištu je skoro 9 puta veća (896,9ppm), cinka 4 puta veća (413, 9ppm) od maksimalne dozvoljene koncentracije, dok je sadržaj gvožđa blago povišen.

Na lokalitetu „Antella” je ispitan uticaj povišene koncentracije ozona na petogodišnje biljke Oxford klona (*Populus maximoviczii* Henry × *berolinensis* Dippel) osetljive na ovaj polutant (Katanić et al., 2013). Lokalitet je smešten na Ogljednom dobrou Institutu za zaštitu biljaka (Istituto per la Protezione delle Piante) Italijanskog nacionalnog odbora za istraživanja u blizini mesta Antella, u centralnoj Italiji (koordinate lokaliteta su: N 43°44', E 11°16'). Nadmorska visina lokaliteta je 50 m, dok je klima mediteranska sa prosečnom godišnjom temperaturom od 14,7 °C i ukupnom godišnjom količinom padavina od 1233 mm u 2010. godini (Hoshika et al., 2012). Koncentracija ozona na lokalitetu je kontinuirano merena tokom sezone rasta i maksimalna koncentracija O₃ po satu je dostizala 118 ppb (Hoshika et al., 2013), što predstavlja 2,5 puta veću koncentraciju u odnosu na njegov kritični nivo propisan za šume (WHO, 2000).

Na svakom lokalitetu je odabrano pet stabala topola, pored kojih su uzorci zemljišta uzimani sondom zapremine 274 ml i dužine 18 cm (Kraigher, 1999) na udaljenosti od oko 1 m od debla. Za analizu kolonizacije korena mikoriznim i endofitskim gljivama 5-6 uzoraka zemljišta, uzetih ispod iste biljke je prvo spojeno u jedan uzorak, a zatim su koreni topole izdvojeni od zemljišta, kamenja i zeljastih korena na osnovu vizuelne procene. Sitni koreni (prečnika do 2 mm) su skalpelom isečeni na fragmente od oko 1cm, a zatim su oprani. Prema protokolu koji su dali Kormanik i McGraw (1982), a modifikovali Karlinski et al. (2010), koreni su prvo obezbojeni kuvanjem u 10% KOH na 90°C, a zatim su izbeljeni u alkalnom vodonik-peroksidu i ofarbani tripan plavom bojom (Tryphan blue) tako što su držani u ratvoru boje od 7 do 10 minuta. Obojeni koreni su do mikroskopiranja držani u laktoglicerolu, u kome su pravljani i mikroskopski preparati.

Kolonizacija korena ECM, AM i END je procenjena korišćenjem metoda intersekcije (McGonigle et al., 1990) pod mikroskopom na uvećanju 100x. Izbrojano je minimum 100 preseka po mikroskopskom preparatu. Na preseku je vršeno brojanje prisutnih ECM, AM i END gljiva, kao i hifa “drugih gljiva”, tj. gljiva koje nisu mogle biti svrstane ni u jednu od prethodnih kategorija. Presek sa korenom na kom nije bilo nikakvih struktura je računat kao “prazan koren”. U slučaju AM gljiva brojane su njihove pojedinačne strukture, tj. arbuskule, vezikule, namotaji i hife, a zatim je računata njihova suma. Rezultati su prikazani kao procenat kolonizacije ECM, AM i END gljiva dužinom korena (percentage of root length colonized % RLC).

Analize kolonizacije korena topola mikoriznim i endofitskim gljivama sa lokaliteta „Rasadnik” i „Koviljski rit” su urađene na Fakultetu prirodnih nauka Univerziteta Kazimierz Wielki u Bydgoszczu u Poljskoj; sa lokaliteta „Timok” u Institutu za nizijsko šumarstvo i životnu sredinu Univerziteta u Novom Sadu, dok su uzorci iz „Antelle” analizirani na Šumarskom institutu Slovenije.

Neparametarski Kruskal–Wallis-ov test i Neparametarski test višestrukih intervala su korišćeni za analizu značajnosti razlika između analiziranih lokaliteta u kolonizaciji korena AM, ECM i END gljivama. Spearman-ov koeficijent korelacije R je korišćen za analizu odnosa između kolonizacije korena AM, ECM i END gljivama. Statističke analize su urađene u programu Statistica 10 (StatSoft Inc., 2012).

REZULTATI

Na lokalitetu „Timok” je zabeležen značajno manji broj vezikula, hifa i ukupnih AM struktura gljiva u odnosu na lokalitete „Antella” i „Rasadnik”. Takođe, vrednosti kolonizacije AM gljivama dužinom korena topola i odnos AM/ECM su se značajno razlikovale između lokaliteta „Timok” i „Antella”. Na „Timoku” uopšte nije zabeleženo prisustvo ovih gljiva, dok je njihova najveća naseljenost bila u „Antelli” i iznosila 24,76%. Sa druge strane, naseljenost korena topola ECM gljivama je na analiziranim lokalitetima bila veoma ujednačena i kretala se od 16,7% u „Koviljskom ritu” do 21,84% u „Antelli”. Tamne septirane endofitske gljive su naseljavale korene topola na analiziranim staništima u manjoj meri. Kolonizacija ovim gljivama se kretala od 1,38% u „Rasadniku” do 6,09 % u „Koviljskom ritu”. Zapaženo je i znatno prisustvo „drugih gljiva” koje nisu mogle biti svrstane ni u jednu od prethodno navedenih kategorija. Zastupljenost ovih gljiva je bila veoma približna na analiziranim lokalitetima izuzev „Timoka” gde su one bile prisutne u znatno manjoj meri. Odnos između AM/ECM gljiva se veoma razlikovao među analiziranim lokalitetima i njegove vrednosti su se kretale od 0 na „Timoku” do 1,61 u „Antelli” (**Tabela 1.**)

Na lokalitetu „Rasadnik” je opažena pozitivna korelacija između naseljenosti korena AM i ECM kao i ECM i END gljivama, dok između kolonizacije AM i END nije bilo korelacije. U „Koviljskom ritu” je korelacija između ECM i AM bila pozitivna, dok je negativna međuzavisnost nađena između END i ECM i END i AM gljiva. Na „Timoku” nije zabeleženo prisustvo AM tako da je ovde jedino zabeležena negativna korelacija između ECM i END gljiva. Na lokalitetu „Antella” je korelacija između kolonizacije ECM i AM kao i ECM i END gljivama bila negativna, a između AM i END gljiva pozitivna. Međutim, međuzavisnost između kolonizacije korena AM, ECM i END gljivama ni na jednom od analiziranih lokaliteta nije bila statistički značajna prema Spearman-ovom koeficijentu (**Tabela 2.**)

Tabela 1. Prosečne vrednosti (\pm st. greška) kolonizacije korena topola ektomikoriznim, arbuskularno mikoriznim i tamnim septiranim endofitskim gljivama na analiziranim lokalitetima „Rasadnik”, „Koviljski rit”, „Timok” i „Antella“

Table 1. Average values (\pm st. error) of poplar root colonization with ectomycorrhizal, arbuscular mycorrhizal and dark septated edophytic fungi at four localities „Rasadnik”, „Koviljski rit”, „Timok” and „Antella“

Broj gljivnih struktura <i>Number of fungal structures</i>	Neparametarski test višestrukih intervala* <i>Nonparametric multiple comparison range test</i>				Kruskal Wallis ANOVA
	Rasadnik	Koviljski rit	Timok	Antella	p-vrednost <i>p-value</i>
Vežikule <i>Vesicles</i>	6,18 \pm 1,58 a	2,2 \pm 0,63 ab	0 b	20,58 \pm 13,25 a	0,005
Arbuskule <i>Arbuscules</i>	0 a	0,32 \pm 0,22 a	0 a	0,50 \pm 0,50 a	0,101
Hife <i>Hyphae</i>	27,02 \pm 8,61 a	13,84 \pm 3,70 ab	0 b	57,75 \pm 24,08 a	0,006
Namotaji <i>Coils</i>	0 a	2,36 \pm 2,36 a	0 a	0,29 \pm 0,17 a	0,194
AM	33,2 \pm 9,98 a	18,72 \pm 4,13 ab	0 b	79,13 \pm 36,53 a	0,006
ECM	46,25 \pm 12,75 a	33,64 \pm 3,57 a	32,72 \pm 6,22 a	59,71 \pm 13,49 a	0,259
END	3,65 \pm 1,88 a	13,28 \pm 5 a	3,64 \pm 0,84 a	5,46 \pm 1,09 a	0,193
Druge gljive <i>Other fungi</i>	79,45 \pm 17,64 a	68,24 \pm 21,43 a	23,56 \pm 13,07 a	57,50 \pm 18,95 a	0,082
Totalne strukture <i>Total structures</i>	162,55 \pm 22,63 ab	133,88 \pm 24,54 ab	59,92 \pm 15,20 b	201,79 \pm 33,13 a	0,021
Prazni koreni <i>Empty roots</i>	99,79 \pm 7,15 a	80,24 \pm 15,60 a	114,12 \pm 5,95 a	88,88 \pm 18,45 a	0,316
Suma preseka <i>Summ of crosses</i>	262,34 \pm 18,85 a	214,12 \pm 13,15 ab	174,12 \pm 13,69 b	290,67 \pm 29,33 a	0,008
% RLC AM	12,06 \pm 3,32 ab	8,80 \pm 2,04 ab	0 b	24,76 \pm 9,31 a	0,007
% RLC ECM	17,90 \pm 4,3 a	16,70 \pm 2,34 a	18,19 \pm 3,47 a	21,84 \pm 6,17 a	0,986
% RLC END	1,38 \pm 0,71 a	6,09 \pm 1,94 a	2,23 \pm 0,50 a	1,84 \pm 0,25 a	0,109
% drugih gljiva <i>% of other fungi</i>	28,79 \pm 5,79 a	28,95 \pm 7,21 a	11,80 \pm 5,65 a	20,01 \pm 6,68 a	0,197
AM/ECM	1,16 \pm 0,57 ab	0,72 \pm 0,20 ab	0 b	1,61 \pm 0,75 a	0,011

^{*)} Vrednosti koje pripadaju istoj homolognoj grupi su označene istim slovom

^{*)} Values belonging to the same homolog group are marked with the same letter

gljiva u korenima vrste *Populus tremula*. Stoga bi se odsustvo AM gljiva u korenima topola sa lokaliteta "Timok", moglo objasniti negativnim efektom visokih koncentracija bakra i cinka u zemljištu na ovu grupu gljiva. U mladoj plantaži transgenih topola AM gljive su imale veoma malu brojnost u zemljištu, dok u korenima topola uopšte nisu opažene (Danielsen et al., 2012). Odsustvo AM gljiva autori objašnjavaju prethodnom dugogodišnjom kultivacijom topola na eksperimentalnom polju, koja je uslovala intenzivnu kolonizaciju ECM gljivama čime je proliferacija AM gljiva mogla biti inhibirana. Veći stepen naseljenosti korena topola AM gljivama je zabeležen u radu Karlinski et al. (2010; 18–54%) i Khasa et al. (2002; 20–50%). Takođe, u jednogodišnjem zasadu topola koji je činilo 7 klonova topole, Takács et al. (2005) su zabeležili AM gljivnu kolonizaciju u rasponu od 0% do 63% na nezagađenom i od 46% do 60% na zagađenom tlu, ukazujući na varijabilan stepen kolonizacije AM gljivama i na različitu osetljivost analiziranih klonova za ovaj vid mikorize.

Naseljenost korena topola ECM gljivama je bila veoma ujednačena na analiziranim lokalitetima i kretala se od 16,7% u „Koviljskom ritu” do 21,84% u „Antelli”. Takođe, Karlinski et al. (2010) iznose da je ECM kolonizacija korena 12-15 godina starih topola bila u rasponu od 5,2–29,2%. Međutim, veći stepen prisustva ECM gljiva na korenima različitih vrsta i hibrida topola opazili su Khasa et al. (2002) na korenima 28 klonova topole (35–90%), a Neville et al. (2002) na *P. tremuloides* (86%), Kaldorf et al. (2002) kod genetički modifikovanih hibrida topole (64–73%), Gehring et al. (2006) kod *P. angustifolia* (66–94%), Krpata et al. (2008) kod *P. tremula* (95%) i Danielsen et al. (2012) na divljem i transgenim genotipovima topole *Populus x canescens* (87%).

Tamne septirane endofitske gljive su naseljavale korene topola na analiziranim lokalitetima u manjoj meri. Kolonizacija ovim gljivama se kretala od 1,4% u „Rasadniku” do 6,1% u „Koviljskom ritu”. Kolonizacija korena topola gljivnim endofitama se kod Karlinskog et al. (2010) kretala u rasponu od 4,2 do 9,3%, kod Danielsen et al. (2012) iznosila je oko 5%, dok je prema Beauchamp et al. (2005) kod *P. fremontii* vrednost ovog parametra bila nešto viša i kretala se od 7,4 do 23,4%.

Treba imati u vidu da su analizirane biljke topola bile različite starosti što je bilo od velikog uticaja na stepen kolonizacije AM gljivama. Naime, Paul i Clark (1996) tvrde da su mlade biljke jasike češće naseljene AM gljivama, a kako drveće stari njegove korene naseljavaju ECM gljive. Najveću vrednost kolonizacije korena AM gljivama su imale topole u „Antelli” koje su bile znatno mlade u odnosu na topole sa ostalih lokaliteta, čime se potvrđuje uticaj starosti na naseljenost ovim gljivama. Takođe, AM i ECM preferiraju različite zemljišne uslove kao što su vlaga, pH i odnos C/N. S obzirom na stanovište da AM gljive imaju širu ekološku valencu u slučaju zemljišne vlage u odnosu na ECM gljive (Lodge, 1989) potpuno odsustvo AM gljiva na lokalitetu „Timok” se ne može objasniti ovim faktorom. Poznato je da AM gljive naseljavaju staništa na kojima je viši pH, ima više dostupnog azota i niži C/N odnos (Read, 1991). Uslovi na „Timoku” bili su upravo obrnuti (umereno kiselo zemljište, mala koncentracija N i visok odnos C/N) što je verovatno

nepovoljno uticalo na AM gljivnu zajednicu i uslovalo njeno iščezavanje. Osim toga analizirane biljke pripadaju različitim genotipovima i vrstama topola što se odražava i na njihovu kolonizaciju (Tagu et al., 2001, 2005; Takács et al., 2005).

Prema Spearman-ovom koeficijentu korelacije na analiziranim lokalitetima nije bilo statistički značajne korelacije između kolonizacije korena AM, ECM i END gljivama. Opažena negativna korelacija između AM i ECM gljiva u „Antelli” je u skladu sa nalazima Karlinski et al. (2010), koji su na dva nezagađana lokaliteta takođe opazili značajnu negativnu korelaciju između AM i ECM kolonizacije korena topola. Kompeticiju između AM i ECM gljiva koje naseljavaju korene *P. tremuloides* su zabeležili i Neville et al. (2002), koji smatraju da ECM i AM gljive preferiraju različite dubine zemljišta tj, različite uslove koji tamo vladaju. Međutim, na lokalitetu zagađenom teškim metalima, Karlinski et al. (2010) su uočili pozitivnu korelaciju između naseljenosti AM i ECM. Takođe, Saravesi et al. (2011) su opazili prisustvo AM spora u ECM plaštu i zaključili da oba mikorizna partnera mogu da koegzistiraju u istom segmentu korena. Pozitivna korelacija između kolonizacije AM i END gljivama, zabeležena u „Antelli”, u saglasnosti je sa rezultatima Karlinski et al. (2010) koji su na lokalitetu zagađenom teškim metalima takođe uočili pozitivnu međuzavisnost između ove dve grupe gljiva.

Smith i Read (2008) navode da je kolonizacija korenovog sistema AM gljivama dinamičan proces u kome i koren i gljiva rastu i razvijaju se. Na meru u kojoj će koren biti kolonizovan (a time i na procenat kolonizacije) ne utiče samo intenzitet formiranja infektivnih jedinica i intenzitet njihovog rasta, već i intenzitet rasta korenovog sistema. Takođe, Cudlin et al. (2007) su korišćenjem meta-analize proučavali dejstvo različitih ekoloških faktora na kratke korene i ECM. Utvrdili su da su dužina kratkih korena i biomasa pogodniji parametri za otkrivanje promene u životnoj sredini od kolonizacija ECM.

Rezultati istraživanja su pokazali da analizirani parametri kolonizacije korena topola ektomikoriznim, arbuskularno mikoriznim i endofitskim gljivama nisu dovoljni da budu primenjeni u svrhu mikobioindikacije. Zbog toga bi pored kolonizacije korena mikoriznim i endofitskim gljivama u daljim istraživanjima trebalo ispitivati i ukupnu biomasu i dužinu analiziranih korena.

Zahvalnica

Veliku zahvalnost dugujemo prof. dr Barbari Kieliszewskoj-Rokicki za pruženu pomoć prilikom kvantifikacije mikoriznih gljiva.

Istraživanje je urađeno u okviru COST-STSM-FP0903, Istraživačkog programa P4-0107 Šumarskog instituta Slovenije i projekta III43007 Istraživanje klimatskih promena i njihovog uticaja na životnu sredinu praćenje uticaja, adaptacija i ublažavanje, Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

LITERATURA

- Beauchamp V. B., Stromberg J. C., Stutz J. C. (2006): Arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Populus-Salix* stands in a semiarid riparian ecosystem. *New Phytol* 170: 369-380
- Danielsen L., Thürmer A., Meinicke P., Buée M., Morin E., Martin F., Pilate G., Daniel R., Polle A., Reich M. (2012): Fungal soil communities in a young transgenic poplar plantation form a rich reservoir for fungal root communities *Ecol Evol.* 2(8): 1935-48.
- Eichhorn M. P., Paris P., Herzog F., Incoll L. D., Liagre F., Mantzanas K., Mayus M., Moreno G., Papanastasis V. D.J., Pilbeam D., Pisanelli A., Dupraz C. (2006): Silvoarable systems in Europe – past, present and future prospects. *Agroforestry systems* 67(1): 29-50
- Gehring C. A., Mueller C., Whitham T. G. (2006): Environmental and genetic effects on the formation of ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal associations in cottonwoods. *Oecol* 149: 158–164
- Godbold D. L., Hoosbeek M., Lukac M., Cotrufo M. F., Janssens I. A., Ceulemans R., Polle A., Velthorst E. J., Scarascia-Mugnozza G., De Angelis P., Miglietta F., Peressotti A. (2006): Mycorrhizal hyphal turnover as a dominant input to soil organic matter. *Plant & Soil* 281: 15-24.
- Hoshika Y., Omasa K., Paoletti E. (2012): Whole-tree water use efficiency is decreased by ambient ozone and not affected by O₃-induced stomatal sluggishness. *PLoS ONE* 7(6):e39270.
- Hoshika Y., Pecori F., Conese I., Bardelli T., Marchi E., Manning W.J., Badea O., Paoletti E.: 2013, Effects of a three-year exposure to ambient ozone on biomass allocation in poplar using ethylenediurea. *Environmental Pollution*, 180: 299-303.
- <http://www.hidmet.gov.rs/> Republički hidrometeorološki zavod Srbije
- Karlinski L., Rudawska M., Kieliszewska-Rokicka B., Leski T., (2010): Relationship between genotype and soil environment during colonization of poplar roots by mycorrhizal and endophytic fungi. *Mycorrhiza* 20: 315-324
- Katanić M., Paoletti E., Orlović S., Grebenc T., Kraigher H. (2013): Mycorrhizal status of an ozone-sensitive poplar clone treated with the antiozonant ethylene diurea. *European Journal of Forest Research* 10.1007/s10342-013-0751-9
- Khan A. G. (2006): Mycorrhizoremediation—An enhanced form of phytoremediation. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B* 7 (7): 503-514
- Khasa D. P., Chakarvarty P., Robertson B., Thomas R., Danick B. P. (2002): The mycorrhizal status of selected poplar clones introduced in Alberta. *Biomass Bioenerg* 22: 99–104
- Klašnja B., Orlović S., Galić Z., Pap P., Katanić M. (2006): Gusti zasadi topola kao sirovina za proizvodnju energije. *Glasnik Šumarskog fakulteta* 94: 159-170

- Klopfenstein N. B., Chun Y. W., Kim M. S., Ahuja M. R., Dillon M. C., Carman R. C., Eskew L. G. (1997): Micropropagation, genetic engineering, and molecular biology of *Populus*. Rocky Mountain Forest and Range Experiment Station, USDA Forest Service. 326 pp.
- Kormanik P. P., McGraw A. C. (1982): Quantification of vesicular – arbuscular mycorrhizae in plant roots. In: Schenck NC (ed) Methods and principles of mycorrhizal research. Amer Phytopathol Soc, St. Paul, 37–45
- Kosola K. R., Durall D. M., Robertson G. P., Dickmann D. I., Parry D., Russell C. A., Paul E. A. (2004): Resilience of mycorrhizal fungi on defoliated and fertilized hybrid poplars. Can J. Bot. 82: 671-680
- Kosola K. R., Durall D. M., Robertson G. P., Dickmann D. I., Parry D., Russell C. A., Paul E. A. (2004): Resilience of mycorrhizal fungi on defoliated and fertilized hybrid poplars. Can J. Bot. 82: 671-680
- Kraigher H. (1999): Diversity of types of ectomycorrhizae on Norway spruce in Slovenia. Phytol 39(3): 199-202
- Krpata D., Peintner U., Langer I., Walter J. F., Schweiger P. (2008): Ectomycorrhizal communities associated with *Populus tremula* growing on a heavy metal contaminated site. Mycological research 112 (9): 1069-1079
- Lodge D. J. (1989): The influence of soil moisture and flooding on formation of VA-endo- and ectomycorrhizae in *Populus* and *Salix*. Plant and Soil 117: 243-253.
- McGonigle T. P., Miller M. H., Evans D. G., Fairchild G. L., Swan J. A. (1990): A new method, which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytol 115: 495–501
- Molina R., Massicotte H., Trappe J. M., (1992): Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis: community-ecological consequences and practical applications. In: Allen M. F. (eds) Mycorrhizal functioning. Chapman and Hall, New York, 357–423
- Neville J., Tessier J. L., Morrison I., Scarratt J., Canning B., Klironomos J. N. (2002): Soil depth distribution of ecto- and arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Populus tremuloides* within a 3-year-old boreal forest clear-cut. Appl Soil Ecol 19: 209-216
- Neville J., Tessier J. L., Morrison I., Scarratt J., Canning B., Klironomos J. N. (2002): Soil depth distribution of ecto- and arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Populus tremuloides* within a 3-year-old boreal forest clear-cut. Appl Soil Ecol 19: 209-216
- Newman L. A., Strand S. E., Choe N., Duffy J., Ekuan G., Ruzsaj M., Shurleff B. B., Wilmoth J., Heilman P., Gordon M. P. (1997): Uptake and biotransformation of trichloroethylene by hybrid poplars. Environ. Sci. Technol. 31: 1062-1067
- Paul, E. A., Clark, F. E. (1996): Soil Microbiology and Biochemistry, 2nd Edition. Academic Press, San Diego
- Read D. J. (1991): Mycorrhizas in Ecosystems. Experientia 47: 376–391

- Saravesi K., Markkola A., Rautio P., Tuomi J. (2011): Simulated mammal browsing and host gender effects on dual mycorrhizal *Salix repens*. *Botany*, 89(1): 35-42
- Smith S. E., Read D. J. (2008): *Mycorrhizal symbiosis*. Third edition, London, Elsevier-Academic Press: 787p
- Tagu D., Bastien C., Faivre-Rampant P., Garbaye J., Vion P., Villar M., Martin F. (2005): Genetic analysis of phenotypic variation for ectomycorrhiza formation an interspecific F1 poplar full-sib family. *Mycorrhiza* 15: 87–91
- Tagu D., Faivre-Rampant P., Lapeyrie Frey-klett P., Vion P., Villar M. (2001): Variation in the ability to form ectomycorrhizas in the F1 progeny of an interspecific poplar (*Populus* spp.) cross. *Mycorrhiza* 10: 237–24
- Takács T., Radimsky L., Németh T. (2005): The arbuscular mycorrhizal status of poplar clones selected for phytoremediation of soils contaminated with heavy metals. *Z. Naturforsch.* 60c: 357-361
- van der Heijden E. W., Vosatka M (1999): Mycorrhizal associations of *Salix repens* L. communities in succession of dune ecosystems. Part II. Mycorrhizal dynamics and interactions of ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal fungi. *Can J Bot* 77: 1833–1841
- Vozzo J. A., Hacsakaylo E. (1974): Endo- and ectomycorrhizal associations in five *Populus* species. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 101. 182-186
- WHO (2000): *Air Quality Guidelines for Europe*, Reg. Publ. Eur. Ser., WHO Reg. Off. Eur., Copenhagen, 2nd ed., No 91, pp 288

S u m m a r y

COLONIZATION OF POPLAR ROOTS WITH ECTOMYCORRHIZAL, ARBUSCULAR MYCORRHIZAL AND DARK SEPTATED ENDOPHYTIC FUNGI

by

Marina Katanić, Branislav Kovačević, Natalia Glowska, Elena Paoletti, Sreten Vasić, Milan Matavulj, Hojka Kraigher

Poplars are widespread, fast growing woody species with high biotechnological potential. They form a functional mycorrhizal association with ectomycorrhizal (ECM) and arbuscular mycorrhizal (AM) fungi at the same time which contribute to their broad ecological valence, and wide geographical distribution.

The aim of this study was to determine and compare the level of colonization of poplar roots with ECM, AM and dark septated endophytic fungi (END) and to study the effects of site conditions on these parameters. Four sites with poplars were selected: at the first location „Rasadnik” a white poplar clone multiplied in vitro was grown, the second site „Koviljski rit” was a natural habitat of native white poplar, the soil at the third site „Timok” was contaminated with pyrite tailings, contained heavy metals and had a low pH, while the fourth site „Antella” was a post-agricultural field in which ambient ozone impacts on an ozone-sensitive clone were investigated.

The roots were stained with trypan blue according to the protocol given by Kormanik and McGraw (1982) and modified by Karlinski et al. (2010). Root length colonization with ECM, AM and END was estimated using the intersection method according to McGonigle et al. (1990).

The presence of AM fungi was not observed at the „Timok” site while its highest value was recorded at „Antella” where it amounted 24.76%. The value of poplar root length colonization with AM fungi and AM / ECM ratio significantly differed between these two sites. On the other hand, poplar root length colonization with ECM fungi was even, ranging from 16.7% at „Koviljski rit” to 21.84% at „Antella”. Dark septated endophytic fungi inhabited the poplar roots to a lesser extent; colonization of these fungi ranged from 1.38% at „Rasadnik” to 6.09% at „Koviljski rit”.

At „Rasadnik” a positive correlation between the root length colonization with AM and ECM and with ECM and END fungi was observed, while there was no correlation between colonization with AM and END. At „Koviljski rit” a positive correlation between the ECM and AM fungi was recorded, while a negative correlation was found between colonization with END and END and between ECM and AM fungi. At „Timok” no AM structures were observed, and the correlation between the ECM and END fungi was negative. At „Antella” the correlation between the ECM and AM colonization and ECM and END colonization was negative while between AM fungi and END was positive. However, the correlation between roots colonization with AM, END and ECM fungi in any of the analyzed localities was not statistically significant according to Spearman's coefficients.

Colonization of roots with ECM, AM and ECM fungi could not be used as a reliable parameter in the purpose of mycobioremediation, therefore the total biomass and length of analyzed roots should be determined in further research as well.