

UDK; 582.623:632.7(497.113 Novi Sad)
Originalan naučni rad (*Original scientific paper*)

PRVA IDENTIFIKACIJA TIPOVA EKTOMIKORIZE U ZASADU BELIH TOPOLA (*Populus alba* L.) KOD NOVOG SADA

Katanić Marina¹, Grebenc Tine², Hrenko Melita², Štupar Barbara², Galić Zoran¹, Orlović Saša¹, Kraigher Hojka²

Izvod: U radu su opisani i identifikovani tipovi ektomikorize u zasadu bele topole (*Populus alba* L.) kod Novog Sada. Identifikacija je izvršena kombinovanjem morfoloških i anatomskih opisa sa molekularnim metodama (RFLP i sekvencioniranje ITS regiona u ribozomalnoj DNK). Konstatovano je šest tipova ektomikorize koji su fotografisani i kratko opisani prema morfološkim, anatomskim i molekularnim karakteristikama. Dva tipa ektomikorize su identifikovana do nivoa vrste (*Tuber rufum* i *Inocybe squamata*), za sledeća dva tipa je određena pripadnost rodu (*Tomentella* sp. i *Inocybe* sp.), dok je za poslednja dva ektomikorizna tipa utvrđena pripadnost familiji (Cortinariaceae i Thelephoraceae).

Ključne reči: morfološka-anatomska karakterizacija, RFLP, sekvencioniranje, ribozomalni DNK ITS region

FIRST IDENTIFICATION OF TYPES OF ECTOMYCORRHIZA IN WHITE POPLAR (*Populus alba* L.) STAND IN VICINITY OF NOVI SAD

Abstract: The objective of this work was to describe and identify types of ectomycorrhiza in a white poplar (*Populus alba* L.) stand in the vicinity of Novi Sad, Vojvodina. Identification was achieved by combining morphological and anatomical descriptions with molecular methods (RFLP and sequencing of ITS region in ribosomal DNK). Six distinct types of ectomycorrhiza were observed. They were photographed and briefly described according to morphological, anatomical and molecular characteristics. Two types of ectomycorrhiza were identified to the species level (*Tuber rufum* and *Inocybe squamata*), two were determined to the genus level (*Tomentella* sp. and *Inocybe* sp.) and additional two types of ectomycorrhiza were determined to the family level of the fungal partner in ectomycorrhiza (Cortinariaceae and Thelephoraceae).

Key words: morphological-anatomical characterization, RFLP, sequencing, ribosomal DNK ITS region

1. UVOD

Pojam mikoriza je prvi put upotrebio Frank 1885. god. (Frank, 2005) da bi označio organ - mikorizni koren tj. simbiozu između gljiva i viših biljaka. Gljive i biljke se u ovom slučaju smatraju partnerima u simbiozi, zajednici koja je od koristi za oba organizma. Međutim, mikoriza nije obavezno ni isključivo korisna za sve partnere. Efikasnost zajednice se može menjati u odnosu na vreme posmatranja i uslove sredine i opaža se kao promena u funkciji, a zatim u anatomskim strukturama (Smith i Read, 2008).

¹ Dipl. biolog Marina Katanić istraživač saradnik, dr Zoran Galić viši naučni saradnik, Saša Orlović naučni savetnik, Istraživačko razvojni institut za nizijsko šumarstvo i životnu sredinu, Novi Sad

² Dr Tine Grebenc naučni saradnik, dipl. biolog Melita Hrenko istraživač saradnik, dipl. ing. Barbara Štupar vođa laboratorije, prof. dr Hojka Kraigher naučni savetnik, Šumarski institut Slovenije, Ljubljana, Slovenija

Poznato je više oblika mikorize koji se prema načinu kontakta između gljive i biljke i taksonomskih grupa gljivnih i biljnih partnera dele na: arbuskularnu mikorizu, ektomikorizu, ektendomikorizu, arbutoidnu mikorizu, monotropoidnu mikorizu, erikoidnu mikorizu i orhidejsku mikorizu (Smith i Read, 2008).

U umerenom pojasu su najčešći oblici mikorize arbuskularna mikoriza i ektomikoriza. Za ektomikorizu je značajno da gljivni partner obrazuje tri strukturne komponente: plašt koji obavija koren, lavirint hifa koji se prostire između ćelija primarne kore korena i sistem vankorenskih elemenata (hife, rizomorfi, cistidije) koji povezuju organ - ektomikorizni koren sa ostatkom micelija, delovima supstrata i plodonosnim telima gljive (Smith i Read, 2008).

Zasnivanje, rast i preživljavanje drveća u većini umerenih i borealnih šuma, zavisi od naseljavanja ektomikoriznih gljiva. Ove gljive uspešno usvajaju vodu, organske i neorganske nutrijente iz supstrata, a zatim ih translociraju do sitnih korena biljke od koje preuzimaju ugljene hidrate (Smith i Read, 2008). Velika brojnost vrsta mikoriznih gljiva, specifičnost prema domaćinu kao i metabolička aktivnost omogućavaju efikasno iskorišćavanje raspoloživih nutrijenata (Read, 1991).

Micelijum ektomikoriznih gljiva predstavlja glavnu komponentu šumskih ekosistema koja povezuje drveće, prizemnu vegetaciju i dekompozitore u šumskom zemljištu. Diverzitet vrsta i javljanje mikoriznih gljiva mogu da se menjaju sa različitim sukcesivnim etapama šume i pod uticajem su različitih stresogenih faktora (Kraigher, 1996). Funkcionalna kompatibilnost gljive i biljke zavisi od vrste gljive (Gianinazzi-Pearson, 1984), pa je zbog toga njihova identifikacija esencijalna za izučavanje fiziologije šumskog drveća i funkcionisanje šumskih ekosistema (Kraigher, 1999).

Ektomikorizne gljive pripadaju razdelima Basidiomycota, Ascomycota i Glomeromycota i njihov diverzitet je procenjen na preko 5000 vrsta (Molina, et al. 1992). Ektomikorizna zajednica pod zemljom je veoma bogata vrstama, sa oko 20 do preko 50 vrsta ektomikoriznih gljiva koje naseljavaju pojedinačne drvenaste vrste na datom zasadu (Horton i Bruns, 2001).

Identifikacija ektomikoriznih gljiva do nivoa vrste se može postići kombinovanjem morfotajpinga-detaljnih morfoloških i anatomskih opisa baziranih na svetlosnoj mikroskopiji (Agerer, 1991) sa molekularnim metodama. Identifikacija molekularnim metodama je bazirana na PCR umnožavanju ITS (Internal Transcribed Spacer) regiona unutar jedarne ribozomalne DNK, molekularnim markerom koji najbolje razdvaja uzorke gljiva na nivou vrste. Ovaj metod se koristi u mnogim istraživanjima strukture ektomikorizne zajednice (Gardes i Bruns, 1993).

Iako se pretpostavlja, da u ektomikorizi može učestvovati više od 5.000 vrsta gljiva, u *Colour Atlas of Ectomycorrhizae* (Agerer, 1987-2002), najvećoj sistematizovanoj kolekciji opisa morfotipova ektomikorize, ključevi za rod *Populus* sadrže svega sedam morfotipova, dok je u dopunskim opisima *Descriptions of ectomycorrhizae* (Agerer, et al. 2001-2006) dodatno opisano još tri morfotipa. Sa druge strane topole su komplikovane u pogledu mikorize, jer pored ektomikorize poseduju i arbuskularnu mikorizu.

U vreme energetske krize, poslednje decenije, topole su postale interesantni objekti istraživanja za biotehnologiju. Pored toga što su od komercijalnog značaja, na pr. za papirnu industriju, topole poseduju i niz biotehnoloških prednosti kao što su brz rast, jednostavna propagacija *in vitro* i postojanje sistema genetske transformacije (Fladung i Ahuja, 1996). Kombinacija dva oblika mikorize, ektomikorize i arbuskularne mikorize, rodu *Populus* omogućava opstanak u veoma različitim, kao i u stresnim uslovima životne sredine, a takođe i upotrebu u svrhe fitoremedijacije.

S obzirom na veliki značaj koji ektomikorizne gljive imaju za svog domaćina, kao i na činjenicu da kod nas nema podataka o diverzitetu ovih gljiva na topolama i na šumskom drveću uopšte, cilj ovog rada je da se u zasadu bele topole preliminarno opišu i identifikuju tipovi ektomikorize.

2. MATERIJAL I METOD RADA

2.1. Uzimanje uzoraka

Ektomikorize su izolovane iz zemljišta uzetog na oglednom dobru Instituta za nizijsko šumarstvo i životnu sredinu (N 45° 17' 25,5 " E 19° 53' 38") koje se nalazi pored sela Kać i udaljeno je oko 20 km od Novog Sada. Nadmorska visina lokaliteta je 73 m, dok je klima umereno kontinentalna. Prosečna godišnja količina padavina je 597 mm, prosečna temperatura vazduha je u januaru -1,3 °C, u julu iznosi 21,5 °C, dok je prosečna godišnja temperatura vazduha 11 °C (Katić et al., 1979). Tip zemljišta je fluvisol - ilovasta forma. Ispitivanja su vršena u zasadu bele topole (*Populus alba* L.) starom oko dvadeset godina, u kome su u manjem procentu zastupljeni vinova loza (*Vitis vinifera* L.), bagrem (*Robinia pseudoacacia* L.), pajasen (*Acer negundo* L.), zova (*Sambucus nigra* L.), kupina (*Rubus idaeus* L.) i svib (*Cornus sanguinea* L.).

Uzorci zemljišta za analizu tipova ektomikorize su uzeti avgusta 2007. godine, na udaljenosti od oko 1m od debla. Ogledom je obuhvaćeno pet stabala bele topole. Korišćena je sonda zapremine 274 ml, pri čemu se išlo do 18 cm u dubinu zemljišta (standardizovani uzorci) (Kraigher, 1999). Do analize su uzorci čuvani na temperaturi 4 °C do jednog meseca (pojedini uzorci i do tri meseca), pri čemu je procenjeno da nije došlo do narušavanja integriteta uzoraka. Uzorci zemljišta su pre analize bili oko 24 h potopljeni u vodi kako bi se lakše odstranili preostali delovi supstrata.

2.2. Identifikacija tipova ektomikorize morfološko-anatomskim metodama

Razlikovanje morfoloških tipova je vršeno na osnovu makroskopskih i mikroskopskih karakteristika. U radu su korišćeni stereo lupa (Olympus SZX 12, izvor svetlosti Olympus Highlight 3100, filter za dnevno svetlo) i mikroskop (Olympus BX51, uvećanje 100-2000x).

Identifikacija tipova ektomikorize je izvršena po morfološkim i anatomskim karakteristikama prema objavljenim opisima (Agerer, 1987-2002 i Agerer, et al. 2001-2006) po metodologiji opisanoj kod Kraigher (1996).

2.3. Identifikacija tipova ektomikorize molekularnim metodama

2.3.1. Ekstrakcija DNK

Ekstrakcija totalne DNK iz ektomikoriznog korena je izvršena po metodi opisanoj u Martín (2000) i po komercijalnom protokolu Plant DNeazi mini kit (QIAGEN Inc.). Krajem ekstrakcije DNK je rastopljena u sterilnoj destilovanoj vodi. Količina resuspendirane DNK u ekstraktu nije merena.

2.3.2. Umnožavanje DNK

Amplifikacija ITS regiona je izvršena sa prajmerskim parom ITS1F i ITS4 (Gardes i Bruns, 1993) koji osigurava karakterističko umnožavanje odabranog regiona u ribozomalnoj DNK gljiva. Polimerazna lančana reakcija je urađena na Applied Biosystems GeneAmp® PCR System-u 9700 po protokolu opisanom u Kraigher, et al. (1995) i modifikovanom po Grebenc i Kraigher (2007). Uz svaku lančanu reakciju vođena je i negativna kontrola. Provera uspeha amplifikacije i odabiranje uzorka za daljnje analize izvršena je gelskom elektroforezom (Grebenc, et al. 2000).

2.3.3. Restrikcija produkata polimerazne lančane reakcije

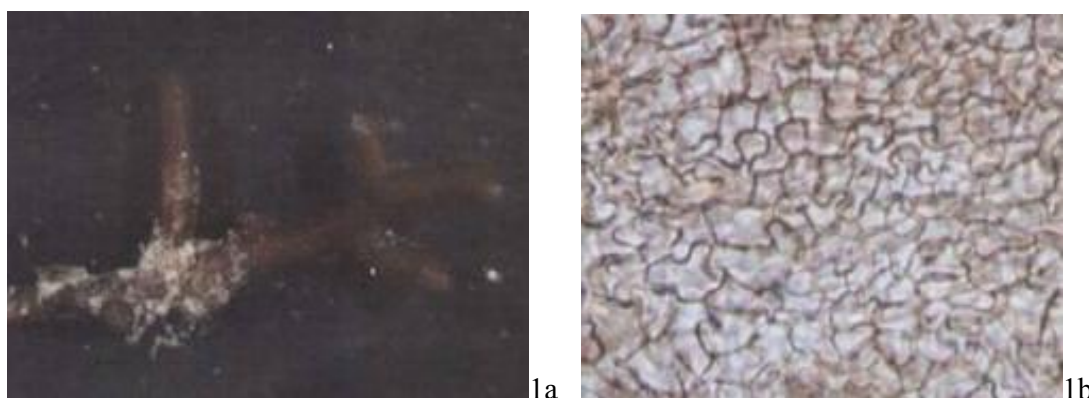
Za restrikciju je korišćeno 6 µl PCR produkta kome je dodata jednaka količina ostalih komponenata restrikcione smeše po uputstvima proizvođača enzima. Korišćene su tri restrikcione endonukleaze: *HinfI*, *MboI* i *TaqI* (Kårén, et al. 1997). Restrikcija je tekla u vodenom kupatilu pri optimalnoj temperaturi 90 min. (za *HinfI* 37 °C, *MboI* 37 °C, za *TaqI* 65 °C). Reakcija restrikcije je zaustavljena sa 2 µl pufera za nanošenje na gel za elektroforezu. Uzorci su do nanošenja na gel čuvani na temperaturi od 4 °C. Dužina pomnoženih produkata i restrikcionih fragmenata je utvrđena na 2 % agaroznom gelu uz upotrebu 100bp DNA Ladder (Fermentas) skale. Analiza RFLP uzoraka je urađena uz pomoć programskog paketa Taxotron (Grimond, 1998) i upoređena sa PCR-RFLP bazom podataka na Šumarskom institutu Slovenije (http://www.gozdis.si/departments/fisiologygenetics/forfisiology_genetics_dept.htm; Grebenc et al., 2000)

2.3.4. Sekvencioniranje

Amplificirani fragmenti su prečišćeni korišćenjem QIAquick Gel-a (QIAGEN Inc.) ili su direktno poslani u odabrani sekvencioni servis na sekvencioniranje (Macrogen). Sequencher 4.8 (GeneCodes) je korišćenjen da bi se identifikovale konsenzus sekvence na oba lanca svakog izolata. Sekvence su prosledene u EMBL bazu sa naznačenim pristupnim brojevima. Pripadnost vrsti, rodu ili familiji ektomikoriznih gljiva utvrđena je kad je poređenje sekvenci pokazalo 99% srodnost sa prethodno publikovanom sekvencom.

3. REZULTATI

U zasadu bele topole identifikovano je sledećih šest tipova ektomikorize koji su opisani prema morfo-anatomskim karakteristikama i molekularnom identifikacijom.



Slika 1a – Mikorizni sistem tipa ektomikorize MK001-Srb001 na beloju topoli, uvećano 15x; 1b – sloj plašta tipa ektomikorize MK001-Srb001 sa puzzle -like ćelijama, uvećano 2000x
Figure 1a – Mycorrhizal system of ectomycorrhizal type MK001-Srb001 on white poplar, enlarged ca 15x; 1b – mantle layer of ectomycorrhizal type MK001-Srb001 with puzzle - like cells, enlarged 2000x

Tip MK001-Srb001-SLO10001

Opis: Agerer (1987-2002) (*Inocybe* sp.)

Morfologija mikoriznog sistema

Grananje: iregularno pinatno ili monopodialno-pinatno

Oblik: ravna do malo iskrivljena
Površina: glatka
Boja: smeđa
Boja vrhova: zlatna
Vankorenski elementi: nisu opaženi

Anatomija

Plajt: pseudoparenhimski, M tip plašta po Agereru (1987-2002)
Izlazeće hife: nisu opažene
Anastomoze: nisu opažene
Rizomorfi: nisu opaženi
Cistidije: nisu opažene

Molekularna identifikacija

Rezultat upoređivanja dobijene sekvence potvrđuje slaganje sa vrstom *Inocybe squamata* J.E. Lange (AM882780, 99%)

Tip MK002-Srb002-SLO10002

Opis: Agerer (1987-2002) (*Tuber* sp.)

Morfologija mikoriznog sistema

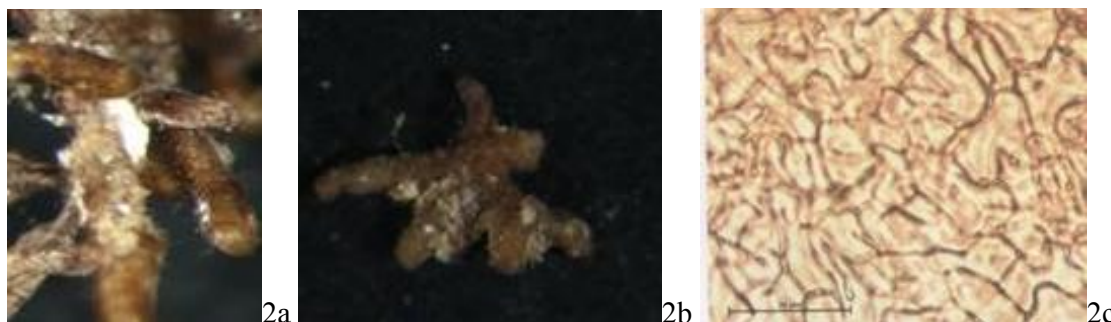
Grananje: jednostavna, monopodijalno pinatna
Oblik: malo iskrivljena
Površina: glatka
Boja: tamnije smeđa, smeđa, zlatno-smeđa
Boja vrhova: svetlije smeđa
Vankorenski elementi: hife

Anatomija

Plajt: pseudoparenhimatski do plektenhimatski, Q tip po Agereru (1987-2002)
Izlazeće hife: talasaste
Anastomoze: nisu opažene
Rizomorfi: nisu opaženi
Cistidije: nisu opažene
Napomene: prisustvo intrahifalnih hifa

Molekularna identifikacija

Rezultat upoređivanja dobijene sekvence potvrđuje slaganje sa vrstom *Tuber rufum* Pico (EF362475, 99%).



Slika 2a, b – Mikorizni sistem tipa ektomikorize MK002-Srb002, uvećano 45x; 2c – sloj plašta tipa ektomikorize MK002-Srb002, skala predstavlja 20 μ m

Figure 2a, b – Mycorrhizal system of ectomycorrhizal type MK002-Srb002, enlarged 45x; 2c – mantle layer of ectomycorrhizal type MK002-Srb002, bar represents 20 μ m

Tip MK003-Srb003-SLO10003

Opis: Agerer (1987-2002) (*Inocybe* sp.)

Morfologija mikoriznog sistema

Grananje: jednostavna, negranata

Oblik: prava

Površina: glatka, sjajna sa peskom

Boja: krem

Boja vrhova: krem

Vankorenski elementi: nisu opaženi

Anatomija

Plasht: plektenhim i pseudoparenhim, H tip po Agereru (1987-2002)

Izlazeće hife: nisu opažene

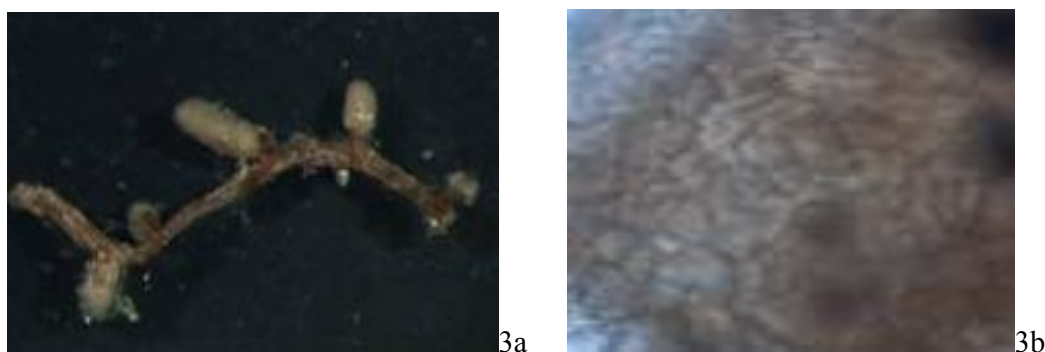
Anastomoze: nisu opažene

Rizomorfi: nisu opažene

Cistidije: nisu opažene

Molekularna identifikacija

Rezultat upoređivanja dobijene sekvence potvrđuje slaganje sa vrstom iz roda *Inocybe* sp. (DQ974780 100%).



Slika 3a – Mikorizni sistem tipa ektomikorize MK003-Srb003, uvećano ca 25x; 3b – sloj plašta tipa ektomikorize MK003-Srb003, uvećano 2000x

Figure 3a – Mycorrhizal system of ectomycorrhizal type MK003-Srb003, enlarged ca 25x; 3b – mantle layer of ectomycorrhizal type MK003-Srb003, enlarged 2000x

Tip MK004-Srb004-SLO10004

Opis: Agerer (1987-2002) (*Tomentella* sp.)

Morfologija mikoriznog sistema

Grananje: jednostavna, monopodijalno pinatna, monopodijalno piramidalna

Oblik: prava, malo iskrivljena

Površina: zrnasta, glatka

Boja: zlatna

Boja vrhova: zlatna

Vankorenski elementi: hife, cistidije

Anatomija

Plasht: pseudoparenhim M tip po Agereru (1987-2002), plektenhim

Izlazeće hife: sa sponama

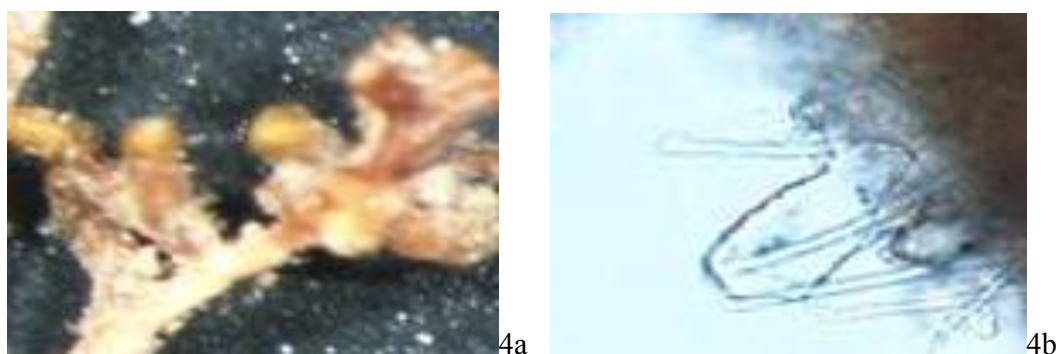
Anastomoze: nisu opažene

Rizomorfi: nisu opaženi

Cistidije: N tip po Agereru (1987-2002)

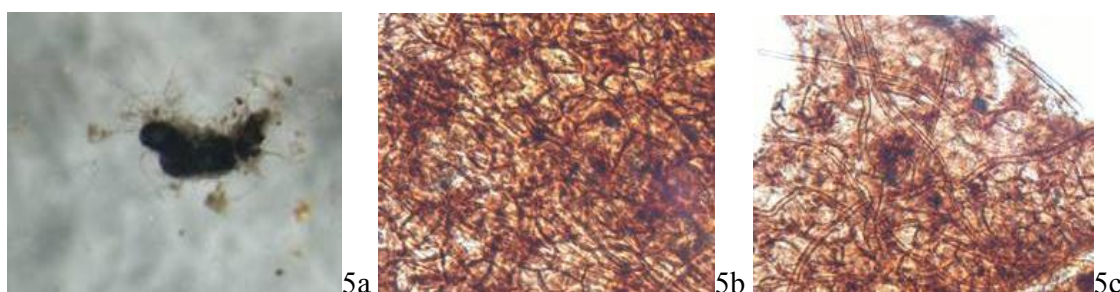
Molekularna identifikacija

Rezultat upoređivanja dobijene sekvence potvrđuje slaganje sa vrstom iz roda *Tomentella* sp. (DQ974780, 96%).



Slika 4a – Mikorizni sistem tipa ektomikorize MK004-Srb004, uvećano ca 25x; 4b – cistidije tipa ektomikorize MK004-Srb004, uvećano 2000x

Figure 4a – Mycorrhizal system of ectomycorrhizal type MK004-Srb004, enlarged ca 25x; 4b – cystidia of ectomycorrhizal type MK004-Srb004, enlarged 2000x



Slika 5a – Mikorizni sistem tipa ektomikorize MK005-Srb005, uvećano ca 15x; 5b – plašt tipa ektomikorize MK005-Srb005 sa angularnim ćelijama, uvećano 2000x; 5c – hife sa sponama tipa ektomikorize MK005-Srb005, uvećano 2000x

Figure 5a – Mycorrhizal system of ectomycorrhizal type MK005-Srb005, enlarged ca 15x; 5b – mantle of ectomycorrhizal type MK005-Srb005 with angular cells, enlarged 2000x; 5c – hyphae of ectomycorrhizal type MK005-Srb005 with clamps, enlarged 2000x

Tip MK005-Srb005-SLO10005

Opis: Agerer (1987-2002) (*Thelephoraceae*)

Morfologija mikoriznog sistema

Grananje: jednostavna ili monopodijalno pinatna

Oblik: prava ili malo iskrivljena

Površina: pamučasta ili sa dužim bodljama, sa česticama tla

Boja: tamno smeđa, mat

Boja vrhova: ista

Vankorenski elementi: hife

Anatomija

Plašt: pseudoparenhim, angularne ćelije, tamno smeđe, debelih zidova, zvezdasto raspoređene, L tip po Agereru (1987-2002)

Izlazeće hife: sa sponama, debelih zidova, tamno smeđe

Anastomoze: nisu opažene

Rizomorfi: nisu opaženi

Cistidije: nisu opažene

Molekularna identifikacija

Rezultat upoređivanja dobijene sekvence potvrđuje slaganje sa vrstom iz familije *Thelephoraceae* (EU403099.1 98%).

Tip MK006-Srb006-SLO10006

Opis: Agerer (1987-2002) (*Cortinariaceae*)

Morfologija mikoriznog sistema

Grananje: monopodijalno pinatna, monopodijalno piramidalna

Oblik: prava, malo iskrivljena

Površina: glatka, zrnasta sa peskom

Boja: krem sa smeđim pegama, ili smeđa sa krem pegama

Boja vrhova: ista

Vankorenski elementi: rizomorfi, hife

Anatomija

Pláš: pseudoparenhim L i M tip po Agereru (1987-2002) i plektenhim

Izlazeće hife: debelih zidova, sa sponama

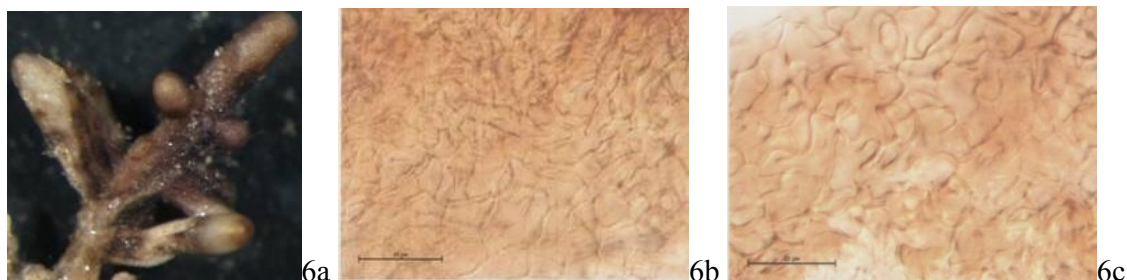
Anastomoze: nisu opažene

Rizomorfi: tip A po Agereru (1987-2002)

Cistidije: nisu opažene

Molekularna identifikacija

Rezultat upoređivanja dobijene sekvence potvrđuje slaganje sa vrstom iz familije *Cortinariaceae* (AJ879668, 97%).



Slika 6a – Mikorizni sistem tipa ektomikorize MK006-Srb006, uvećano ca 25x; 6b – plektenhimski plašt tipa ektomikorize MK006-Srb006, skala predstavlja 20µm; 6c – pseudoparenhimski plašt tipa ektomikorize MK006-Srb006 skala predstavlja 20µm
Figure 6a – Mycorrhizal system of ectomycorrhizal type MK006-Srb006, enlarged ca 25x; 6b – plectenchymatous mantle of ectomycorrhizal type MK006-Srb006, bar represents 20 µm; 6c – pseudoparenchymatous mantle of ectomycorrhizal type MK006-Srb006, bar represents 20 µm

4. DISKUSIJA

U zasadu bele topole je konstatovano šest tipova ektomikorize. Dva fungalna partnera su molekularnim metodama identifikovana do vrste: *Tuber rufum* i *Inocybe squamata*, dva do roda *Tomentella* sp. i *Inocybe* sp., dok je za poslednje dve gljive molekularnim metodama utvrđena pripadnost familijama Cortinariaceae i Thelephoraceae.

Utvrđeno prisustvo gljive iz roda *Tomentella* je u skladu sa rezultatima Jakucs, et al. (2005) po kojima su tomenteloidne ektomikorizne gljive stalni, raznoliki i vrstama bogati članovi ektomikorizne zajednice u umereno kontinentalnim lišćarskim šumama.

Kaldorf, et al. (2003) su zabeležili prisustvo dva pripadnika familije Thelephoraceae vršeći karakterizaciju i proučavajući prostornu distribuciju ektomikoriza na klonovima jasike u eksperimentalnom polju. Utvrdili su da 90% od svih ektomikoriza, pored

pomenutih članova porodice Thelephoraceae, formira *Cenococcum geophilum* Fr., *Laccaria* sp., *Phialocephala fortinii* Wang&Wilcox i jedan pripadnik reda Pezizales.

U mešovitoj šumi u kojoj dominira američka jasika (*Populus tremuloides* Michx) Visser, et al. (1998) su utvrdili bogatu zastupljenost gljiva *Piloderma byssinum* (P. Karst.) Jülich, *Cenococcum geophilum*, *Cortinarius* spp., *Russula* spp. i *Tomentella* spp.

Pripadnici familije Thelephoraceae, posebno rod *Tomentella* su poznati kao članovi ektomikorizne zajednice na topolama. Vrste *T. pilosa* i *T. subtestacea* su detaljno opisane u *Colour Atlas of Ectomycorrhizae* (Agerer, 1987-2002) kao simbionti koji se isključivo javljaju na topolama. S obzirom da su dva morfortipa, od šest konstatovanih, iz familije Thelephoraceae, rezultati ovog istraživanja potvrđuju relativno veliku zastupljenost ove familije i u našem ogleđnom dobru.

Vrsta *Tuber rufum* je u *Colour Atlas of Ectomycorrhizae* (Agerer 1987-2002) opisana kao simbiont lešnika i ovo je prvi put prema poređenoj literaturi da je nađen na topolama.

Iako je gljiva *Cenococcum geophilum* generalist koji se često javlja na šumskom drveću (Visser, et al. 1998; Kaldorf, et al. 2003; Pučko, et al. 2004; Grebenc, 2005), prilikom istraživanja nije nađena, što bi se moglo objasniti nedovoljnim brojem uzoraka ili razlikama u uslovima staništa.

Velike razlike u kompoziciji ektomikoriznih gljiva koje se javljaju na nekom lokalitetu potiču od različitih vrsta domaćina kao i od razlika u uslovima staništa. Mikorizne gljive su neravnomerno raspoređene u zemljištu usled nejednakog rasporeda zemljišnih nutrijenata. Potencijal (spore, micelijum, mikoriza) pojedinačne vrste kao i grupe mikoriznih gljiva može da se kreće od nule do velikog broja na lokalitetima koji su jedni od drugih udaljeni samo nekoliko centimetara. Poznato je takođe da diverzitet i brojnost mikoriznih gljiva varira sa promenama staništa, i da se ektomikorizne gljive mogu koristiti kao indikator stepena zagađenosti životne sredine (Kraigher, 1996). Da bi se utvrdilo stanje životne sredine i pratile njene promene, diverzitet ektomikorize treba pratiti sezonski.

Radi potpunijeg uvida u diverzitet ektomikoriznih gljiva i njihovog korišćenja u svrhu mikobioindikacije neophodna su dalja istraživanja na većem broju uzoraka kao i praćenje brojnosti i sezonske dinamike tipova ektomikorize.

5. ZAKLJUČCI

U zasadu bele topole je konstatovano šest tipova ektomikorize. Dve gljive su identifikovane do vrste (*Tuber rufum* i *Inocybe squamata*); za dve gljive je utvrđena pripadnost rodu (*Tomentella* sp. i *Inocybe* sp.) dok su poslednja dva fungalna partnera iz ektomikorize identifikovana samo do familije (Cortinariaceae i Thelephoraceae). Neophodna su dalja istraživanja na većem broju uzoraka i staništa bele topole, kako bi se dobio potpuniji uvid u diverzitet i brojnost ektomikoriznih gljiva koje se javljaju na belim topolama.

6. LITERATURA

- Agerer R. (1991): Characterisation of ectomycorrhiza. Techniques for the study of mycorrhiza. Norris J. R., Read D. J., Varma A. K. (Eds): Methods in Microbiology 23: 25-72
- Agerer R. (Ur., 1987-2002): Colour Atlas of Ectomycorrhizae 1st-12th Edition. Einhorn-Verlag, Schwäbisch Gmünd, Germany
- Agerer R., Danielson R.M., Egli S., Ingleby K., Luoma D., Treu R. (Ur., 2001-2006): Descriptions of ectomycorrhizae 1st – 10th Vol. Einhorn-Verlag, Schwäbisch Gmünd, Germany.
- Fladung M., Ahuja M. R. (1996): Gene transfer in aspen. Schmidt E. R. Hankeln T. (eds) Transgenic organisms and biosafety. Springer, Berlin Heidelberg New York

- Frank B. (2005): On the nutritional dependence of certain trees on root symbiosis with belowground fungi (an English translation of A.B. Frank's classic paper of 1885). *Mycorrhiza* 15(4): 267-275
- Gardes M., Bruns T. D. (1993): ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of ectomycorrhizae and rusts. *Molecular ecology* 2: 113-118
- Gianinazzi-Pearson V. (1984): Host-fungus specificity in mycorrhizae. U: Genes involved in plant-microbe interactions. Verma D.P.S., Hohn T.H. (Ur.). Springer, Vienna: 225-253
- Grebenc T. (2005): Tipi ektomikorize na bukvi (*Fagus sylvatica* L.) v naravnem in gospodarskom gozdu. Doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Ljubljana
- Grebenc T., Piltaver A., Kraigher H. (2000): Establishment of a PCR-RFLP library for Basidiomycetes, Ascomycetes and their ectomycorrhizae in *Picea abies* (L.) Karst. *Phyton* 40(4): 79-82
- Grebenc T., Kraigher H. (2007): Changes in the community of ectomycorrhizal fungi and increased fine root number under adult beech trees chronically fumigated with double ambient ozone concentration. *Plant Biology* 9(2): 279-287
- Grimond P. A. D. 1998. Taxotron user's manual. Institute Pasteur, Paris.
- Horton T. R., Bruns T. D. (2001): The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Mol Ecol* 10:1855-1871
- Jakucs E., Kovacs G. M., Szedlay G., Eros-Honti Z. (2005): Morphological and molecular diversity and abundance of tomentelloid ectomycorrhizae in broad-leaved forests of the Hungarian Plain. *Mycorrhiza* 15: 459-470
- Kaldorf M., Renker C., Fladung M., Buscot F. (2004): Characterization and spatial distribution of ectomycorrhizas colonizing aspen clones released in an experimental field. *Mycorrhiza* 14: 295-306
- Kårén 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
- Katić P., Đukanović D., Đaković P. (1979): Klima Vojvodine Poljoprivredni fakultet u Novom Sadu-OUR Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad
- Kraigher H., Agerer R., Javornik B. (1995): Ectomycorrhiza of *Lactarius lignyotus* on Norway spruce, characterised by anatomical and molecular tools. *Mycorrhiza* 5: 175-180
- Kraigher H. (1996): Tipi mikorize: taksonomija, pomen, aplikacija. Zbornik gozdarstva in lesarstva, 49: 33-66
- Kraigher H. (1999): Diversity of types of ectomycorrhizae on Norway spruce in Slovenia. *Phyton* 39(3): 199-202
- Martín M.P. (2000): Protocols: DNA isolation, PCR and RFLP analyses. In: Martín M.P. (Ur.) Methods in root-soil interactions research. Protocols. Slovenian Forestry Institute, Ljubljana, pp 35-41
- Molina R., Massicotte H., Trappe J. M. (1992): Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis: community-ecological consequences and practical implications. In: Allen M.F. (ed) *Mycorrhizal functioning: an integrative plant-fungal process*. Chapman & Hall, New York, pp 357-423
- Pučko M., Grebenc T., Božič G., Brus R., Kraigher H. (2004): Identification of types of ectomycorrhizae on seedlings in a beech provenance trial. Zbornik gozdarstva in lesarstva, 75: 87-104
- Read D. J. (1991): Mycorrhizas in ecosystem. *Experientia* 47: 376-391
- Rogers, S. O., Bendlich, A. J. (1985): Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissue. *Plant Molecular Biology* 5: 69-76
- Smith S. E., Read D. J. (2008): *Mycorrhizal symbiosis*. Cambridge, Academic Press. 815p

Visser S., Maynard D., Danieson R. M. (1998): Response of ecto- and arbuscular fungi to clear-cutting and the application of chipped aspen wood in a mixedwood site in Alberta, Canada. *Applied Soil Ecology* 7: 257-269

Summary

FIRST IDENTIFICATION OF TYPES OF ECTOMYCORRHIZAE IN WHITE POPLAR (*Populus alba* L.) STAND IN VICINITY OF NOVI SAD

by

Katanić Marina, Grebenc Tine, Hrenko Melita, Štupar Barbara, Galić Zoran, Orlović Saša, Kraigher Hojka

Ectomycorrhizal fungi are of main significance for establishment, growth and survival of most trees in temperate and boreal forests. Mycelium of ectomycorrhizal fungi presents the main component of forestry ecosystems which links biotic with abiotic factors.

*Since ectomycorrhizae are significant and beneficial for their host, the aim of this work was to describe and identify types of ectomycorrhizae in selected white poplar (*Populus alba* L.) stand in vicinity of Novi Sad, Vojvodina.*

Identification of fungal partner in ectomycorrhiza was done by combining morphological and anatomical characters with molecular methods (RFLP and sequencing of ITS regions in ribosomal DNA). Six types of ectomycorrhizae were observed. They were photographed and described according to morphological, anatomical and molecular characteristics.

*Two fungal partners were identified to the species level: *Tuber rufum* and *Inocybe squamata*, two to the genus level: *Tomentella* sp. and *Inocybe* sp., the last two fungi were determined as members of families Cortinariaceae and Thelephoraceae.*

Further research is needed in order to achieve better insight into diversity and richness of ectomycorrhizal fungi that live on white poplars.