

Značaj mikoriznih asocijacija u voćarskoj proizvodnji

Cimprić, Andrea

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:547879>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-27**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

**Značaj mikoriznih asocijacija u voćarskoj
proizvodnji**

DIPLOMSKI RAD

Andrea Cimpri

Zagreb, srpanj, 2017.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:
Hortikultura: voćarstvo

**Značaj mikoriznih asocijacija u voćarskoj
proizvodnji**

DIPLOMSKI RAD

Andrea Cimpri

Mentor: prof. dr. sc. Sanja Sikora

Zagreb, srpanj, 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Andrea Cimprić**, JMBAG 0178084224, rođena dana 29.3.1992. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

Značaj mikoriznih asocijacija u voćarskoj proizvodnji

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišćeni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta / studentice

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZVIJEŠĆE
O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA**

Diplomski rad studentice **Andrea Cimprić**, JMBAG 0178084224, naslova

Značaj mikoriznih asocijacija u voćarskoj proizvodnji

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. prof. dr. sc. Sanja Sikora _____
2. izv. prof. dr. sc. Mihaela Blafinkov _____
3. izv. prof. dr. sc. Martina Skendrovi Babojeli _____

SADRŽAJ

| | |
|--|-----------|
| SAŽETAK | 6 |
| SUMMARY | 7 |
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TLO KAO STANIŠTE ZA MIKROORGANIZME | 2 |
| 2.1. UTJECAJ SVOJSTAVA TLA NA MIKROORGANIZME | 2 |
| 2.2. RASPROSTRANJENOST GLJIVA U TLU | 3 |
| 2.3. ŠIRENJE GLJIVA U TLU | 4 |
| 2.4. HRANIDBENI OBRASCI I MEHANIZMI PREŽIVLJAVANJA GLJIVA..... | 6 |
| 3. MIKORIZNE ASOCIJACIJE | 8 |
| 4. EKTOMIKORIZA | 11 |
| 4.1. MORFOLOGIJA EKTOMIKORIZA | 11 |
| 4.2. BILJKE DOMAĆINI | 12 |
| 4.3. TIJEK FORMIRANJA EKTOMIKORIZA..... | 13 |
| 5. ARBUSKULARNA MIKORIZA | 15 |
| 5.1. GLJIVE KOJE TVORE ARBUSKULARNE MIKORIZE | 16 |
| 5.2. BILJKE DOMAĆINI | 17 |
| 5.3. MORFOLOGIJA I ANATOMIJA ARBUSKULARNIH GLJIVA | 17 |
| 5.4. TIJEK KOLONIZACIJE | 18 |
| 6. MIKORIZE PRISUTNE KOD RODA ERICALES | 21 |
| 6.1. ARBUTOIDNE I MONOTROPOIDNE MIKORIZE..... | 21 |
| 6.2. ERIKOIDNE MIKORIZE | 22 |
| 7. EKOLOŠKI ZNAČAJ I PRIMJENA MIKORIZNIH GLJIVA U VOĆARSKOJ PROIZVODNJI | 23 |
| 7.1. ULOGA MIKORIZNIH ASOCIJACIJA U RAZLIČITIM EKOSUSTAVIMA..... | 24 |
| 7.2. GUBITAK HRANIVA ISPIRANJEM | 25 |
| 7.3. EKOLOŠKA VAŽNOST MIKORIZNIH ASOCIJACIJA | 26 |
| 7.4. ULOGA ARBUSKULARNIH MIKORIZA U SMANJENJU GUBITAKA FOSFORA I DUŠIKA | 28 |
| 7.5. ULOGA MIKORIZA U USVAJANJU HRANIVA TE RASTU I RAZVOJU BILJKE | 29 |
| 7.6. OTPORNOST BILJKE NA STRES | 34 |
| 7.7. OTPORNOST NA BOLESTI I ŠTETOČINE | 38 |
| 7.8. KORIST MIKORIZNIH ASOCIJACIJA ZA TLO | 40 |
| 7.9. UTJECAJ OKOLIŠNIH FAKTORA I AGRONOMSKIH ZAHVATA NA MIKORIZU | 41 |
| 8. PRIMJENA MOLEKULARNIH METODA U IDENTIFIKACIJI MIKORIZNIH GLJIVA | 45 |
| 8.1. IDENTIFIKACIJA MIKORIZNIH GLJIVA | 45 |
| 8.2. IZOLACIJA DNK MIKORIZNIH GLJIVA IZ UZORKA TLA | 45 |
| 8.3. PCR METODE | 46 |
| 8.4. DNK SEKVENCIONIRANJE | 47 |
| 8.5. IDENTIFIKACIJA I KULTIVACIJA EKTOMIKORIZNIH GLJIVA..... | 47 |
| 8.6. IDENTIFIKACIJA ARBUSKULARNIH GLJIVA | 48 |
| 8.6.1. <i>Inokulacija biljaka domaćina arbuskularnom gljivom</i> | 49 |
| 9. ZAKLJUČAK | 50 |
| 10. LITERATURA | 51 |

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Andree Cimprić**, naslova

Značaj mikoriznih asocijacija u voćarskoj proizvodnji

Mikorize su simbiozne asocijacije između gljiva i korjena viših biljaka. U ovom preglednom radu detaljno je obrađeno na koji način ovi mikroorganizmi tla mogu unaprijediti voćarsku proizvodnju. Obzirom na rastne zahtjeve u ekološkoj proizvodnji voća i regulativi prisutnoj u upotrebi sredstava za zaštitu, postoje utemeljene naznake da bi mikorizacija mogla biti korisna mjera u ekološki prihvatljivoj zaštiti bilja. Mikorizne gljive povećavaju biljnu otpornost na biotske i abiotske stresove, povećavaju otpornost na sušu, zaslanjenost tla te povećavaju biljnu otpornost na biljne bolesti i štetne insekte. Brojna istraživanja obrađena u ovom radu dokazuju pozitivan utjecaj mikoriza na usvajanje hraniva od strane biljke, povećavaju njen vegetativni rast, kod nekih voćnih vrsta ubrzavaju vrijeme dozrijevanja i utječu na veličinu i kemijski sastav plodova. Cilj ovog rada je opisati glavne značajke mikoriznih asocijacija te na koji način se one mogu iskoristiti u ekološki prihvatljivijoj, i kroz povećanje prinosa, ekonomski isplativijoj voćarskoj proizvodnji.

Ključne riječi: mikorizne asocijacije, voćarstvo, simbioza

Summary

Of the master's thesis of student Andrea Cimpri , entitled

Significance of mycorrhizal associations in fruit production

Mycorrhizae are symbiotic associations between fungi and plant roots. The aim of this paper is to present how these soil microorganisms can be useful in fruit production improvement. Taking into consideration growing demands in organic fruit production and corresponding legislation, mycorrhizal associations show increasing promise as an ecologically acceptable technique in plant protection. Mycorrhizal fungi increase plant resistance to disease and pests. Many of the studies presented in this paper prove positive effect of mycorrhizae on plant nutrient absorption, vegetative growth and even on fruit ripening, size and chemical composition. This paper focuses on the main features of mycorrhizal associations, as well as how they could be used in ecologically acceptable and economically profitable fruit production.

Keywords: mycorrhizal associations, fruit production, symbiosis

1. Uvod

Mikorizne asocijacije su simbiozni odnosi u kojima gljive koloniziraju kortikalno tkivo korijena biljke domaćina, pri čemu oba člana imaju korist jedan od drugoga. Biljka putem simbioze sa mikoriznom gljivom ima bolji pristup hranivima koje gljiva usvaja iz velikog volumena tla putem mreže razgranatih hifa. Zauzvrat, biljka gljivi pruža organski oblik ugljika. Biljka putem mikorizne asocijacije sa gljivom dobiva hraniva iz većeg volumena tla, što omogućava rast i razvoj čak i onda kada tlo nije bogato hranivima. Smatra se da su upravo mikorize, a ne korjenje biljaka, glavni organ za usvajanje hraniva iz tla. Brojni fosilni nalazi mikoriznih asocijacija, starih između 410 i 440 milijuna godina, upućuju na to da je upravo zahvaljujući mikoriznim asocijacijama došlo do prekrivanja kopna biljkama.

Rastu i broj istraživanja koji potvrđuju pozitivne učinke mikoriza jasno ukazuje da je neuzimanje mikoriznih asocijacija u voćarskoj, a i općenito poljoprivrednoj proizvodnji, u najmanju ruku nepreporučivo. Uspostavljanje ovih simbioznih odnosa omogućava uzgoj biljaka na manje stabilnim tlima, kao što su pjeskovita tla na kojima često dolazi do ispiranja hraniva, zatim uzgoj u uvjetima velike zasljenjenosti tla. Pokazale su se korisnim i u uvjetima suše. Svojim djelovanjem mikorizne gljive mogu mijenjati pH vrijednost tla otpuštanjem H^+ iona ili putem proizvodnje organskih kiselina, što znači da je uz mikorizu moguće uzgoj na tlima koja bi radi svoje pH vrijednosti bila manje pogodna za uzgoj nekih voćnih vrsta.

Osim brojnih pozitivnih utjecaja na rast i razvoj biljke te na povećanje otpornosti na abiotičke stresove, mikorizne gljive pokazale su se učinkovitim u zaštiti bilja od nekih biljnih bolesti i štetočina. U ekološkom kontekstu, mikorize se mogu koristiti kao bioindikatori zagađenosti teških metalima, no osim kao bioindikatora, mogu ih se upotrijebiti i u filtraciji otpadnih voda. Mnoga istraživanja upućuju na to da su mikorizne asocijacije neizostavan korak u vraćanju prirodne ravnoteže na mjestima na kojima je ona narušena ljudskim djelovanjem ili prirodnim katastrofama, kao što su područja zahvaćena požarima, ili tla kakva nalazimo u okolini rudnika koja su nepovoljna za rast i razvoj drvenastih vrsta.

Poljoprivredne, ekološke i ekonomske koristi ovih mikroorganizama su neotvoreni niti jedan uzgajivač ne bi smio zanemariti, osobito s obzirom na rastuće zahtjeve za organskim i ekološkim uzgojem voća. Cilj ovog rada je detaljno prikazati pozitivne osobine mikoriznih asocijacija sa korjenjem viših biljaka, te načine na koje se one mogu uspješno koristiti u komercijalnoj voćarskoj proizvodnji.

2. Tlo kao stanište za mikroorganizme

Ukoliko želimo razumjeti mikrobiologiju tla, prvo je potrebno razumjeti tlo kao dinamično stanište nastalo pod utjecajem mnogih međusobno povezanih čimbenika.

Tlo je nastalo kao rezultat pedogenetskih procesa transformacije mineralne i organske tvari, pod utjecajem reljefa, klime, živih organizama, vremena, utjecaja ljudske aktivnosti te materije i supstrata (Husnjak, 2014).

Tlo je pod utjecajem više čimbenika, kao što su interakcija klime, naročito temperature i vlage, živih organizama, topografije u kontekstu nagiba i nadmorske visine te izvornog materijala odnosno mineralne i organske tvari. Uzimajući u obzir kompleksnost svakog pojedinog čimbenika i međusobnog utjecaja jednog na drugi, tlo se smatra najkompleksnijim staništem za mikroorganizme.

Važno je poznavati fizikalne karakteristike tla (tekstura, gustoća, poroznost i struktura), kiselost tla, te abiotičke čimbenike budući da su ti faktori usko povezani sa mikrobiološkom aktivnosti. Mikroorganizmi mogu svojim djelovanjem na pozitivan ili negativan način utjecati na navedene karakteristike pa je iz tog razloga potrebno obratiti pozornost na obilježja tla.

Od fizikalnih karakteristika treba obratiti pozornost na teksturu jer je ona važna za prozornost i propusnost što je pak dalje važno za vodozadržavanje tla. Tu su usko povezana gustoća, elastičnost i poroznost budući da su upravo ti čimbenici u tlu staništa za mikroorganizme. Tako pjeskovito tlo ima veću gustoću u zapremnini i manje poroznog prostora (30-50%) u odnosu na glineno tlo koja imaju 50-60% poroznog prostora (Sylvia i sur., 2005).

2.1. Utjecaj svojstava tla na mikroorganizme

U pravilu, većina mikroorganizama i biljaka preferira neutralnu pH vrijednost između 6 i 7 budući da je to vrijednost u kojoj su hraniva najbolje dostupna. Nemaju sve vrste mikroorganizama iste zahtjeve za uvjetima u tlu, pa tako primjerice aktinomicete preferiraju neutralne uvjete i ne podnose dobro kiselost, dok s druge strane mikroorganizme nalazimo i na područjima gdje je pH vrijednost varira između 1 i 13; točnije, većina gljiva podnosi kiselost tla. Ne samo da pH tla utječe na prisustvo i zastupljenost mikroorganizama, već i mikroorganizmi imaju sposobnost mijenjati pH vrijednost tla u kojem se nalaze na način da, u

prisustvu kisika, neki mikroorganizmi oksidiraju amonijak i sumpor otpuštaju i H^+ ion dok pod anaerobnim uvjetima proizvode organske kiseline.

Abiotski imbenici tla su također važni za mikrobiološku aktivnost.

Treba uzeti u obzir vodni potencijal ija se važnost očituje u tome što utječe na razmjenu plinova i razne kemijske reakcije u tlu kao što je hidroliza. Bez vode nema mikrobiološke aktivnosti. Mikroorganizmi reagiraju na vodni stres na način da organizmi u kojima nema vode u tlu također ograničavaju kretanja mikroorganizama u tlu.

Nadalje treba se osvrnuti na aeraciju tla, odnosno stupanj opskrbljenosti tla kisikom. Korjenu je potrebna dovoljna količina kisika za respiraciju, jednako kao aerobnim mikroorganizmima. U tlu se također nalaze fakultativno anaerobni mikroorganizmi koji mogu opstati u uvjetima sa ili bez kisika te obligatni anaerobi koje možemo naći isključivo u dubljim slojevima tla u kojima kisik nije prisutan.

Od abiotskih imbenika važna je i temperatura tla budući da direktno utječe na velik broj fizikalnih i kemijskih procesa u tlu te na brzinu kojom se odvijaju, pri čemu je općenito poznato da se brzina kemijskih reakcija udvostručuje za svako povećanje temperature od $10^{\circ}C$. Svi ovi parametri važni su za uspostavljanje flegljene mikrobne populacije i za održavanje vijabilnog broja mikroorganizama i njihovih spora u tlu.

2.2. Rasprostranjenost gljiva u tlu

Gljivine jedno od carstava u domeni eukariota sa izuzetno raznolikim načinima reprodukcije i životnim ciklusima, te se pretpostavlja da sadrži više od milijun vrsta, od kojih je znanstveno opisano približno 70 000. Možemo ih kategorizirati na parazite, saprofitne, endofite i mikorizne gljive ovisno o tome na koji način dolaze do hraniva, međutim uvijek postoje iznimke. Nalazimo ih na velikoj većini organskih supstrata pri čemu služe kao izvor hrane raznim životinjama, kao saprofiti, imaju značajnu ulogu u agregaciji tla, a neke od njih mogu biti patogene. Granaju se kroz veliki volumen tla putem micelija koji ima neodređeni rast - na taj su način sposobne iskoristivati hraniva iz velikog volumena tla. Spore se stvaraju spolno, nesporno ili na oba načina. Spore ne samo da sadrže roditeljsku jezgru novog genotipa (kroz rekombinaciju, mutaciju ili paraseksualizam) već služe kao strukture za fazu mirovanja i funkcioniraju kao mehanizam daljnjeg širenja gljive (Sylvia i sur., 2005).

Kao eukariotski organizmi imaju organele koje su relativno slične onima kakve nalazimo kod biljaka i životinja, pri čemu su razlike vidljive u vakuolama i u endoplazmatskom retikulumu;

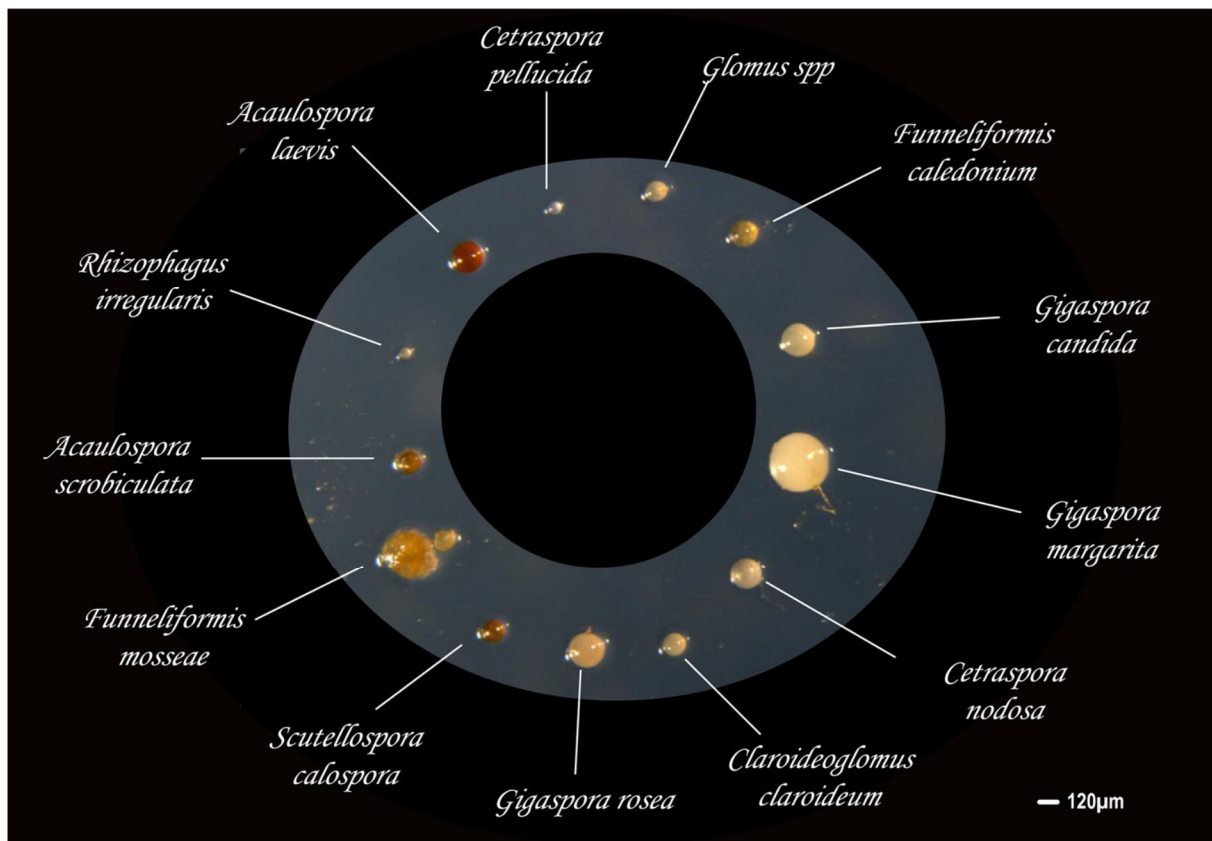
i iako ne sadrže klorofile, i dalje posjeduju sličnosti sa biljkama u tome –to su slabo pokretne i imaju stanične stijenke, međutim morfološki su ipak sličnije gljivama nego biljkama.

2.3. Širenje gljiva u tlu

Gljive se šire micelijem kako bi se kružno širile u tlu, pri čemu se hifa, odnosno micelarna nit, grana kroz pore tla u svim smjerovima te na taj način omogućava gljivi da zaobilazi ona područja u tlu koja nisu bogata hranivima. Svojom širenjem, gljiva direktno utječe na strukturu tla na način da ga rahli. Po svojoj građi hifa je dugačak cijev iznutra pregrađen septama ili pregradama.

Mnoge gljive u tlu iz redova *Ascomycota* i *Basidiomycota* mogu organizirati hife u specijalizirane organe kao –to su micelarne niti, rizomorfi i sklerocij. Micelarne niti su u suštini paralelne hife međusobno uvršene pomoću ljepljivih eksudata. Takve su niti uglavnom u bliskom kontaktu sa tlom kako bi došle do vlage za translokaciju uz rastu i rub micelija dok prodiru u drvenasta tkiva.

Rizomorfi su definirani kao nešto kompleksnije verzije micelarnih niti sa nešto većim stupnjem diferencijacije tkiva; vrlo su otporni na okolišne promjene, omogućuju jače sredstvo za penetraciju zemlje i organskog materijala nego hife, opskrbljuju vrhove hifa kisikom te transportiraju hraniva kroz organizam gljive. U tlu se granaju čak osam puta brže nego tipični micelij i tamo opstaju godinama. Njihova se važnost vidljiva je time –to se neuspjeh mnogih voćnjaka podignutih na područjima oštećenim od –uma pripisuje upravo obilju gljiva i rizomorfni mreža u tlu čak i nakon primjene fumigacije, iz čega je vidljiv značaj i potencijal ovih organa (Sylvia i sur., 2005).



Slika 2.1 Spore različitih vrsta gljiva
(Izvor: Trouvelot i sur., 2015)

Sklerocij je pak sferi ni, o vrsnuli micelij koji se sastoji od isprepletenih hifa a u svojem je sredi-tu sli an biljnom parenhimskom tkivu, me utim izvana tvori tvrdu koru unutar koje se nalazi debela stijenka i slufli kao spremnik hraniva za preflivljavanje u manje povoljnim uvjetima. Sklerocij se lak-e raspr-uje od drugih micelarnih agregata time -to je odvojen od roditelja micelija te zbog svoje tvrde vanjske kore ima bolju otpornost na su-u i temperaturne fluktuacije -to ga ini i dugovje nijim od micelija. Njegova uloga je tako er pohrana lipida, ugljikohidrata i proteina sve dok se uvjeti u tlu ne pokaflu povoljnima za razmnoflavanje, nakon ega se tvori ili novo reproduktivno tijelo, ili novi micelij.

Razmnoflavanje gljiva moffe biti putem formiranja reproduktivnih tijela, kao -to su spore, i to seksualno ili aseksualno (Slika 2.1). Pritom spore u sebi sadrfe razne faktore koji se aktiviraju pod razli itim uvjetima stresa i na taj na in pove avaju vjerojatnost seksualne reprodukcije.

2.4. Hranidbeni obrasci i mehanizmi preživljavanja gljiva

Kao heterotrofni organizmi gljive nalaze hraniva iz organske tvari u okolišu. Obzirom na različite tipove gljiva i njihovu različitu morfologiju, i hranidbeni obrasci se razlikuju. Tako saprofiti, odnosno gljive koje razlažu mrtvu organsku tvar, rastu u aerobnim uvjetima i izuzeto su važni za proces mineralizacije tla. Kod hifa i kvasaca, hraniva se usvajaju kroz stanične stijenke. Gljive su sposobne tražiti i usvajati hraniva čak i onda kada ona nisu ravnomjerno raspoređena u tlu. To je moguće zahvaljujući micelijima, odnosno načinu na koji je micelij građena. Budući da je micelij po svojoj strukturi nitast, a hife se mogu granati u svim smjerovima, gljiva time ima sposobnost tražiti hraniva u tlu tako da zaobilazi područja siromašna hranivima, da zaobilazi razne barijere i područja ispunjena plinovima i time dolazi do bogatijih dijelova tla.

Gljiva je sposobna translocirati usvojena hraniva u one dijelove svojeg organizma gdje su ta hraniva najpotrebnija, a sve u svrhu omogućavanja kontinuiranog rasta i razmnožavanja. Kada se nedostatak hraniva proširi na veće područje, gljive često preživljavaju tako da pohranjuju dostupna hraniva u spore i onda ih raspršuju u povoljnija područja.

U ovom je radu naglasak na gljive koje formiraju specijalizirane asocijacije sa drugim živim organizmima i na taj način usvajaju potrebna hraniva. Riječ je o biotropnom tipu odnosa, koji dolazi od grčke riječi *bios* = život i *trophy* = hranjenje, pri čemu gljiva i biljka dolaze u uspostavljaju bliske kontakte putem specijaliziranih struktura, pritom uzrokujući promjene u biljci domaćinu. Vrijeme trajanja takvog odnosa, odnosno kontakta, ovisi o okolišnim uvjetima te fiziologiji dvaju simbionata.

Budući da gljive nisu sposobne daleko se niti brzo pomicati, poput biljaka, oslanjaju se na druge mehanizme preživljavanja kao što je razmnožavanje sporama, kako bi osigurale nastavak vrste čak i u nepovoljnim okolišnim uvjetima. Gljiva proizvodi spore, odnosno organe obavijene debelom stijenkom koja ih štiti od nepovoljnih okolišnih uvjeta. U takvim slučajevima, kada je iz nekog razloga ograničen rast, gljiva je potaknuta na sporulaciju kako bi osigurala dalekosefno raspršivanje. Spora je tada u fazi mirovanja sve dok se okolišni uvjeti ne promijene i dok ne postanu povoljni za klijanje. Sve gljive ne sporuliraju, primjerice u slučajevima kada gljiva tvori takav odnos sa domaćinom da za sporulacijom nema potrebe jer ju biljka domaćin štiti od nepovoljnih uvjeta.

Prema Stametsu (2005) gljive bi mogle biti ključne za zdravlje životinja, što zbog nezamjenjive uloge u recikliranju organske tvari, što zbog činjenice da drveće i mnoge druge

zelene biljke ne bi mogle rasti i doseći zrelost bez simbioznih asocijacija sa gljivama, o kakvima je riječ u ovom radu. Ove asocijacije pokazuju neizmjeran potencijal ne samo u poljoprivrednoj proizvodnji već za ekologiju, za biodiverzitet i rješavanje pitanja zagađenja okoliša i poboljšanja svojstava tla.

3. Mikorizne asocijacije

Termin šmikorizne asocijacijeō odnosi se na simbiozne odnose izme u gljiva i korjenovog sustava vi-ih biljaka. Prevedeno, šmikorizaō zna i šgljivi no korjenjeō (Subba Rao, 1999) pri emu simbiozni odnos podrazumijeva zajedni ki suffivot izme u dvaju (u nekim slu ajevima i vi-e) razli itih organizama u kojemu i jedan i drugi lan ima korist. Termin šsymbiotismusō (simbioza) prvi je put upotrijebio Albert Bernhard Frank (Smith i Read, 1996) i opisao ju kao neutralni termin koji se razlikuje od parazitizma, odnosno odnosa u kojemu jedan sudionik ima korist na -tetu drugoga, ve se temelji na ranije opisanom suffivotu dvaju me usobno razli itih organizama. Primjerice, simbioza gljive i alge kod li-ajeva. Kod takvih mutualisti kih simbioza, oba simbionta imaju korist jedan od drugoga.



Slika 3.1 Mikoriza
(Izvor: <http://www.motheearthnews.com>)

Nedavna istraffivanja mikoriza ukazala su na nevjerojatnu raznolikost u strukturi, razvoju i funkciji unutar pojedinih tipova mikoriza, te da je za samu mikoriznu asocijaciju vaflan soj gljive i vrsta biljke doma ina.

Mikorize su dakle simbiozni odnosi u kojima gljive koloniziraju kortikalno tkivo korjena biljke doma ina tokom perioda aktivnog rasta biljke (Slika 3.1), me utim ove asocijacije

esto znaju zahvati i druge podzemne organe biljke (Subba Rao, 1999). Najjednostavnije reeno, ova asocijacija funkcionira na način da gljiva od biljke dobiva organski C, a gljiva s druge strane prikuplja hraniva za biljku, što ukazuje na vrlo direktnu agronomsku korist u kontekstu rasta i prinosa ali i u kontekstu poboljšane biljne reproduktivne sposobnosti.

Smatra se da su upravo mikorize, a ne korjenje, glavni organ za usvajanje hraniva kod kopnenih biljaka čak su i najranije kopnene biljke koje nisu imale pravo korjenje, bile kolonizirane hifama gljiva koje su tvorile vezikule i arbuskule slične onima kakve nalazimo i danas. Smith i Read (1996) također navode brojne fosilne nalaze stare između 410 i 440 milijuna godina, koji ukazuju na simbiozne odnose između biljaka i gljiva iz roda *Glomus*.

Nedavna ispitivanja utvrdila su postojanje arbuskularnih mikoriza ili mikoriza gljiva iz roda *Glomus* sa izumrlom biljkom *Aglaophyton major*, naime u škotskom rofnjaku, odnosno silicijskoj sedimentnoj stijeni, što dokazuje postojanje arbuskularnih mikoriza u doba ranog devona (Smith i Read, 1996). Takvi fosilni nalazi upućuju da je upravo zahvaljujući i mikoriznim asocijacijama došlo do kolonizacije kopna, iz čega se može sa sigurnošću utvrditi da je važnost mikoriznih asocijacija neprocjenjiva ne samo u agronomskom već i u ekološkom kontekstu i u kontekstu biodiverzitetnosti.

Bilo da korist mikoriznih asocijacija promatramo iz ekološkog ili agronomskog gledišta, u oba slučaja korist proizlazi iz kritične veze, koju mikorizna gljiva tvori između biljnog korijena i tla (Sylvia i sur., 2005). Budući da gljive imaju sposobnost prikupljati hraniva iz otopine tla na područjima do kojih biljni korijen ne dopire, hife koje se šire u tlu povećavaju efektivnu upijaju u površinu biljke. Samim time gljiva biljci omogućava usvajanje hraniva i u slučajevima kada tlo nije bogato hranivima ili vodom. Na taj način biljci omogućava rast i reprodukciju u uvjetima u kojima biljka to ne bi mogla samostalno, ili ne bi mogla jednako učinkovito sama usvajati hraniva, što dalje vodi ka poboljšanom rastu i razvoju u nepovoljnim uvjetima za biljku. Iz toga je vidljivo da gljiva poboljšava kompetitivnost biljke i čini ju otpornijom na okolišne stresove u odnosu na biljke koje nisu mikorizirane.

Prema Paulu i Clarku (1998), odnos između gljiva i finih korjenovih dlačica, kakve posjeduju trave, i mikoriza je uglavnom negativan. Vrste koje posjeduju fino korjenje sa brojnim korjenovim dlačicama nisu toliko ovisne o svojim mikoriznim gljivama za usvajanje hraniva, na način na koji su ovisne leguminoze ili vrste sa grubljim korjenjem poput naranči. Zajednički faktor takvih biljaka koje tvore mikorize je njihova sposobnost da utječu na potencijalnu patogenost

gljive s kojom tvore mikorizu. Primjerice, gljive *Rhizoctonia* su patogeni kukuruza, ali zato tvore stabilne mikorize sa orhidejama.

Najosnovnija podjela mikoriza je na ektomikorize i endomikorize, ovisno o tome na koji način hife gljiva dolaze u kontakt sa korjenom biljke. Najjednostavnije rečeno ektomikorizne gljive ne prodiru u stanice korjena dok endomikorizne gljive prodiru u samu stanicu. Pritom često dolazi do formiranja specifičnih organa, odnosno struktura koje služe za izmjenu hranjivih tvari sa biljkom. Također razlikujemo i ektendomikorizu, koja se odnosi na slučajevima kada hifa ektomikoriznih gljivica ponekad ipak ulazi u biljnu stanicu. Kada je obrambeni mehanizam višeg simbionta smanjen, kao što je to kod starog ili bolesnog drveta, neki simbiot može postati endotropan. Takvi primjeri se nazivaju ektoendotropne mikorize ili ektendomikorize.

Također je poznat i naziv pseudomikorize, koji se odnosi na tanko i dugačko korjenje inficirano gljivama. Gljive su intracelularne u takvog korjenja i teško je definirati da li gljive postoje u ektendomikorizama kao paraziti ili simbioziti (Subba Rao, 1999). Ovaj navod podupiru Smith i Read (1996) te tvrde da je većina ektomikoriznih gljiva sposobna formirati intracelularne veze u starijim dijelovima korjena ili u slučajevima kada je iz nekog razloga poremećena ravnoteža hraniva u takvim okolnostima zabilježeno je da se gljiva ponekad blago patogeno, međutim naziv pseudomikoriza je nedovoljno precizan pa korištenje takvog termina nema dovoljno jako uporište.

Kod takvih slučajeva kada dolazi do ulaska gljive u zdravu korjenovu stanicu hifa može potjecati ili iz Hartigove mreže ili iz hifa koje tvore omotač oko korjena. Neke gljive, kao primjerice *Wilcoxina mikolae* imaju sposobnost diferencirati između ektomikoriza i ektendomikoriza, pa tako u asocijacijama sa biljkama iz rodova *Pinus* ili *Larix* tvore ektendomikorize dok sa biljkama rodova *Abies*, *Picea* i *Tsuga* tvore ektomikorize (Smith i Read, 1996).

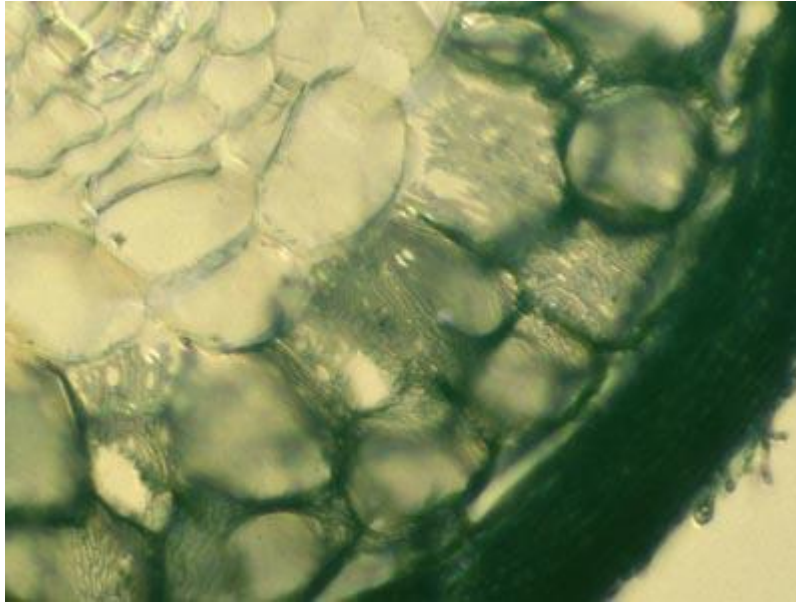
4. Ektomikoriza

Ektomikorize su simbiozni odnosi u kojima hifa gljive dolazi u kontakt sa korjenom biljke me utim ne ulazi u njezin unutarstani ni prostor. Sastoje se od triju strukturalnih komponenti: vanjskog omota a koji se formira oko korjena, labirinta hifa koje rastu prema epidermalnim i kortikalnim stanicama koje se zovu Hartigova mreža (Slika 4.1) i od vanjskog sustava koji se sastoji od hifa, a koji tvori esencijalne veze sa tlo i gljivama koje tvore ektomikorize. Interesantna stvar kod ektomikoriza je da se primjenom uree može inducirati razvijanje sporokarpa (Imamura i Yumoto, 2007). Plak, tj. omota koji hife gljiva formiraju na vrhu korjena povezan je sa hifama okolnih biljnih stanica u kori korjena te se dalje u tlu grana u ekstenzivan micelij i -iri se u potrazi za hranivima. Ektomikorize se sastoje od stanica gljiva koje nastanjuju korjenje drve a i grmlja iz umjerenog pojasa (Paul i Clark 1998).

4.1. Morfologija ektomikoriza

Kod ektomikoriznih asocijacija morfologija korjena biljke je nešto drugačija, pa tako korjen na sebi ne sadrži korjenove dlake već je prekriven hifama gljive i taj se sloj naziva pseudoparenhimski omota te on posve prekriva upijaju i dio korjena (Subba Rao (1999). Omota povećava upijaju u površinu korjena i esto utječe na njegovu morfologiju što rezultira raširanjem i grupiranjem - ovaj tip organa ima jasnu razliku između ektomikoriza i ostalih tipova mikoriza upravo zato što ne dolazi do intracelularnog prodiranja od strane gljive (Smith i Read, 1996). esto se niti hifa združuju i tvore rizomorfe, vidljive golim okom, čiji unutrašnji dio diferencira u gomoljaste strukture koje se specijaliziraju za dalekosefne transporte hraniva i vode (Sylvia i sur., 2005).

Dolazi do stvaranja Hartigove mreže, hifa ulazi u korteks korjena i tamo ostaje u vanjskim kortikalnim stanicama tvore i mrežu. Mehanizam translokacije hraniva je takav da gljiva usvaja hraniva putem pseudoparenhimskog omota a i zatim, sluje i se Hartigovom mrežom kao posredni tkivom, dalje translocira hraniva u korjen.



Slika 4.1. Strukturalni detalji Hartigove mreže kod ektomikorize
(Izvor: <https://mycorrhizas.info/method.html>)

Kod ovog tipa asocijacija biljka je sposobna rasti i bez prisustva gljivi nog simbionta ukoliko su hraniva dostupna, međutim uspostava mikorize je i dalje nužna u slučajevima kada glavna hraniva, dušik i fosfor, ne nalazimo u dostatnoj količini. U slučajevima kada želimo introducirati sadnice u područja na kojima prethodno nije bilo mikoriza, nužna je inokulacija tla mikoriznim gljivama (Subba Rao, 1999). Velik broj značajnih ektomikoriznih gljiva može se uzgajati bez prisustva biljke domaćina, što omogućava proizvodnju inokuluma. Inokulacija mikoriznom gljivom, primjerice *Pisolithus tinctoris* i *Telephora terrestris* može značajno pojačati rast bora, naročito na područjima koja ne sadrže odgovarajuća hraniva te koja su zasićena toksičnim metalima što se smatra se da ove gljive povećavaju apsorpciju hraniva i da proizvode antibiotike te da stvaraju fizičku barijeru protiv korjenovih patogena kao što su *Pythium*, *Rhizoctonia* i *Phytophthora*. Dokazano je da gljiva može translocirati hraniva iz jedne biljke u drugu, pa je tako glukoza ubrizgana u sadnicu bora translocirana na udaljenost od gotovo 2m u tkivo susjedne biljke (Paul i Clark, 1998).

4.2. Biljke domaćini

Smatra se da otprilike 10% biljnih porodica formira ektomikorize te da se mahom radi o drvenastim biljkama iz porodica *Betulaceae*, *Myrtaceae*, *Rosaceae*, *Pinaceae*, *Dipterocarpaceae* i *Fagaceae* koje formiraju asocijacije sa gljivama iz redova *Ascomycota*, *Basidiomycota* i *Zygomycota*. Smith i Read (1996) potvrđuju navedeno i tvrde da su gotovo

sve biljke na kojima se pronalaze ektomikorizne gljive upravo drvenaste višegodišnje biljke. Mehanizmi međusobnog biranja gljive i biljke drugačiji su različitosti, pa tako na jednoj biljci drugačijom možemo naći više različitih gljiva, primjerice na običnom boru najčešće je korjenu izolirano čak 40 vrsta gljiva. Gljiva *Pisolithus arbizus* tvori ektomikorize sa više od 46 drvenih vrsta iz najmanje 8 rodova (Sylvia i sur. 2005). S druge strane, neke vrste gljiva kao što su gljive iz rodova *Leccinum* i *Suillus* stvaraju simbiozne odnose samo sa jednim rodom biljaka dok primjerice gljive iz roda *Amanita* imaju sposobnost stvarati mikorizne odnose sa velikim brojem biljaka drugačijih. Gljive iz porodica *Agaricaceae*, *Boletaceae*, *Russulaceae* i *Cortinariaceae* tvore ekstenzivne mikorize i proizvode jestive podzemne i nadzemne organe. Smith i Read (1996) navode čak 65 rodova biljaka koji sadrže barem jednu vrstu koja dokazano tvori ektomikorizne asocijacije, iz čak 14 porodica i podporodica. Ektomikorizne asocijacije možemo pronaći u umjerenom i subtropskom pojasu južne hemisfere, u tropima jugoistočne Azije gdje su najvažnije porodice monsunskih kišnica gotovo isključivo ektomikorizni simbionti. Obzirom na ovakvu geografsku rasprostranjenost, neizmjerljivost i značaj ovog tipa mikoriznih asocijacija na globalnoj razini je neosporan.

4.3. Tijek formiranja ektomikoriza

U prirodi, novi korjenovi izdanci mogu biti kolonizirani ektomikoriznim gljivama koje potječu ili iz Hartigove mreže ili iz omotača, međutim novo korjenje koje raste iz dijelova korjenovog sustava na kojima nije prisutna mikoriza, mogu kolonizirati posve druge gljive pomoću propagula otprije prisutnih u tlu. U takvom slučaju proces uspostavljanja mikorize ovisi o prepoznavanju, kompatibilnosti i inokulumskom potencijalu gljive. Ranije navedena mikorizna raznolikost u vidu zahtjeva gljiva prema biljci drugačijom i obratno, pa čak i na primjeru jedne biljke, jasan je pokazatelj kompleksnosti događaja koji prethode kolonizaciji. Biljni korjen otpušta kemijske spojeve u okolno tlo i takve kemijske spojeve nazivamo korjenovi eksudati. Veća koncentracija mikrobne populacije u rizosferi u odnosu na okolno tlo ukazuje da mikroorganizmi tla koriste ove korjenove spojeve kao izvor hraniva. Izazov je utvrditi koji, ako je ijedan, u širokom spektru kemijskih spojeva koji su dosada identificirani, dovoljno specifičan u privlačenju potencijalnih mikoriznih partnera. Moguće je da su specifični korjenovi eksudati uključeni u ektomikorizno privlačenje, na što ukazuju pokusi u kojima su korišteni kompatibilni i inkompatibilni izolati mikoriznih gljiva *Pisolithus tinctorius* i *Paxillus involutus*.

Poznato je da biljni hormon IAA može utjecati na grananje i rast hifa, međutim i dalje je malo navoda koji ukazuju na ikakvu specifičnost. Unatoč tome, korjenovi eksudati mogu stimulirati klijanje spora kod ektomikoriznih gljiva, no često se isti u inak može dobiti korištenjem korjena biljaka koji inače nisu domašini (Smith i Read, 1996).

Dokazano je da se brzina i opseg formiranja mikoriza može pojačati pod nekim uvjetima radi prisustva bakterija koje potpomažu mikorizama, što ukazuje na mogućnost da ključne kemijske spojeve za mikorizu otpuštaju i drugi organizmi osim same mikorizne gljive, u situaciji koja se stoga naziva mikorizosfera. Prisustvo bakterija koje potpomažu mikorizama prvi su put zabilježili Bowen i Theodorou (Tarkka i Frey-Klett, 2008) pri čemu je dokazano da prisustvo nekih bakterijskih izolata potiče, dok prisustvo drugih inhibira kolonizaciju korjena kalifornijskog bora *Pinus radiata* od strane gljive *Rhizopogon luteolus*.

Nakon inicijalnog privlačenja mikoriznih gljiva, čini se da su hife gljiva, stupaju i u inicijalni kontakt sa korjenom, sposobne mijenjati smjer svojeg rasta. Tome ponekad slijede morfološke promjene koje prethode formiranju Hartigove mreže a uključuju grananje hifinih vrškova. U istraživanju provedenom na jahi *Alnus crispa* sa gljivom *Alpova diplophoeus* (Smith i Read, 1996) utvrđeno je da se uspostavljanje mikoriza odvija unutar 2 do 4 dana od inicijalnog kontakta sa hifama gljiva. Pritom gljiva prvotno dolazi u kontakt sa vrškom korjena, od kuda se čire njegovom dužinom i unutar 24-48 sati dolazi do oticanja korjena. Tanki omotači počinju se formirati na lateralnom korjenu kroz 12-24h od inicijalnog kontakta. Područje početnog kontakta je ključno u uspostavljanju funkcionalne mikorize budući da se u ovom području hife iz omotača penetriraju korjen i počinju stvarati Hartigovu mrežu. U nekim slučajevima ovo se može odvijati i prije nego je omotač posve formiran oko korjena.

5. Arbuskularna mikoriza

Arbuskularne mikorize se tako nazivaju radi svoje specifične morfologije, a spadaju pod endomikorizne asocijacije, što znači da gljiva tvori organe unutar stanice korijena biljke domaćina. Arbuskularne mikorize, ili ponekad ovisno o literaturi vezikularno-arbuskularne mikorize, smatraju se najčešćim mikoriznim oblicima i ne stvaraju nikakve vidljive vanjske strukturalne promjene na korjenu biljke. Hife ovakvih mikoriza prodiru u korjenove stanice i to kod gotovo svih kultiviranih biljaka, kod većine cvjetnica, papratnjača i mahovina te mnogog drugog vršnog drveća, grmlja i divljih vrsta (Paul i Clark, 1999), dok su odsutne kod biljaka koje tvore samo ektomikorize, dakle kod biljaka iz porodica *Pinaceae* i *Betulaceae* ili kod biljaka koje tvore erikoidne mikorize (Subba Rao, 1999).

Kod ovih asocijacija dolazi do formiranja unutarnjih organa, odnosno vezikula koje imaju spremničku funkciju, i arbuskula, druge strukture unutar korteksa korijena. Arbuskule (Slika 5.1) su organi koje gljiva formira u korteksu korijena a koje se formiraju od fino razgranatih hifa koje ponešto nalikuju na haustorije prisutne kod nekih biljnih patogena. Ovi organi gljiva opstaju unutar biljne stanice između 4 i 10 dana te da nakon isteka njihovog životnog vijeka, biljna stanica ih probavlja te dolazi do formacije novih arbuskula u drugim biljnim stanicama.

Vezikule imaju tanke stijenke i ispunjene su lipidima koji se najčešće stvaraju u intercelularnim prostorima. Iako im je primarna funkcija skladištenje, one također mogu poslužiti i kao produktivne propagule. Osim vezikula i arbuskula, dolazi do formiranja sporednih stanica i aseksualnih spora (Sylvia i sur., 2005). Pomoćne stanice se stvaraju u tlu kao koraste ili namotane strukture te njihova uloga nije razjašnjena. Aseksualne spore se s druge strane formiraju ili u korjenu ili u tlu, i to diferencijacijom vegetativnih hifa. Moguće je da se kod nekih gljiva spore formiraju sekundarnim zadebljanjem vezikula, nakon čega se tvori pregrada koja vodi stvaranju spora, međutim prvi mehanizam je puno češći.

Arbuskularne gljive su obligatni simbionti i nije ih moguće izolirati na istoj kulturi već ih je jedino moguće uzgajati na živim inokuliranim biljkama, pri čemu biomasa korijena biljke na kojoj postoji značajna kolonija specifične arbuskularne gljive služi kao izvor inokuluma za daljnju kolonizaciju. Specifičnost između dvaju partnera u ovoj simbiozi nije dovoljno dobro utvrđena moguće je relativno jednostavno postići krifnu inokulaciju sa nekim drugim domaćinom.

Gljiva u početnom stadiju kolonizacije raste između biljnih stanica, međutim vrlo uskoro dolazi do penetracije stanične stijenke nakon čega se rast nastavlja unutar biljne stanice. Pritom i gljivice i biljna stanica na stijenku ostaju intaktni te tokom rasta gljivice membrana biljne stanice se omotava oko gljivice te dolazi do formiranja novog odjeljka gdje se skladišti molekularni složen materijal.

Ovakav mehanizam sprječava direktni kontakt između gljivice i biljne citoplazme pa je moguć u inkubitiviji prijenos hraniva u apoplastu.

Prijenos hraniva između biljke i gljivice odvija se između fino razgranatog micelij i stanične membrana biljke. Kod arbuskularne stanice je debljina biljnog citoplazmatskog materijala 20 puta veća nego u neinficiranoj stanici. Vanjske strukture kod ovih mikoriza su hife koje se granaju kroz tlo te kladospore, individualne spore koje su u stadiju mirovanja a formiraju se nespolnim putem. Nekada se za takve strukture u formativnom stadiju koje se nalaze na eksterijeru mikorize smatralo da su vezikule, međutim danas se zna da se radi o kladiosporama.

5.1. Gljive koje tvore arbuskularne mikorize

Gljive koje sudjeluju u arbuskularnim mikorizama su gotovo uvijek iz reda *Glomales*. Dalje se taksonomija dijeli ovisno o tome da li su u korjenu prisutne vezikule i jesu li kladiospore, odnosno aseksualne spore, formirane, te ovisno o tome da li su vezikule u korjenu odsutne i da li je došlo do formacije pomoćnih stanica i azigospora, odnosno sporama koje se nespolno razvijaju iz hifa gljiva i uzrokuju gomoljaste izrasline (Sylvia i sur., 2005).

Prisustvo arbuskularnih mikoriza nije moguće utvrditi golim okom. Za uspješnu identifikaciju i potvrđivanje prisustva mikorize nužno je da iskusna osoba, dobro upoznata sa strukturom, veličinom i izgledom stijenke spora, promotri veličinu i broj spora pod mikroskopom. Kod ovih mikoriza veličina pojedinačnih spora može biti između 10 i 400 μm u promjeru, ali najčešće je to između 10 i 200 μm. Također treba slomiti spore kako bi se pregledala struktura stijenke. Poznato je da pet rodova sudjeluje u arbuskularnim mikorizama, a to su *Glomus*, *Gigaspora*, *Acaulospora*, *Sclerocystis* i *Scutellospora* a identifikacija se vrši pregledom morfološke spora u stadiju mirovanja. Razlika između navedenih rodova ogleda se u tome što se kod rodova *Gigaspora* i *Acaulospora* klijanje odvija kroz stijenke spora, dok su rodovi *Glomus* i *Sclerocystis* karakteristični po tome da do klijanja dolazi iz novog rasta pri rastućim hifama.

Do stadija mirovanja tipično dolazi ukoliko klijaju i spore rastu i hifa ne dođu u kontakt sa prikladnim korjenom biljke domaćina. U tom slučaju dolazi do zastoja u rastu i spora kreću u mirovanje. Većina mikologa se slaže da je smjer rasta hifa nasumičan te zasada nije potvrđeno da dolazi do ikakve poruke biljnog korjenja klijajućoj spori kako bi se ustanovio smjer rasta hifa, sve dok hifa već nije u neposrednoj blizini (nekoliko mm) od korjena. Zatim hifa kreću u proizvodnju kompleksnih, lepezastih grana te dolazi do infekcije korjena (Paul i Clark, 1998).

5.2. Biljke domaćini

Arbuskularne imaju širok spektar potencijalnih domaćina tako da preferiraju biljne zajednice sa velikom raznolikosti vrsta. Prisutne su u gotovo svim redovima biljaka te su gotovo jednako česte i kod monokotiledona i dikotiledona.

Trappe (Smith i Read, 1996) navodi da je samo 3% vrsta istraffeno te da su naša saznanja o mikoriznom statusu nekih rodova u najmanju ruku neiscrpana. Može se reći da okvirno 95% današnjih biljnih vrsta pripada porodicama koje tvore mikorize, no to ne znači da je jednaki postotak vrsta mikorizan, budući da sve vrste određenih porodica ne tvore mikorizne asocijacije. U svakom slučaju, ono što se može reći sa sigurnošću jest da što se više istraffivanja provodi i što se više biljnih vrsta ispituje, proporcionalno raste i broj biljnih vrsta za koje se ispostavlja da tvore mikorizne asocijacije.

Unatoč tomu što najranije kopnene biljke nisu posjedovale pravo korjenje, na rizomima biljaka *Agalophyton* i *Asteroxylon* su pronađene mikorizne gljive koje su tvorile arbuskule, intercelularne hife i vezikule slične onima kakve tvore današnji pripadnici roda *Glomales*. Mnogo je fosilnih nalaza koji potvrđuju postojanje arbuskularnih mikoriza, od kojih su neki stari čak 410 do 440 milijuna godina.

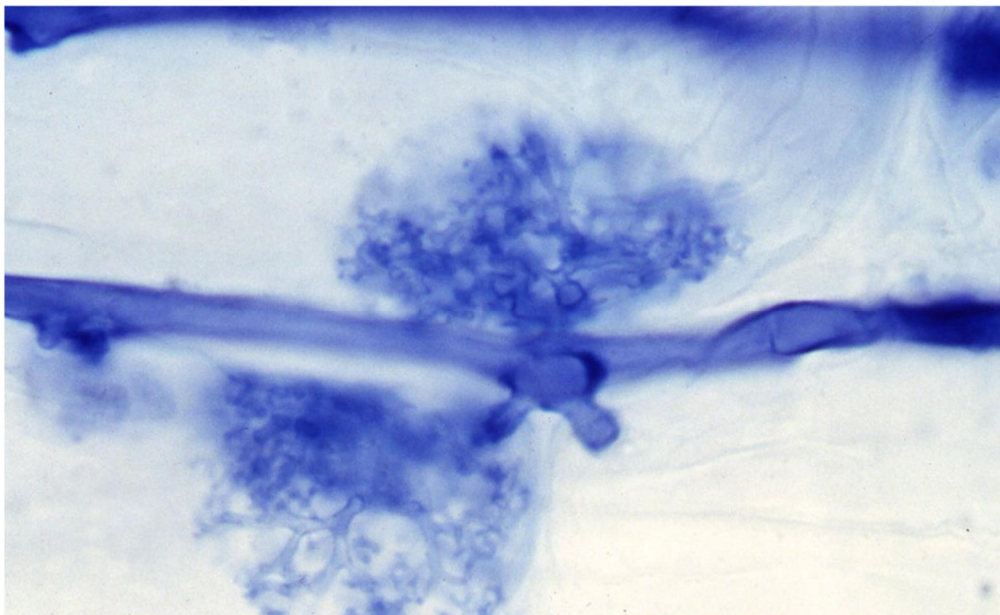
5.3. Morfologija i anatomija arbuskularnih gljiva

Smith i Read (1996) opisuju dva morfološko-anatomska tipa arbuskularnih mikoriza a to su Arum i Paris tip mikoriza.

Paris tip kolonizacije karakterističan je po tome što se intracelularni namotaji hifa razvijaju poprimili ekstenzivno, na način da se direktno šire iz jedne u drugu stanicu unutar korteksa. Stanici ni rast, ukoliko ga ima, je malen, a arbuskule rastu iz navedenih namotaja.

Kod ovog tipa mikoriza brzina razvoja infekcije unutar korjena nije naročito brza u usporedbi s Arum-tipom, te nije poznato koliko je ovo est tip mikoriza. Ovaj tip mikoriza prisutan kod velikog broja –umskih biljaka.

Arum tip kolonizacije je ono –to emo danas prepoznati kao tipične arbuskularne mikorize. Autori također navode da je kod ovog tipa mikoriza est brzorastu i korjenov sustav kod usjeva te da je za ovaj tip karakteristično da se putem intercelularnih hifa, koje se protežu kroz zračne prostore u stani, gljiva brzo –iri korteksom. Hifa proizvodi kratke, postrane grane, dolazi do ulaska u kortikalne stanice te dolazi do formiranja arbuskula.



*Slika 5.1. Obojen korjen Vitis vinifere na kojemu je vidljiva arbuskula, specijalizirana intracelularna struktura koju formira grananje gljivičnih hifa koje penetriraju kortikalne stanice korjena, ujedno glavno mjesto recipročne izmjene hraniva između dvaju simbionata
(Izvor: Trouvelot i sur., 2015.)*

5.4. Tijek kolonizacije

Za kolonizaciju korjenovog sustava bitan je razvoj i korjena i gljive –to cijeli proces ini dinami nim. Za vrijeme apikalnog rasta korjena putem diobe stanica, elongacije i diferencijacije dolazi do razvoja lateralnih korjenika a dok istovremeno gljiva proizvodi primarne i sekundarne strukture koje inficiraju korjen a ija brzina rasta direktno utje e na infekciju.

Korjen mođe do i u kontakt sa gljivom putem spora (koje posjeduju –irok spektar metoda raspr–ivanja, primjerice putem vode ili zraka), zarađenih djela a korjena ili putem hifa odnosno propagula. U tlu nalazimo na spore razli itih oblika i veli ine i naravno u razli itim

stadijima mirovanja ó na taj na in osigurava se konstantan izvor inokuluma u tlu. Iako se godinama smatralo da su spore najvafniji izvor infekcije, pokazalo se da spore nisu nufno vafne u najranijim stadijima kolonizacije korjenovog sustava.

Ispostavilo se da su, unato tome –to su spore najbolji izvor inokuluma, zapravo prethodno zarafeni djeli i korjena i ekstenzivne hifne mreffe glavno sredstvo kolonizacije biljaka ak i onda kada je prisutna vi–e nego dostatna populacija spora u tlu.

Nakon –to se gljiva probije kroz vanjski zid epidermalnih stanica nakon dva do tri dana dolazi do stvaranja apresorija, –to ukazuje na to da je gljiva prepoznala biljku kao doma ina te dolazi do suflavanja hife gljiva kako bi se formirala infekcijska klica. Za stupanje u kontakt sa biljkom doma inom odgovorne su hife velikog promjera koje se probijaju kroz epidermalne stanice biljke. U ovom stadiju gljiva po inje lokalizirano izlu ivati hidrolitske enzime koji degradiraju stijenku te istovremeno vr–ak hife vr–i hidrostatski pritisak na stanicu. U ovoj fazi biljka doma in prepoznaje gljivu, –to je vidljivo iz odebljanja epidermalne stijenke koja se nalazi uz penetriraju u hifu. Mnogi autori dokazali su da dolazi do promjena u strukturi biljnih lamela kada hife do u u intercelularni prostor te je dokazano djelovanje gljivi nog enzima pektinaze (Smith i Read, 1996).

Nakon formiranja apresorija slijedi grananje hifa te one ulaze u sredi–nji i unutra–nji dio korteksa biljke i zatim nastavljaju svoj rast u me ustani nom prostoru. Grane hifa omogu uju rast arbuskulama, pri emu se najstarije arbuskule nalaze najblife mjestu infekcije. Nakon –to grane hifa u u u biljnu stanicu kako bi se formirao glavni dio arbuskule, plazmatska membrana nastavlja svoj rast a grane hifa rastu uokolo. Zasada nije poznato za–to je flivotni vijek arbuskula tako kratak budu i da niti jedna od teorija nije dokazana, no najvjerojatnijim se ini da ju biljna stanica probavi.

Kako prolazi tijekom infekcije, dolazi do stvaranja vezikula, ovisno o vrsti gljive u pitanju budu i da svi rodovi ne proizvode vezikule, kao –to su primjerice rodovi mikoriznih gljiva *Scutellospora* i *Gigaspora*. Velike koncentracije fosfora u tlu inhibiraju rast vezikula iz ega se moffe sa sigurno– u zaklju iti da su okoli–ni uvjeti vafni za razvoj ovih mikoriznih struktura.

Nakon inicijalnog kontakta i nakon –to je zapo et rast hifa unutar korjena, vanjske hife postaju vafan izvor inokuluma za daljnji tijek kolonizacije korjenovog sustava. Budu i da su

zahtjevi za organskim ugljikom iz tla veliki, tako rastu potrebe za velikom gustoćom spora u tlu, –to je osim za prijenos ugljika također važno i za respiratorne procese i dalji rast gljive.

Nakon toga dolazi do ubrzanog rasta vanjskog micelija, koji sa rastom ne počinje sve dok infekcija korijena već nije u tijeku. Vanjski micelij kreće u proizvodnju spora i, između ostalog, dolazi do povećane translokacije ugljikohidrata –to posljedno dovodi do povećane biomase gljive van samog korjenovog sustava, međutim neki autori navode da gljiva proizvodi veću količinu spora pri kraju sezone rasta nego na početku, te da je i na terenu i u laboratorijskim uvjetima dokazano da na proizvodnju spora utječe vrsta biljke domaćina. Pritom četiri vrste gljiva iz roda *Glomus* i jedna iz roda *Gigaspora* uzrokuju slabiju proizvodnju spora kod biljaka iz roda *Glycine* i da svaka gljiva sporulira u različitim razmjerima na biljkama domaćinima iz rodova *Zea*, *Paspalum* i *Sorghum*.

6. Mikorize prisutne kod roda *Ericales*

6.1. Arbutoidne i monotropoidne mikorize

Arbutoidne mikorize su karakteristične po prisustvu i endo i ektomikoriza, što znači da mogu doći do formiranja Hartigove mreže i vanjskog omotača ali i da mogu doći do unutarstaničnog prodora. Kod arbutoidnih mikoriza dolazi do stvaranja hipodermisa u vanjskom sloju kortikalnih stanica korijena i prije avajaju prodiranje Hartigove mreže u dublje slojeve. Većina autora navode da arbutoidne gljive koje tvore arbutoidne mikorize spadaju u bazidiomicete, da je razlog tome strukturalna sličnost sa ektomikorizama te da uistinu tvore i ektomikorize. Iz istraživanja provedenog (Smith i Read, 1996) na 28 ektomikoriznih gljiva, od kojih su njih 3 formirale arbutoidne mikorize u kontaktu sa drvetom *Arbutus menziesii* i medvjetcima, *Arctostaphylos uva-ursi*, može se zaključiti da biljka ima značajnu ulogu u razvoju mikoriza na nju i da ima sposobnost regulirati pojavu različitih gljivinih struktura. U prilog tomu idu i ranija istraživanja također provedena na *Arbutus menziesii* i *Arctostaphylos uva-ursi*. Ovaj tip mikoriza je osim na rodovima *Arctostaphylos* i *Arbutus*, također na i na nekim vrstama iz porodice *Pyrolaceae* no glavna razlika između arbutoidnih i ektomikoriza je u tome –to kod arbutoidnih mikoriza hife penetriraju vanjske kortikalne stanice i ispunjavaju ih svojim a to se kod ektomikoriznih asocijacija ne događa.

Monotropoidne mikorize se odvijaju na porodici *Monotropaceae* reda *Ericales*, po čemu su i nazvane. Dugo se smatralo da se zapravo radi o arbuskularnim mikorizama jer u tim kod monotropoidnih mikoriza gljiva ne prodiru u biljnu stanicu te je to bilo dovoljno za zasebnu klasifikaciju. Specifičnost ove biljne porodice je u tome –to niti jedan od 10 rodova ne sadrži klorofile i nisu u mogućnosti samostalno proizvoditi nužne ugljikohidrate pa u tu svrhu koriste mikoriznu asocijaciju sa gljivom.

Iste gljive tvore i ektomikorizne asocijacije sa oblifnjim drvećem te na taj način tvore kariku putem koje se ugljik i ostali hraniva prenose iz autotrofnog domaćina do heterotrofne parazitske biljke (Sylvia i sur., 2005).

Monotropoidne mikorize najčešće nalazimo u šumama bora i ostalih četina, te zajedno sa monotropoidnim biljkama tvore vrsto povezane zajednice za koje su potrebne značajne koncentracije organskog ugljika. Gljivini ogrtači koji nalazimo oko korjenja monotropoidnog bilja sastoji se od višeslojeva između u kojih se nalaze nakupine tanina. Hartigova mreža

obuhvaća a vanjski vanjski epidermalni sloj ali ne ulazi u korteks biljke već jedna hifa raste u stanicama epiderme.

6.2. Erikoidne mikorize

Kod ovog tipa mikoriza stanice unutrašnje kore postaju ispunjene hifama, te iako hife dalje rastu preko površine korjenja, ne dolazi do stvaranja pravog omotača (Sylvia i sur., 2005). Erikoidne mikorize su nazvane po vrstama iz porodice *Ericaceae* te se smatraju ekološki najznačajnijim tipom mikorize.

Prilikom rasta korjena dolazi do diferencijacije epidermalnih stanica a hife koriste tu priliku za kolonizaciju korjena i dolazi do usporavanja njegovog rasta. Slijedi prodiranje hifa u epidermalne stanice, tipično samo na jednom spojnem mjestu, a ponekad dolazi do stvaranja apresorija. Točan mehanizam ulaska hifa u epidermalnu stanicu je nepoznat.

Erikoidne mikorize nalazimo na rodovima *Calluna*, *Rhododendron* i *Vaccinium*, odnosno na biljkama koje karakteriziraju vrlo fini korjenovi sustavi te koje dosta dobro uspijevaju na kiselim tlima dok gljive koje sudjeluju u ovom tipu mikoriza pripadaju rodu *Hymenoscyphus*.

Erikoidne mikorize često nalazimo na tlima sa niskim sadržajem dostupnih hraniva te se može logično zaključiti da biljke uspješno rastu na ovim područjima uvelike duguju upravo asocijacijama sa erikoidnom gljivom. Pritom je moguće da mikorizna kolonizacija omogućava biljci pristup organskim izvorima dušika, na što ukazuje studija provedena na biljkama iz roda *Vaccinium* koje su uzgajane sa i bez kolonizacije sa gljivom *Hymenoscyphus ericae*. Nakon introdukcije NH_4^+ u tlo, rezultati su pokazali da je dušik stimulirao razvoj koloniziranih biljaka (Smith i Read, 1996.). Također je dokazano da gljiva *H. ericae* može koristiti proteine kao jedini izvor dušika. Usporedba koncentracija fosfora u tkivu erikoidnih biljaka koje su uzgajane sa i bez mikorize pokazale su da gljive mogu poboljšati pristup biljke ovom elementu, te također pristup dušiku, što ukazuje na značaj erikoidnih mikoriza, naročito na područjima na kojima je tlo siromašno hranivima kao što su primjerice stepe i ravnice.

7. Ekološki značaj i primjena mikoriznih gljiva u voćarskoj proizvodnji

Vrlo je mali broj biljnih vrsta koje ne uspostavljaju simbiotske odnose sa mikoriznim gljivama, iz čega je jasno da mikorize imaju neizostavnu ulogu u rastu i razvoju biljaka, što je važno za ekonomsku isplativost proizvodnje (Vukadin, 2014). Micelarne mreže su u stalnom molekularnom kontaktu s okolinom. Tisuće se i na tisuće hektara u tlu te postiflu najveće u masu i jednog čliva čliva organizma na planeti.

Ekoteoreti ari James Lovelock i Lynn Margulis osmislili su takozvanu "Gaja hipotezu" prema kojoj je planetarna biosfera inteligentno razvila micelij kao čliva u mrežu koja manifestira prirodnu inteligenciju. Prema ovoj teoriji, dok planinari, jeleni, insekti i ostala čliva bi a hodaju po tim osjetljivim mrežama, oni ostavljaju tragove koje micelij detektira i na njih ima sposobnost reagirati (Stamets, 2005).

Rastu i zahtjevi za organskim uzgojem podrazumijevaju racionalno gospodarenje resursima, pri čemu je glavni cilj sve manja upotreba kemijskih sredstava za zaštitu i mineralne gnojidbe (Druffli i Orlić, 2004). Kao što je već navedeno, gljive vrše razne uloge u tlu: služe kao izvor hrane, kao razlaga i organske tvari, svojim klijanjem i rastom rahle tlo pri čemu direktno utječe u na njegovu strukturu, te ono što je najbitnije za ovaj rad, tvore simbiozne asocijacije sa klijanjem viših biljaka pri čemu omoguđavaju ne samo opstanak, već i razvoj biljaka u inače za njih nepovoljnim uvjetima.

Opsefni fosilni nalazi potvrdili su postojanje arbuskularnih mikoriza na najranijim biljkama koje nisu tvorile pravo klijanje, što znači da su mikorize tvorile važno, ako ne i klijanje u kariku u prvotnom klijanju bilja kopnom.

Sve donedavno se mikoriznim asocijacijama nije pridavala velika pažnja, međutim sve više i broj istraživanja potvrđuje pozitivan učinak mikoriza u smanjenju gubitka hraniva iz tla.

Kroz kompleksnu strukturu dijeljenja informacija, osjetljive micelarne membrane, koje nalikuju na modifirane neuronske mreže, sluze kao kolektivna gljivica na svijest prirode (Stamets, 2005).

Ideja da stani ni organizam može posjedovati inteligenciju pokazuje studija koju Stamets (2005). U petrijevkicu ispunjenu hranjivim agarom postavljen je labirint te su na ulazu i na kraju labirinta postavljene člitarice kao izvor hrane. Zatim je labirint inokuliran kulturom *Physarum*

polycephalum pod sterilnim uvjetima ó kako je kultura rasla tako je kroz labirint uzastopno izabirala isključivo najkraće rute ka fitarici, pritom izbjegavajući slijepe ulice, što ukazuje na prisustvo određenog oblika inteligencije.

Daljnje studije podupiru mogućnost da se gljive mogu programirati kao kolektivna okolišna baza podataka. Tako Stamets (2005) navodi istraživanje tokom kojeg se manipulirao micelij gljive *Aspergillus niger* da usvoji zlato u svoj DNK, i na taj način napravili micelarne vodice sa elektroničkim potencijalom. NASA također prijavljuje da su mikrobiolozi sa Sveučilišta u Tennesseeju, predvođeni Garyjem Saylerom, razvili primitivni biološki kompjuterski čip koji sadrži bakterije koje svijetle nakon što detektiraju polutante kao što su teški metali. Ovakve studije koje donose nove biotehnologije pokazuju rastuću važnost i ogroman potencijal u iskorištavanju ovih organizama u ekološke i poljoprivredne svrhe, primjerice kao bioindikatori onečišćenja i teških metala.

7.1. Uloga mikoriznih asocijacija u različitim ekosustavima

Većina mikorizni tipovi su u prirodi rasprostranjeni ovisno o biomu te geografskom i biotskom okolišu. Za ravnice je karakterističan erikoidni mikorizni tip, za šume sjeverno-umjerenog pojasa ektomikorize a za pašnjake i tropske šume karakterističan je kombinacija arbuskularnog i ektomikoriznog tipa asocijacija. U svakom od tih okolišnih uvjeta mikoriza ima multifunkcionalnu ulogu ovisno o zahtjevima pojedinog ekosustava.

Arbuskularne mikorize su dominantne u tropskim biotopima te u nekim šumskim sustavima umjerenog pojasa. Iako su biljke iz porodice *Pinaceae* najčešće ektomikorizne, većina drugih gimnosperma tvore arbutoidni tip mikoriza.

Postoje naznake da arbuskularne gljive imaju blagi kapacitet za saprofitskim rastom u tlu no uzgoj arbuskularnog micelija odvojenog od spora je dosada bio neuspješan pa su potrebna dodatna istraživanja na ovu temu.

Studije o mehanizmu kolonizacije arbuskularnom gljivom su važne za proizvodnju sadnica i preparativne tehnologije za uspješnu obnovu bolesnih ili oštećenih biljaka jer biljne vrste pokazuju različitu ovisnost o arbuskularnom mikoriznom tipu.

Upravljanje mikorizama je često bolja opcija nego mikorizna inokulacija radi problema s troškovima proizvodnje velike količine inokuluma. Mudro upravljanje dobrima ekosustava i

upravljanje vrstama od ekonomske važnosti koje imaju veliki potencijal za obnavljanje tala koja su siromašna hranivima, mogu spriječiti produbljivanje siromaštva. (Smith i Read, 1996) Iz navedenih istraživanja i dosadašnjeg proučavanja mikoriznih asocijacija je vidljiva neopisiva korist i bogatstvo kakvo ovi mikroorganizmi predstavljaju u borbi za okoliš i ekosustav te u borbi protiv oštećenja i štete izazvane ljudskim djelovanjem.

7.2. Gubitak hraniva ispiranjem

Otpriblike polovica hraniva unesenih u tlo putem mineralnih gnojiva završi u usjevima, što znači da postoji velika vjerojatnost da se ostatak gubi. Naročito mobilna hraniva poput nitrata (NO_3^-) i sulfata (SO_4^{2-}) mogu vrlo lako biti isprana ispod zone korjenja, no i nepokretna hraniva kao što su fosfor, kalij i cink su također podložna ispiranju i to u erozivnim procesima kada su vezani za organsku tvar ili koloide tla te ukoliko su nataloženi na organomineralnim kompleksima i kelatima.

Cavagnaro i sur. (2015) navode da gubici hraniva ispiranjem mogu iznositi čak 160 kg dušika i do 30 kg fosfora godišnje po hektaru. Na taj način može izgledno doći do kontaminacije tla putem vode i vodnih sustava što dalje vodi ka eutrofikaciji, masovnom razmnožavanju algi te gubitku kopnene i vodene bioraznolikosti. Dušik se također može gubiti iz tla putem emisija u plinove N_2O i N_2 i to u količinama koje mogu doseći i do 143 kg N/ha, makar to ne koncentracije variraju od studije do studije.

Budući da se hife gljiva arbuskularnog tipa mikoriziraju u tlu dalje nego što prodiru korjenje biljaka te dalje od nutritivno deficitarne zone do kakve dolazi u neposrednoj blizini korjena, gljiva je sposobna upijati hraniva iz većeg volumena tla te time pomaže biljci usvajati fosfor, cink, amonijak, nitrat, bakar i kalij; primjerice čak je 90 % biljnog fosfora i 20 % dušika usvojeno upravo putem arbuskularne gljive. Iz navedenih se podataka može zaključiti da gljive arbuskularnog tipa mikorizirane mogu smanjiti rizik gubitka hraniva putem njihove poboljšane imobilizacije u usporedbi sa nemikoriziranim biljkama, ili putem mijenjanja procesa kruženja hraniva i vode u tlu tako da poboljšavaju njihovo zadržavanje u tlu.

Ovakvi gubici mogu biti štetni za okoliš i skupi u pogledu izgubljenih prinosa. Biljke su evoluirale mnoge osobine u svrhu optimizacije usvajanja hraniva, uključujući i formaciju simbioze sa arbuskularnom gljivom. Sve je više studija koje dokazuju da arbuskularni tip mikorize ima sposobnost reducirati gubitak hraniva iz tla putem povećanja intercepcijske zone oko korjena i spriječiti ispiranje hraniva nakon kose (Cavagnaro i sur., 2015).

7.3. Ekološka važnost mikoriznih asocijacija

U tlu se događa proces ispiranja, odnosno drenaže vode koja sadrži otopine iz tla putem djelovanja filtracije i cijevanja.

U tom procesu dolazi do gubitka značajnih količina hraniva, zajedno sa gubitkom putem plinskih emisija. Ovakvi gubici su štetni u ekološkom ali i u poljoprivrednom i ekonomskom smislu kroz smanjene prinose. U takvim situacijama prisustvo arbuskularnog mikoriznog tipa je biljni evolucijski pokušaj optimizacije gubitka hraniva.

Cavagnaro i sur. (2015) su u svojem istraživanju obradili biljne vrste na koje arbuskularne gljive imaju sposobnost smanjiti te gubitke putem povećanog biljnog usvajanja hraniva i putem sprežavanja njihovih gubitaka nakon klimatski uzrokovanog ispiranja.

Mikorizne gljive se sve više prepoznaju kao ključne vrste koje stvaraju gljivične slojeve tla i time omogućavaju rast i razvoj budućih generacija biljaka i životinja bez kojih ne bi bilo ekosustava.

Stamets (2005) u svojem dugogodišnjem radu s mikoriznim gljivama tvrdi da se micelij može selekcionirati i koristiti za razgradnju toksičnih otpada pri čemu ga razgrađuje na bezopasne metabolite, te je svoje tvrdnje dokazao upotrebom micelija za čišćenje izljeva nafte. Ovakva ekološka korist može se preuveličati. Autor također navodi upotrebu micelija u filtraciji vode te u neutralizaciji štetina kao što su termiti i vatreni mravi.

Nekoliko je biljnih vrsta na koje su mikorizne gljive korisne i upotrebljive u ekološkom kontekstu: kroz mikorizmarstvo, mikosanciju, kao mikopesticidi te u zaštiti okoliša.

Mikorizmarstvo navodi kao upotrebu gljiva u očuvanju prirodnih resursa, u oporavku i recikliranju organskog otpada te poboljšavanju kvalitete presa i drveća. Mikosancija se odnosi na upotrebu gljiva za razlaganje ili odstranjivanje toksina iz tla a temelji se na sposobnosti gljive da razlažu različite molekule.

Biljke ovisne o arbuskularnim mikoriznim asocijacijama, poput biljke *Eremanthus imbricatus*, pokazuju velik potencijal u obnavljanju oslabljenih tala (Pagano, 2012). Na isti način gljive omogućavaju kao razlagači teških metala iz tla koriste i sporokarp za skladištenje usvojenih teških metala, koji se kasnije može jednostavno odstraniti.

Gljiva može direktno denaturirati toksine kao što su derivati petroleja te sekundarno putem apsorpcije teških metala i na ve opisan na in kanaliziranja istih u svoj sporokarp. Kada micelij shiitake gljiva biva izložen teškim metalima, dolazi do dekolorizacije toksinih boja prilikom koje se teški metali apsorbiraju, što ukazuje na korist mikofiltracije kod tretiranja kompleksnih otpada. Gnojiva, pesticidi, herbicidi, tekstilne boje i lijekovi na bazi estrogena su redom podložni enzimima kakve proizvodi gljivici micelij.

Kao mikopesticidi se mogu koristiti mikorizne gljive iz roda *Metarhizium*, naročito *Metarhizium anisopilae*, gljive iz roda *Beauveria* te neke vrste iz roda *Paecilomyces*. Nakon što spore navedenih gljiva dođu u dodir sa insektom, spore se pričvrstuju na insekte i tamo klijaju te prodiru kroz egzoskeleton koriste i enzime koje razgrađuju hitin. Tako svaka hifa ulazi kroz respiratorni trakt, anus i usta. Jednom kada ulazi u organizam insekta, micelij se grana i raste kroz unutrašnje organe gdje uzrokuje slabost, nekrozu te naposljetku smrt (Stamets, 2005).

Stotine farme proizvode velike količine fekalnih otpadnih voda koje naposljetku završavaju u vodnim tokovima te su one izvorne streptokokima, bakterijom *Escherichia coli* te raznim amebnim parazitima i virusima velik rizik. Pritom se podifluksione razine cinka i bakra, no istratifikacija provedena u Sjevernoj Karolini su pokazala da gljiva *Aspergillus niger* uklanja 91% bakra i 70% cinka iz otpadnih voda.

Stamets (2005) navodi da gljive koje sadrže melanin koriste radijaciju kao pomoć u rastu svojih stanica, analogno s načinom na koji biljke koriste klorofile. Otkriveno je da ionizirajuća radijacija poboljšava rast nekoliko vrsta melaninom bogatih gljiva, što ukazuje na mogućnost generiranja gljive za hranu prigodnu za svemirska putovanja i da gljive mogu rasti i na drugim planetima bez prisustva sunčeve svjetlosti.

Teški metali, kao cink, bakar, olovo, fliva i kadmij najčešći su i najopasniji anorganski okolišni onečišivači. Rastući broj dokaza sugerira da mikorizne gljive mogu smanjiti toksičnost metala u biljkama. Ektomikorizna gljiva *Tuber borchii* Vitt. (Sabella i sur., 2016), široko rasprostranjena u Italiji, od velikog je ekološkog interesa radi mutualističkih asocijacija i prednosti koje ima za biljku domaćina.

Sadnice mediteranskog grma divljeg pelina, *Cistus creticus* L., mikoriziranog i nemikoriziranog su tretirane sa teškim metalima (cink, olovo i krom). Teški metali su

uzrokovali klorozu li- a kod nemikoriziranih sadnica dok nikakva zna ajna razlika nije opaflena u pigmentaciji li- a mikoriziranog li- a.

Smanjenje pigmentacije li-ta opafleno kod tretiranih, nemikoriziranih sadnica je zna ajno koreliralo sa smanjenom izrafleno- u klju nih gena povezanih sa biosintezom klorofila; umjesto toga, nikakva zna ajna varijacija u ekspresiji gena nije detektirana kod mikoriziranih sadnica tretiranih sa te-kim metalima.

Ova studija pokazuje da o-te enja u DNK izazvana stresom te-kih metala je bila nifla kod mikoriziranih nego kod nemikoriziranih sadnica -to potvr uje korist mikoriznih asocijacija u borbi i sa ovom vrstom stresa za biljku.

7.4.Uloga arbuskularnih mikoriza u smanjenju gubitaka fosfora i dušika

Budu i da gljive sintetiziraju glutamin i reduciraju nitrate, sposobne su usvajati du-ik u tri oblika: kao NO_3^- , NH_4^+ te kao aminokiseline, te utje u na transformaciju i ciklus kruffenja N u tlu. U usporedbi sa du-ikom fosfor je u tlu relativno nepokretan i generalno je mala koli ina P u tlu biljci dostupna.

ak je 90% P iz tla biljci nedostupno, -to uslijed filtracijskih reakcija tla, -to putem sorpcije organskih i mineralnih estica. Iz tog razloga ve ina poljoprivrednika obilno aplicira fosforna gnojiva u usjeve, no P je i dalje biljci dostupan u maloj koli ini ó stvara se za arani krug i dolazi do gomilanja i akumulacije velikih koncentracija P u tlu.

Arbuskularne gljive su dobro poznate po svojoj sposobnosti da pobolj-aju usvajanje P i da smanjuju anorganske gubitke do kakvih dolazi putem ispiranja jer mogu nakupiti velike koli ine fosfora. Indirektno utje u na njegovo otjecanje sa povr-ine biljke stimuliraju i usvajanje, -to se mo fle pokazati osobito vafnim kod pjeskovitih tala koja su po svojoj strukturi vrlo podloflna procesima ispiranja, te kod poljoprivrednih povr-ina koje zahtijevaju opseflno navodnjavanje.

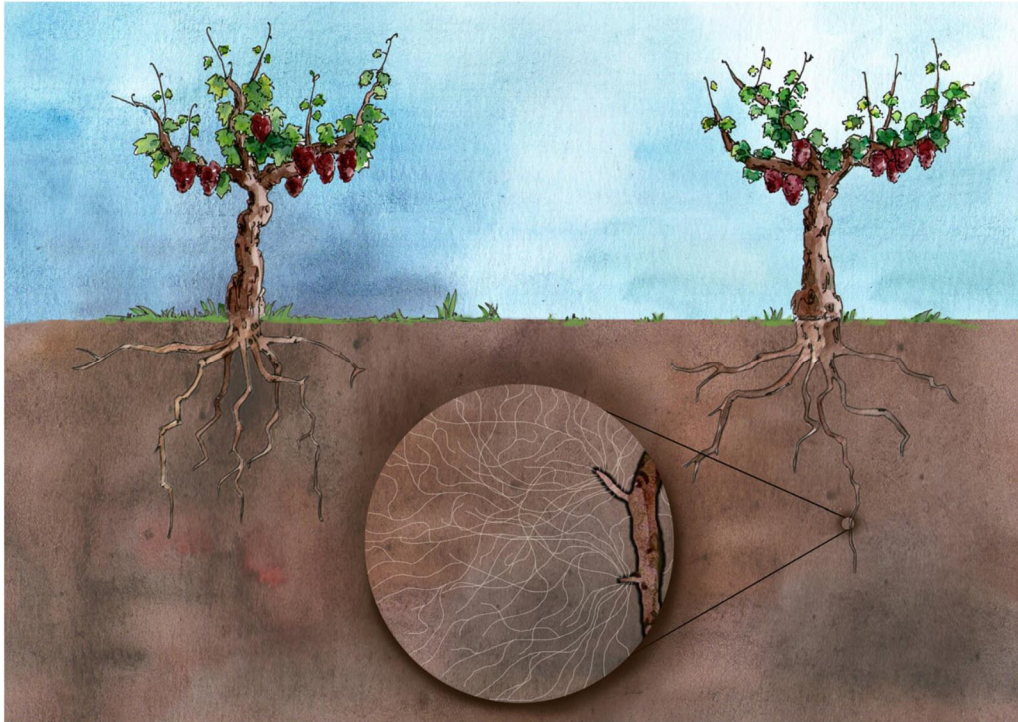
Tako er se mogu pokazati korisne u nasadima na kojima se koriste fungicidi, fumiganti te nemikorizni usjevi budu i da takve prakse drasti no smanjuju inokulumski potencijal tla. Iako je gubitak P putem ispiranja manji nego -to je gubitak N, ak i male koli ine mogu imati snaflan u inak na okoli- budu i da se fosfor koji ulazi u vode smatra glavnim uzrokom eutrofikacije (Cavagnaro i sur. 2015).

7.5. Uloga mikoriza u usvajanju hraniva te rastu i razvoju biljke

Širok je spektar koristi koje biljka ima od uspostave asocijacija sa mikoriznim gljivama. Gljive potpomažu bolje usvajanje hraniva –to direktno utječe na bolji opstanak te brži rast i razvoj biljke, povećavaju otpornost na bolesti, –tako i na abiotičke stresove.

Navedene koristi potvrđuju mnoge studije. Primjerice, u studiji koju su proveli Ban i sur. (2011) mikorizna inokulacija povećala je dužinu stabljike lubenice te broj lateralnih grana. U usporedbi sa nemikoriziranim, mikorizirane biljke imale su viši prinos te već i ranije plodonosnije. Mikorizna inokulacija povećala je ukupni prinos ali nije utjecala na težinu samih plodova. Dalje, Waters i sur. (2008) u svojoj studiji navode da bi infekcija sa erikoidnim gljivama mogla biti važna za proizvodnju borovnica budući da se pokazalo da mikoriza potencijalno povećava efikasnost uporabe gnojiva i povećava prinos bobica. Ovime se postižu ekonomske koristi od mikorizne asocijacije u vidu financijskih ušteda, s obzirom na smanjenu potrebu upotrebe gnojiva te ekološki dobrobit radi smanjenog unošenja kemijskih gnojiva u tlo.

Micelij dramatično povećava biljno usvajanje hraniva i to esencijalne elemente kao što su fosfor, bakar i cink na način da povećava područje usvajanja hraniva biljke. U svojem grananju, jedna biljna vrsta može povezati kilometre –umskog tla u kontinuiranoj mreži (Slika 7.1). Kao rezultat poboljšanog usvajanja hraniva biljni rast je ubrzan te biljke koje tvore mikorize bolje podnose bolesti. Pritom gljiva iz asocijacije izvlači i koristi jer ima pristup –erima koje izlučuje biljka a koji su uglavnom heksoze koje gljiva pretvara u manitole, arabitole i eritrole (Stamets, 2005).



*Slika 7.1. Razgranate hife mikoriznih gljiva uvelike povećavaju volumen istraženog tla što omogućava biljci bolji pristup hranivima i vodi
(Izvor: Trouvelot i sur., 2015)*

Uz mikorizne gljive može se koristiti i ko-inokulacija sa bakterijama promotorima rasta. Takva praksa rezultira povećanom razvoju cvjetova i plodova kod jagode, plodovi dobivaju na veličini, sadrže više koncentracije šećera u odnosu na nemikorizirane jagode te također sadrže više količine askorbinske i folijske kiseline. Mikorizne gljive utječu na kvalitetu usjeva i pokazuju te rezultate čak i pod uvjetima smanjene kemijske gnojidbe. Navedeno potvrđuju Bona i sur. (2014) koji su dokazali da simbioza s arbuskularnom gljivom utječe na biljnu biosintezu hormona te na metabolizam biljke. U in vivo arbuskularne simbioze zapaženi su ne samo kod koloniziranog korjenovog sustava već i kod površinskih dijelova biljke, poput lišća, cvjetova i plodova.

Kod voćnih usjeva, kolonizacija arbuskularnim gljivama stimulira rast, pojačava fotosintezu, inducira raniju cvatnju i plodonosnost te poboljšava kvalitetu prinosa

. Rizosferne interakcije pozitivno utječu na kvalitetu tla te se mogu eksploatirati u svrhu povećanja prinosa, redukcije kemijske primjene i razvitka u inkovitim oblicima održive poljoprivrede.

Arbuskularne gljive same, ili u kombinaciji sa bakterijama promotorima rasta (*Pseudomonas sp.*) mogu utjecati i na koncentraciju antocijana u plodovima jagode čak i pri reduciranoj gnojidbi.

Ovakva ko-inokulacija mikorize sa bakterijama pozitivno je utjecala na raniju cvatnju i plodonosnost. Arbuskularne gljive su prethodno pokazale da mijenjaju biljnu reproduktivnu fiziologiju, induciraju raniju cvatnju, te osim produženog perioda cvatnje, također povećavaju broj cvjetnih pupoljaka i plodova.

Plodovi inokuliranih biljaka pokazuju veći u ukupnu koncentraciju šećera, pa samim time i indeksa slatkoće, u odnosu na kontrolu. Plodovi imaju višu koncentraciju askorbinske (vitamin C) i folne kiseline čak i pri reduciranoj gnojidbi što ukazuje da standardna gnojidba prema potrebi zahtijeva biljke.

Općenito plodovi su zdraviji (radi veće koncentracije vitamina), ukusniji (radi veće koncentracije šećera) i sadrže više antocijana. Veći sadržaj šećera je također interesantan u proizvodnji džemova i sokova što povećava komercijalnu vrijednost voćaka zajedno sa povećanim prinosom i čini mikorize interesantnima ne samo kod uzgoja voćaka za uporabu u svježem stanju već i za razne preradbe. Posebno obzirom da su biljke postigle takve rezultate pod uvjetima reducirane gnojidbe, što vodi ekonomskoj, ekološkoj i koristi za zdravlje uvijek (Bona i sur., 2014).

Korist mikoriznih asocijacija vidljiva je i za vitikulturu. Trouvelot i sur. (2015) tvrde da arbuskularni tip mikoriza pozitivno utječe na rast vinove loze i usvajanje hraniva putem boljeg pristupa i aktivacijom regulacije transporta proteina za fosfor, dušik i druge elemente. Arbuskularne mikorize povećavaju toleranciju na abiotičke stresove kao što su vodni stres, zaslanjenost tla, kloroza i toksičnost teških metalima. Također od biotičkih stresova kao što su bolesti korijena te proizvode glikoproteine i guste mreže hifa koje povećavaju stabilnost tla i zadržavaju hraniva tla, i sve to za 14% od ukupnog budžeta koji je bio potreban za proizvodnju nemikoriziranog groblja.

Mikorizne asocijacije su se pokazale uspješnima i na terenskim uvjetima što dokazuje studija tokom koje se ispitala uloga arbuskularnih mikoriza na rast i usvajanje hraniva kod rajčice (*Solanum lycopersicum* L.) pri terenskim uvjetima.

Dobiveni rezultati pokazali su da razvitak arbuskularne mikorize značajno povećava rast biljaka i usvajanje hraniva uključujući i NO_3^- nedavno aplikiranog u tlo. Korjenje i arbuskularne mikorizne gljive imaju važnu ulogu ne samo u usvajanju hraniva od strane biljke

ne go i u krufenju du-ika u ekosistemu (Cavagnaro, i sur., 2012). Kod raj ice se tako er ispitivao u inak mikorize na ekonomski relevantnu fiziologiju ploda. Mikoriza je ubrzala cvatnju i razvoj ploda i pove ala prinos. Geni uklju eni u metabolizam du-ika i ugljikohidrata zaslu fni su za regulaciju i transdukciju signala kod uspostavljanja mikorize. Mikoriza pove ava obilje aminokiselina u plodovima, pri emu su glutamin i aspargin aminokiseline na koje mikoriza najvi-e utje e. Prikupljeni podaci ukazuju na systemske promjene koje simbioza sa arbuskularnom gljivom inducira u biljci i potvr uju hipotezu da arbuskularne gljive mogu produ fti svoj utjecaj od korjena do ploda (Salvioli i sur., 2012).

Osim raj ice, mikorize su korisne i kod drugih povrtnih vrsta, poput primjerice paprike, -to su pokazali Kaya i sur. (2009) u studiji o u incima soja arbuskularne mikorize *Glomus clarum* na rast i prinos paprike (*Capsicum annum* cv. 11B 14) uzgajanoj u stakleni kim uvjetima i velikoj zaslanjenosti tla. Tretmani sa NaCl su reducirali ukupnu suhu tvar u mladicama i korjenju te prinos u usporedbi sa biljkama koje nisu tretirane solju. Koncentracije N, P i K u li- u su zna ajno reducirane radi velike zaslanjenosti, me utim mikorizna kolonizacija na biljkama koje su negativno reagirale na veliku koli inu soli u supstratu je obnovila koncentracije hraniva u li- u na istu razinu kakva je bila kod biljaka koje nisu rasle u slanim uvjetima. Inokulacija je pobolj-ala rast paprike i u uvjetima zaslanjenosti i u uvjetima bez pove ane koli ine soli.

Jedna od impresivnih sposobnosti mikoriznih gljiva je mogu nost povezivanja vi-e razli itih biljnih jedinki od strane jedne gljive te translokacija hraniva iz jedne u drugu ovisno o potrebama i mogu ostima svake. Yao i sur. (2016) ispitivali su sposobnost micelija u povezivanju razli itih biljaka te ulogu mikoriza u podzemnoj komunikaciji izme u biljaka putem kemijskih supstanci.

Kori-teni su dvokomponentni kontejneri, odnosno ka-ete po sredini razdvojene mre fkom razli itih debljina. Mre fka debela 0.37 m ima mogu nost propu-tanja micelija, ali ne i korjena, dok mre fka debela 0.45 m nije bila propusna ni za micelij ni za korjen. U svakom kontejneru je po jedan odjeljak inokuliran sa gljivom *Paraglomus occultum*. Potvr eno je da micelarne mre fle ostvaruju kontakt izme u sadnica. Njihova uloga je pobolj-avanje rasta biljke doma ina i pobolj-avanje svojstava tla kod biljke koja sama po sebi nije bila inicijalno inokulirana ali je micelij susjedne biljke pro-ao kroz mreflu i, do-av-i s njom u kontakt, uspostavio mikorizu.

Mikorizna inokulacija je značajno povećala teffinu listu, stabljike i korjenu. Micelarna mreža u kaktusu sa mrežom debelom 37 μm je imala značajno pozitivne učinke na navedena svojstva kod neinokulirane biljke. Kod micelarne mreže od 0.45 μm došlo je do povećanja navedenih svojstava inokulirane biljke ali je značajno inhibirala biomasu kod neinokulirane biljke. Ovo ukazuje da inokulacija arbuskularnom gljivom pridonosi poboljšanju rasta biljke i plodnosti kod obje biljke (Yao i sur., 2016).

Arbuskularne gljive su poznate po tome što pospješuju vegetativni rast putem poboljšanog usvajanja minerala u tlima siromašnim hranivima. Ovi pozitivni učinci na biljni rast mogu značajno varirati među različitim kultivarima pojedine vrste i među biljnim vrstama koje rastu u različitim područjima. Provedeno je istraživanje tokom kojeg se testirao odgovor triju drvenastih biljnih vrsta sa različitim geografskih područja: *Parkia biglobosa*, *Tamarindus indica* L. i *Ziziphus mauritiana* Lam. na mikoriznu kolonizaciju kako bi se utvrdila njihova ovisnost o mikorizama i analizirao sastav listova i stabljike (Guissou i sur., 2016).

Čest mjeseci nakon inokulacije mikoriznom gljivom, rezultati su pokazali da biljke ovisno o podrijetlu različito odgovaraju na simbiozu s mikoriznom gljivom. Indijska fliflula, *Ziziphus mauritiana*, je pokazala značajno povećanje u ovisnosti o mikorizama u odnosu na druge dvije vrste. Ključnim se pokazalo podrijetlo sjemena, no razine kolonizacije korjenu (80-90%) nisu previše varirale ovisno o podrijetlu. U svim slučajevima mikorizna gljiva je pogodovala drve u pogledu većeg usvajanja N, P i K. Naravno je usvajanje P bilo proporcionalano s ovisnosti o mikorizi. Može se zaključiti da je važnost uzimanja u obzir podrijetla sjemena kada se odvija preselekcija mikotropnih biljnih kandidata prije podizanja većih površina ili novih sistema, važan korak u proizvodnji.

Budući da se neke od ovih vrsta uzgajaju radi daljnje prerade plodova, važno je znati kakav utjecaj mikorizne asocijacije imaju na kvalitetu i svojstva dobivenih proizvoda.

U cilju boljeg uvida u ta svojstva, ispitana su fizikalno-kemijska svojstva plodova masline (*Olea europaea* L. var. *Sariulak*) te dobivenog ulja nakon mikorizacije sa arbuskularnom gljivom (*Rhizophagus intraradices*) te aplikacije mikoriziranog kalcita kao stimulantu biljnog rasta.

Naravno je naglasak bio na individualnim fenolnim spojevima važnim za proizvodnju ulja. Masline su pokazale veću akumulaciju hidroksitirozola i p-hidroksibenoinih kiselina u biljkama na kojima je bilo inokulacije, u usporedbi sa vrijednostima neinokuliranih biljaka.

Inokulacija je rezultirala smanjenom koncentracijom vanilina, dimetiloleuropeina i luteolina u plodovima. Bilo je razlika u stupnjevima fenola u plodovima i njihovim uljima, pa je tako količina hidroksitirosola rasla kod biljaka koje su bile i mikorizirane i imale aplikaciju kalcitoma. Nakon kombinirane primjene mikoriznih gljiva i kalcitoma, ulja nisu pokazala značajnu promjenu u ukupnim fenolima, što je u suprotnosti sa vrijednostima koje su bile u plodovima.

Ovi rezultati pokazuju da na fenolne spojeve koji imaju hidrofilnu strukturu utječe i mikoriza i kalcitom više nego što utječe na lipofilnu strukturu (Kara i sur., 2015).

U ovom slučaju kod koje simbioza sa mikoriznim gljivama također pokazala korisnom je i naranča, što je utvrđeno tokom studije koju su proveli Ortas i Ustuner (2014). Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi u inku inokulacije sa jednim sojem arbuskularne gljive, sa dva soja i sa nativnim inokulatom, koristeći specifičan medij za rast, na rast i usvajanje hraniva kod sadnica naranče *Citrus aurantium L.* Mikorizna inokulacija povećala je neke parametre vegetativnog rasta kao što su visina mladica, promjer te ukupna suha tvar izdanaka i korjena. U ovom slučaju je razlika u inkulturi korištenja jednog soja i korištenje dva soja mikorizne gljive. Pozitivni učinci mikorizacije sa jednim sojem i dvostruke inokulacije bili su značajni. Kolonizacija korjena je bila uspješnija kod korištenja dvaju sojeva. Biljka je bolje usvajala fosfor i cink. Rezultati su pokazali da su nativni sojevi jednako u inkulturi kao komercijalni inokulum. Ovo ispitivanje ukazuje na prikladnost mikoriznih asocijacija kod uspješnog uzgoja citrusa u voćarskoj proizvodnji.

Rastu i broj rezultata koji idu u korist pozitivnim učincima ovog simbioznog odnosa na biljku doma također ukazuje da bi se mikorizne asocijacije u voćarskoj, a i općenito poljoprivrednoj proizvodnji, trebalo uzeti u obzir, te navedeni podaci potvrđuju značajne poljoprivredne, ekološke i ekonomske koristi ovih mikroorganizama.

7.6. Otpornost biljke na stres

Osim što su se pokazale izrazito korisnima kod usvajanja hraniva te posljedice na uspješni rast i razvoj biljke, u ovom slučaju je cijeli niz drugih koristi od ovog tipa asocijacija za biljku. Između ostalog, mikorize se mogu pokazati korisnima kod otpornosti biljke na sušu te kod različitih vrsta stresova kao što je zaslanjenost tla. Provedene su mnoge studije koje dokazuju koristi mikoriznih asocijacija u ovom kontekstu.

Ve ina biljnih usjeva ima potencijal uspostavljati arbuskularne mikorize, koje mogu poboljšati opskrbu vodom i hranivima, povećati biljnu toleranciju na okolišne stresove i otpornost na bolesti korijena i nematoda svojih biljaka doma ina. Time, inokulacija ovih vrsta gljivom koja tvori arbuskularne mikorize može biti itekako profitabilna te su pritom dostupni komercijalni inokulumi.

Arbuskularna mikoriza može biti uinkovita u povećanju biljne otpornosti na sušu i stres uzrokovan povećanom količinom soli u tlu. Osobito su obezbeđene u biokontroli korjenovih nematoda te u povećanoj kemijskoj kvaliteti povrća za ljudsku upotrebu. Mnoge porodice povrtnih kultura (*Amaryllidaceae*, *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Cucurbitaceae*, *Fabaceae* i *Solanaceae*) pokazuju visoku ovisnost o mikoriznim asocijacijama (Baum i sur., 2015).

Istraženo je u inak kolonizacije arbuskularnom gljivom na prinos i efikasnost usvajanja vode kod lubenice (*Citrullus lanatus*) pod terenskim uvjetima. Autori su usporedili mikorizirane i nemikorizirane biljke, dobro navodnjene i pod uvjetima vodnog stresa. Pokazalo se da mikorizirane biljke imaju značajno veći u biomasu i prinos u usporedbi s nemikoriziranim, bez obzira na to jesu li biljke bile pod stresom ili ne, jer je mikoriza poboljšala koncentracije hraniva u listovima (Kaya i sur., 2003).

Time se ti povećanja biljne otpornosti na stres uzrokovan velikom količinom soli u tlu, višestruka studija dokazuje korist mikoriza u ovom kontekstu.

Arbuskularne mikorize smanjuju stres uzrokovan zaslanjenostima kod mnogih kultura, primjerice banana, bob, rajčica, maslina, palma i druge (Trouvelot i sur., 2015) putem poboljšanja usvajanja P, N, Zn, Cu i Fe. Poboljšanje količine fosfora u biljci je vjerojatno najvažniji izvor otpora na stres kakav izaziva velika zaslanjenost. Proučavana je mikoriza kod vinove loze uzgajane u uvjetima navodnjavanja slanom vodom.

Zaslanjenost je smanjila rast u visinu, no ukupni vegetativni rast se povećao kao rezultat inokulacije mikoriznom gljivom. Da mikoriza ima pozitivan učinak na biljnu otpornost na zaslanjenost tla pokazali su i Oztekin i sur. (2012) koji su istražili kombinirane inokulacije u inke presaivanja i mikorizne inokulacije pod uvjetima zaslanjenosti. Pokušaj je proveden u plasteniku tijekom jeseni i proljeća 2008. i 2009. godine na rajčici.

Polovica biljaka je umetnuta u suspenziju koja je sadržavala endomikorizne arbuskularne gljive (*Glomus spp.*) jedan dan prije presaivanja, dok je druga polovica presaivanja bez ikakvog tretmana kao kontrola.

Iako nije bilo statističkih razlika u teжинi suhe i svjeđe tvari biljnih dijelova, mikorizna inokulacija je povećala teжinu svjeđe i suhe tvari korjena. Od kvalitativnih parametara, vitamin C je bio povećanih vrijednosti kod inokuliranih biljaka dok se titracijska kiselost smanjila. Postotak suhe tvari, snaga kore, titracijska kiselost i pH su također bili drugačiji kod inokuliranih biljaka. Sukladno tome tolerancija na zaslanjenost bila bi puno bolja kada bi se presadnice prethodno inokulirale sa mikoriznim gljivama te se takav tretman preporuča i kod onih kultura koje zahtijevaju uzgoj iz presadnica i višestruko presađivanje, što je važno podatak za rasadnike u proizvodnji.

Koc (2015) je također došao do zaključka da arbuskularne mikorize smanjuju biokemijske promjene koje na jagodama uzrokuje uzgoj na slanom tlu. Kod naranče se recimo vrsta *Glomus versiforme* pokazala najučinkovitijom gljivom za smanjenje ovakvog tipa stresa (Zou i Wu, 2011) te čak postoje naznake da bi kombinacija mikorize sa bakterijskim konzorcijem mogla biti zanimljiva. Upreti i sur. (2015) su utvrdili da ova kombinacija značajno poboljšava toleranciju na stres kod grožđa, zajedno sa poboljšanjem u biljnom usvajanju vode.

Latef i Chaoxing (2011) su pak istražili mehanizme smanjivanja stresa uzrokovanog zaslanjenosti putem arbuskularne gljive *Glomus mosseae* na rajčici (*Lycopersicon esculentum* L.) kultiviranoj u tlu sa 0.50 i 100mM otopinom NaCl.

Mikorizacija je pozitivno utjecala na rast, listnu površinu, sadržaj klorofila, teжinu svjeđe tvari u voću i prinos. Koncentracije P i K su bile više kod mikoriziranih, u usporedbi sa nemikoriziranim biljkama uzgajanim pod slanim uvjetima i uvjetima bez zaslanjenosti. Koncentracije Na su bile niže kod mikoriziranih nego kod nemikoriziranih gljiva te se pokazalo da mikorizne gljive štite biljke protiv zaslanjenosti na način da smanjuju oksidativni stres kakav izaziva velika koncentracija soli.

Za voćarsku proizvodnju osobito važno ispitivanje koje su proveli Almeida i suradnici (2016) o učinku stresa uzrokovanog povećanom koncentracijom soli (NaCl) na sadnice banane kolonizirane arbuskularnom gljivom, provedene na supstratu u plasteničkim uvjetima. Povećane razine soli uzrokovale su redukciju u suhoj tvari i u stupnju fotosinteze, što može biti povezano s osmotskim učinkom soli u tlu, povećanjem natrija i smanjenju razine dušika u lišću. Pokazalo se da sol reducira mikoriznu kolonizaciju korjena, ali ne utječe na gustoću spora, što je korisna informacija kod uzgoja ovih vrsta.

Uzgoj biljaka iz presadnica uzrokuje određeni stres za biljku tokom višestrukog presaivanja. Kod većine višegodišnjih biljki iz umjerenog pojasa, presaivanje uglavnom rezultira slabijim početnim rastom – to spriječava nove sadnice u dostizanju maksimalnih kapaciteta produktivnosti i ekonomske isplativosti. Obzirom na rastuće zahtjeve u organskoj proizvodnji voća i regulativi prisutnoj u upotrebi fumiganata i sličnih praksi, postoje utemeljene naznake da bi mikorizacija mogla biti korisna tehnika u poboljšanje biljnog zdravlja tokom ove osjetljive faze rasta.

Forge i sur. (2015) tvrde da uspostava mikoriznih asocijacija vodi ka poboljšanju u inkovitosti i pouzdanosti uzgoja voća iz sadnica i da smanjuje stres koji se pritom vrši na biljku.

U svrhu utvrđivanja potencijalno povoljnog uinka mikorize na biljku tokom ovog procesa, Castillo i sur. (2009) proveli su ispitivanje na čili papričici (*Capsicum annuum L.*) budući da ta biljka zahtijeva uzgoj iz presadnica. Cilj studije je usporediti u inkovitosti dviju arbuskularnih gljiva sa komercijalnim (*Glomus intraradices*) i lokalnim inokulumom (*Glomus claroideum*) te sa kontrolom bez inokulacije.

Rezultati istraživanja pokazali su da je kod biljaka inokuliranih sa lokalnom mikoriznom gljivom bilo više folijarne mase, berba je počela 49 dana ranije i težina svježele tvari je bila čak 177 % više u usporedbi s kontrolom. Kolonizacija na korjenu je bila dosta niska, – to pokazuje značajnu razliku u usporedbi sa komercijalnim inokulumom, dok je istovremeno došlo do velike proizvodnje spora u supstratu. Iz toga se vidi da inokulacija sa nativnom gljivom smanjuje stres presaivanja i pritom ubrzava proces sazrijevanja biljaka – to rezultira sa višim prinosom i većom kvalitetom prinosa.

Cecatto i sur. (2016) tvrde da inokulacija sa arbuskularnom gljivom pri presaivanju sadnica jagoda utječe na sadržaj antocijana i fenola - plodovi pokazuju vrlo visok sadržaj i jednog i drugog. Također, dolazi do smanjenja kiselosti u plodovima tokom sezone rasta i povećanja njihove vrstoće tokom ranih stadija proizvodnje. Ovo je vrlo značajno otkriće kod voćnih vrsta kao što je jagoda, za koju je tvrđeno da vrlo značajna kod transporta plodova.

Asocijacije sa gljivama koje tvore arbuskularne mikorize mogu biti korisne u uvjetima suše, – to su Bowles i sur. (2016) utvrdili prilikom studije provedene na dva genotipa rajčice, *Solanum lycopersicum L.* genotip MYC+ mutantni nemikorizni genotip. Dobiveni rezultati pokazali su da arbuskularna mikoriza povećava tržni prinos rajčice za otprilike 25 % te su

biljke imale više koncentracije dušika i fosfora, 8%-tnu stomatalnu provodnost i veći i ukupni prinos.

Studije utvrđivanja korisnosti mikoriza kod uvjeta suše su također provedi Calvo-Polanco i sur. (2016) tokom kojih su pokušali otkriti na koji način arbuskularne gljive koje potječu sa različitih tala utječu na rast i vodni potencijal stabala maslina. Masline su inokulirane nativnim populacijama prikupljenih sa dvaju različitih staništa, semi-aridnih i humidnih regija, te zatim podvrgnute stresu suše.

Utvrđeno je da biljke rastu bolje sa gljivama koje potječu iz humidnih područja –to je korisno znati prilikom izbora najidealnijeg inokuluma za pojedinu proizvodnju. Dalje, pod ovim uvjetima je nađena najveća raznolikost arbuskularnih gljiva.

Objekti mikorizne inokulacije značajno povećavaju visinu biljaka, promjer stabljike, broj lateralnih mladica i lišća, ukupne fenole, klorofile i karotenoide –to potvrđuju Seifi i sur. (2014).

Ove i slične studije pokazuju ne samo da se mikorize mogu upotrebljavati kao oruđe u borbi protiv suše, ali da treba obratiti pozornost na sojeve gljiva te na staništa iz kojih potječu budući da su i to bitni faktori za postizanje maksimalnih rezultata kod mikoriziranja.

Zou i sur. (2016) su ispitali svojstva glomalina, posebnog glikoproteina kojeg izlučuju hife i spore arbuskularnih gljiva, a koji posjeduje neke raznolike karakteristike od kojih su najizraflajnije hidrofobna priroda i stabilnost na visokim temperaturama. Glomalin uslijed procesa degradacije hifa oblače organsku tvar i estice tla te time formira zaštitni površinski sloj koji služi protiv gubitka vode i hraniva iz agregata tla. Na taj način glomalin utječe na sposobnost zadržavanja vode od strane tla i biljke. Također predstavlja svojevrsno ljepilo, koje stabilizira agregate tla te frakcije organske tvari u višegodišnjim voćnjacima. Ovi podaci pokazuju da se glomalin treba uzeti u obzir kao potencijalni tretman za tlo kod višegodišnjih voćaka.

7.7. Otpornost na bolesti i štetočine

Osim na terenu, važnost mikoriznih asocijacija dolazi do izražaja i kod uzgoja bilja u rasadnicima, radi svojih brojnih pozitivnih učinaka na biljni rast te na biozaštitu. S time u vidu Aleandri i sur. (2015) su pokušali odrediti učinak mikorizne inokulacije sa gljivom *Rhizophagus irregularis* u rasadni kom mediju na korjenu dinje zaraflene biljnim patogenom *Monosporascus cannonballus*.

Nakon umjetne zaraze patogenom, mikoriza je omogućila posvećenu zaštitu protiv patogena, što pokazuje da inokulacija prije presaivanja značajno smanjuje ozbiljnost ove bolesti. Treba naglasiti i da je prosječna masa plodova kod mikoriziranih biljaka bila značajno veća nego kod netretirane kontrole.

Korištenje arbuskularnih gljiva u rasadnicima dakle pridonosi prevenciji ove problematike bolesti, što je značajno u ekonomskom kontekstu budući da smanjuje gubitke izazvane bolestima te maksimizira financijski potencijal zasađenih biljaka.

Više je načina na koje su mikorizne gljive u inkubaciji u borbi protiv biljnih bolesti. Mikorize proizvode antibiotike sposobne odvratiti patogene korjenjake. Također imaju kapacitet selektivno transportirati soli i toksične spojeve podalje od biljnog korjenjaka (Alexander, 2016).

Bidens pilosa je biljka iz porodice *Asteraceae* koja se u nekim geografskim područjima pokazala invazivnom, pa Franca i sur. (2016) navode da se mikorizne asocijacije mogu poboljšati kompetitivnost kave s ovom biljnom vrstom. Sadnice kave su inokulirane sa sporama gljiva koje su se razvijale 120 dana, pa su nakon toga podvrgnute uvjetima kompeticije sa *B. pilosom* još 120 dana.

Inokulacija je omogućila bolji rast i opskrbu hranivima. Kompeticija sa *B. pilosom* je reducirala kolonizaciju, visinu, lisnu površinu, suhu tvar lista i stabiljike te korjenjaka, broj reproduktivnih grana i razine P i Fe u biljkama. Međutim, težina u inokuliranih *B. pilose* je bio manji kod inokuliranih biljaka, što ukazuje da se mikorizne asocijacije mogu koristiti kao pomoćne biljke u borbi sa invazivnim korovovima.

Mycosphaerella fijiensis je pak gljivni patogen koji napada gotovo sve kultivare banane za kojeg je aplikacija fungicida trenutno najraširenija mjera kontrole, dok je upotreba bioagenata gotovo ignorirana. Pod in vitro uvjetima arbuskularne gljive (*Rhizophagus irregularis* MUCL 41833) mogu smanjiti posljedice ove bolesti na banani. Gljive mogu smanjiti, barem u početnom stadiju infekcije, simptome ovog patogena što mogu učiniti putem indukcije sistemskog otpora. Vrijeme smanjenja simptoma zapaženo kod mikoriziranih banana ukazuje da ovi mikroorganizmi predstavljaju potencijalno atraktivnu opciju u kontekstu integralne kontrole ove opasne bolesti (Oye Anda i sur., 2014).

7.8. Korist mikoriznih asocijacija za tlo

Uloga gljiva u tlu dobro je poznata: one služe kao razlaga i organske tvari, kao izvor hrane, no ono što je osobito značajno za poljoprivrednu praksu je sposobnost gljiva da utječu na agregate tla.

Tijekom i grananjem micelija u tlu one direktno utječu na strukturu te vodozadržavaju i reflektiraju tla, smanjuju gubitke hraniva putem ispiranja a samim time i ispiranje fosfora i drugih elemenata. Na taj način indirektno utječu na vodne sustave te smanjuju nagomilavanje kemijskih elemenata u tlu. Ovi učinci postižu se putem poboljšanog usvajanja hraniva od strane biljke, što smanjuje količinu nakupljenih elemenata u tlu, a samim time se smanjuju potrebe za unošenjem kemijskih gnojiva u tlo.

Stamets (2005) je detaljno obradio naime na koji se mikorizne gljive mogu iskoristavati u svrhu čišćenja tla od teških metala i toksičnih otpada, putem procesa mikorestoracije i mikoremedijacije, kao mikopesticidi smanjuju i zagađenja primjenom kemijskih sredstava za čišćenje, te u popravljanju tala sa smanjenom koncentracijom hraniva, kao što su tla u blizini rudnika, time se ubrzava obnavljanje tala na takvim područjima.

Mnoge gljive iz umjerenog pojasa proizvode glikoproteine koji tokom niskih temperatura utječu na gljivu od smrzavanja tako što služe kao zaštitna micelija od čestih u inak kristalizacije vode u led. Isto utječu na tlo od smrzavanja, time se zaštitna prenosi na biljke tijekom ekstremnih hladnoća (Stamets, 2005).

Pozitivni učinci mikoriznih asocijacija na strukturalna svojstva tla su dobro poznati, pa je logično zaključiti da se mikorizne gljive mogu pokazati korisnima kod uzgoja biljnih vrsta na tlima sa većim udjelom pijeska koja su radi svoje strukture sklona ispiranju hraniva te koja su manje stabilna u odnosu na druge tipove tala.

U tom su se kontekstu korisnima pokazale četiri vrste arbuskularnih gljiva ó *Claroideoglossum tunicatum*, *Diversipora versiformis*, *Funneliformis mosseae* i *Rhizophagus intraradices* u simbiozi sa korjenovim sustavom naranče (*Poncirus trifoliata*) uzgajane u pijesku.

Inokulirane sadnice pokazale su značajno veću gustoću korjenovih dlačica nego kontrola, nevezano za soj gljiva - inokulacija je značajno smanjila dužinu korjenovih dlačica kod lateralnog korjenja prvog i drugog reda ali je povećala dužinu lateralnog korjenja trećeg i

etvrtog reda. Pronađene su značajno veće koncentracije fosfora, NO, glukoze, sukroze i fitohormona auksina - IAA na korjenju mikoriziranih sadnica u usporedbi sa kontrolom. Koncentracije P, NO, ugljikohidrata i IAA u korjenju korelirale su sa razvojem mikoriza i razvojem korjenovih dlačica (Wu i sur., 2016).

Arbuskularne gljive dakle mogu mijenjati profil korjenovih dlačica kod naranče kroz modulaciju fizioloških aktivnosti. *F. mossaceae*, pokazala je najbolje rezultate te bi mogla predstavljati u inkovitu gljivu za povećanje prinosa voća ili za smanjenje razina korištenih gnojiva u proizvodnji citrusa.

Dobro je poznato da mikroorganizmi imaju sposobnost svojim djelovanjem mijenjati pH vrijednost tla bilo putem oksidacije sumpora i amonijaka, što otpušta H^+ ion u tlo, bilo putem proizvodnje organskih kiselina. Ne smije se zaboraviti ni pozitivna ili negativna nabijenost organskih molekula od kojih je sastavljena površina tih mikroorganizama, što znači da se mikroorganizmi i tlo mogu svojom pH vrijednosti međusobno odbijati ili privlačiti.

Taj je podatak značajan za voćne vrste koje imaju zahtjeve za kiselo tlo, poput borovnice. Waters i sur. (2008) navode da arbuskularna mikoriza na borovnici pokazuje rezultate u povećanom usvajanju gnojiva čak i kod smanjene gnojidbe. Takvo smanjenje u količini unesenog gnojiva također ima utjecaj na okoliš u kontekstu smanjivanja potencijalnog ispiranja hraniva u zemljane i vodne resurse, posebice uzevši u obzir to da borovnice preferiraju amonijski oblik dušika. Ovakvi rezultati sugeriraju mogućnost uspješne i ekonomski isplative voćarske proizvodnje i pri smanjenoj aplikaciji gnojiva, što uz ekonomske uštede predstavlja dobrobit za tlo i okoliš radi smanjenog unosa gnojiva.

7.9. Utjecaj okolišnih faktora i agronomskih zahvata na mikorizu

Za uspješno upravljanje mikoriznim asocijacijama potrebno je proučiti i uzeti u obzir utjecaj tla, i ako utječe, na koji način, različiti agronomski zahvati, uvjeti u tlu te ostali faktori na uspostavljanje, razvoj i na kraju uspješnost te korisnost mikoriza.

Ukoliko želimo maksimizirati uspješnost mikorizne kolonizacije te izvući najviše mogući potencijal iz uspostavljene mikorize, potrebno je proučiti na koji način okolišni uvjeti, izbor kultivara, radovi u nasadu i slične prakse utječu na prisustvo i u inkovitost mikoriznih gljiva.

Tako je za uspješnu infekciju ektomikoriznom gljivom važna selekcija kultivara, obrada tla prije sadnje i plodored. Ovi bi parametri mogli potencijalno utjecati na intenzitet i distribuciju ektomikorizne infekcije u komercijalnoj upotrebi.

Pokazalo se da na distribuciju i intenzitet ektomikoriznih gljiva pakuje i tip maline, oranje tla, tip i količina primjenjenog gnojiva i tretmani prije sadnje.

Indirektni faktori koje treba uzeti u obzir su dob biljaka i nasada i faktori tla kao što su pH i količina hraniva u tlu (Waters i sur., 2008).

Primjena sredstava za zaštitu, kao što je fumigacija i termička sterilizacija tla također utječu na kolonizaciju arbuskularnim gljivama. Koron i sur. (2014) navode da tretmani biofumigacije, zagrijavanja tla te kemijska fumigacija značajno smanjuju mikoriznu kolonizaciju u usporedbi sa netretiranom kontrolom kod jagoda.

Autori navode da se, unatoč smanjenoj kolonizaciji, biofumigacija može pokazati dobrim izborom s obzirom na veću količinu plodova i veću masu lišća jagode te predstavlja nekemijsku metodu fumigacije koja se može koristiti u održivoj proizvodnji jagoda.

Budući da u hortikulturi, naročito u voćarstvu, mnoge vrste prolaze kroz različite tretmane dozrijevanja te tretmane nakon berbe, Chialva i sur. (2016) navode biljne odgovore na arbuskularne gljive tokom dozrijevanja rajčice, ovisno o tome da li se primjenjuje etilen ili svjetlosna recepcija.

Budući da su simbioza arbuskularnom gljivom utječu na dozrijevanje rajčice, moguće je da dolazi do međusobnog utjecaja simbioze i samog dozrijevanja.

Oba tretmana za dozrijevanje pokazuju različitu funkcionalnost arbuskula. Mikoriza nije dovela do veće koncentracije fosfata u plodovima kod oba tretmana za dozrijevanje. Iz toga se može zaključiti da tretmani utječu na arbuskularnu mikorizu inducirajući i sistemske promjene u biljnoj fenologiji i metabolizmu voća. Hipoteza je da postoji međusobni utjecaj između mikorize i procesa dozrijevanja koji uključuje gene povezane sa etilenom i svjetlosnom signalizacijom, međutim potrebno je provesti dalje studije kako bi se točno utvrdili mehanizmi koji stoje iza toga (Chialva i sur., 2016).

Kako bi se proučavale interakcije recipročnih utjecaja biljnih zajednica i mikoriznih gljiva, potrebno je proučiti međusobne interakcije različitih imbenika u ekosustavu. Derelle i sur. (2015) navode da gustoća biljaka nema utjecaja na inkubaciju ali da mjehuravina kultura pozitivno utječe na

kolonizaciju u usporedbi s područjima kakva karakteriziraju monokulture. Kolonizacija korijena ne varira puno s obzirom na gustoću u biljaka ali asocijacija sa više biljnih vrsta povećava porporcije arbuskula u korjenju u odnosu na monokulture.

Razni agrotehnički zahvati u tkođer zauzimaju važnu ulogu u održavanju raznolikosti arbuskulatnih gljiva u poljoprivrednim tlima.

Alguacil i sur. (2014) navode da se distribucija zajednice arbuskularnih gljiva kod breskve, *Prunus persica*, razlikuje kao posljedica različitih tipova gnojidbe u kombinaciji sa kemijskim sredstvima za zaštitu. Distribucija zajednice gljiva se razlikovala kao posljedica tretmana. Tretmani koji su kombinirali organska i anorganska gnojiva sa kemijskim sredstvima za zaštitu su imali najviše bogatstvo gljiva te tretmani koji su kombinirali anorganska gnojiva sa kemijskim sredstvima su imali najniže.

Na in upravljanja usjevom mofle dakle vršiti značajan utjecaj na populaciju arbuskularnih gljiva. Tretmani koji kombiniraju organsku i mineralnu gnojidbu se čine najprimjerenijom strategijom s obzirom na pokušaj popravljanja raznolikosti mikoriznih gljiva u tropskim uvjetima i održavanju održivosti agroekosustava.

Kontrola temperature, naročito u hidroponskom uzgoju, pozitivno utječe na usvajanje Mn i Zn kod mikoriziranih biljaka (Maboko i sur., 2013). Također se i upotreba zelenog komposta u kombinaciji sa arbuskularnim gljivama pokazuje dobrim tretmanom jer pozitivno utječe na kvalitetu plodova kod rajčice (Copetta i sur., 2011), jednako kao i vermikompost (Javanmardi i sur., 2014). Kod voćne vrste *Litchi chinensis* Sonn. se tehnika zarezivanja kore (prstenovanje) pokazala vrlo učinkovitom u kombinaciji s mikoriziranjem (Shu i sur., 2016). Ovaj tretman u kombinaciji sa mikoriznom simbiozom značajno utječe na razine saharoze te neutralne i kisele invertaze. U kombinaciji s ovim tretmanom kolonizacija arbuskularnim gljivama je puno osjetljivija na prisustvo ugljikohidrata. Na kraju, dokazano je da tehnika zarezivanja kore stabala vrlo vjerojatno ima utjecaja na stupanj kolonizacije te na dužinu korjenovih dlačica, i to putem smanjenog sadržaja ugljikohidrata i putem reguliranja aktivnosti enzima saharoze.

Stamets (2005) navodi studiju sa američkom duglazijom, *Pseudotsuga menziesii* i brezom *Betula papyrifera*, dvjema vrstama koje su dijelile istu arbuskularnu gljivu, no, jedno od drveća, *P. menziesii* je uzgajano u uvjetima duboke hladovine kako bi se smanjila sposobnost

drveta da fotosintetizira –e ere. Kao odgovor na to mikoriza je kanalizirala –e ere, koji su pra eni putem radioaktivnog ugljika, iz zone korjena *Betule papyrifere* ka *P. menziesii*. ak je 9 % ugljikohidrata preneseno iz *B. papyrifere*. Ovo dokazuje da je koli ina translociranog –e era bila direktno proporcionalna koli ini sjene, –to zna i da su mikorize sposobne odrflavati vi–e razli itih vrsta na na in da translociraju hraniva iz jedne u drugu i time doprinose ravnotefli u –umskom ekosustavu.

Obzirom na brojna istraflivanja koja dokazuju u inak razli itih agrotehni kih zahvata, poput oranja, mal iranja, fumigacije, gnojidbe, navodnjavanja i dr. na uspostavu i u inkovitost mikoriznih asocijacija na tlu, te samim time i na njihovu dobrobit za biljku i nasad, jasno je da se na in primjene ovih radnji treba barem djelomi no prilagoditi mikoriznim gljivama.

8. Primjena molekularnih metoda u identifikaciji mikoriznih gljiva

8.1. Identifikacija mikoriznih gljiva

Konvencionalne metode identifikacije gljiva su se esto oslanjale na identifikaciju simptoma bolesti, izolacije i laboratorijske identifikacije po morfolo-kim karakteristikama i biokemijskim testovima, prema otpornosti na antibiotike, serolo-ka svojstva, analizom stani nih proteina i osjetljivosti na bakteriofage. Iako su ove metode i dalje temeljne, problem sa tradicionalnim metodama identifikacije je to -to nisu dovoljno precizne u odre ivanju pojedinog soja, zahtijevaju ve e koli ine vremena i ne mogu se primjeniti na ve em broju uzoraka (Blafinkov, 2006).

Neke molekularne metode identifikacije gljiva temeljene su na PCR te DNK/RNA metodama. PCR metode identifikacije i kvantifikacije gljiva pokazale su se kao korisni alati, ali je i dalje nufno kombinirati novu tehnologiju sa konvencionalnim metodama kako bi se potpuno razumijeje interakcije u okoli-u.

Na raspolaganju je i kloniranje, koje slufla za dobivanje vi-e kopija gena ili nekog drugog djeli a DNK u uzorcima koji proizvode mije-ane PCR produkte te kvantitativnu PCR ili real-time PCR metodu.

8.2. Izolacija DNK mikoriznih gljiva iz uzorka tla

Prije izolacije DNK mikorizne gljive, uzorci tla i vrhova korjenja mogu se skladi-titi nekoliko dana na 4°C, me utim treba ih obraditi -to je brfle mogu e kako bi se sprije ila degradacija i smanjila kontaminacija drugim gljivama. Za dugoro no skladi-tenje uzorci se trebaju uvati na -20°C.

U inkovita izolacija DNK je klju na za identifikaciju, a sami DNK protokoli ovise o izvoru uzoraka te kvaliteti i duffini DNK segmenta koji se analizira. Polifenoli, neke kiseline iz tla i tanini mogli bi inhibitorno djelovati na PCR reakciju pa uzorke treba pro istiti od navedenih supstanci. Osim DNK, RNA se tako er mofle izolirati i to u ve im koli inama nego DNK budu i da se u stanicama nalazi u ve oj koli ini. RNA pak zahtijeva posebne procedure

ekstrakcije i ne može se dugoročno skladištiti jer je puno podložnija degradaciji i kontaminaciji.

Za PCR amplifikaciju ciljanog DNK fragmenta ključna je kvaliteta i količina DNK. DNK se može kvantificirati putem elektroforeze ili putem spektrofotometra kako bi se procijenila koncentracija izolirane DNK. Prva procedura ima prednost u tome što omogućava procjenu kontaminacije sa RNA i procjenu kvalitete DNK, međutim DNK u vrlo malim količinama može biti nevidljiva na gelu pa je potrebna amplifikacija PCR metodom. DNK se može prikupiti direktno, liziranjem stanica u uzorku tla ili indirektno, iz uzorka tla prije liziranja pri čemu direktna metoda prikuplja više materijala i uzorak je manje kontaminiran (Suzić i sur., 2008).

8.3. PCR metode

PCR je skraćeni naziv za Polymerase Chain Reaction (lančana reakcija polimerazom), odnosno u širem kontekstu za tehniku koja se koristi u molekularnoj biologiji, a odnosi se na enzimatsku sintezu specifičnih sekvenci DNA (Blafinkov, 2006), pri čemu je moguće dobiti tisuće pa čak i milijune kopija određene DNK sekvence.

PCR metode zasnivaju se na amplifikaciji DNK sekvence, pri čemu se koriste odabrane početnice, odnosno kratki odsjeci DNK, na koje se razdvojeni lanci genomske DNK vežu te se na taj način dobivaju genomske otiske na temelju kojih se vrši diferencijacija i identifikacija sojeva (Vasilj, 2013). Sama metoda odvija se u tri faze: faza denaturacije u kojoj dolazi do razdvajanja lanca DNK, faza sparivanja početnice na slobodne krajeve dva suprotna lanca i faza sinteze, odnosno produljenja komplementarnih lanaca nukleotida. Time se dobiva nova molekula DNK koja se zatim koristi kao kalup u sljedećim PCR ciklusima (Pohajda, 2011).

Izolacija DNK zajedno sa PCR amplifikacijom značajno poboljšava detekciju i identifikaciju mikroorganizama. Kod identifikacije ektomikoriznih gljiva primjerice, rRNA geni prisutni i u jezgri i u mitohondrijima su najčešće ciljani dio za PCR amplifikaciju.

Za DNK replikaciju je nužna DNK polimeraza, odnosno enzim koji katalizira proces amplifikacije. Koriste se početnice specifične za gljive, ITS1 i univerzalna reverzna početnica ITS4, naročito kod identifikacije ektomikoriznih gljiva (Suzić i sur., 2008).

DNK amplificirana kroz različite PCR metode se dobiva iz raznih endo i ektomikoriznih gljiva čak i od malog broja spora (Manian i sur., 2001).

PCR metode omogućavaju proučavanje uzoraka bez potrebe za kulturom organizama –to omogućava bolje razumijevanje uloge mikoriznih gljiva u kompleksnim sustavima.

8.4. DNK sekvencioniranje

Ova metoda omogućava određivanje sekvence DNK segmenta koji se proučava. Sekvencioniranje je najnovija tehnika identifikacije gljivih vrsta a koristi se na PCR produktima direktno ili nakon kloniranja (Suz i sur., 2008). Laser unutar automatskog uređaja za DNK sekvencioniranje se koristi za analizu proizvedenih DNK fragmenata. Time se sastav i red cijele sekvence može dobiti i za sve sekvence od fiksne točke pa sve do zadnje specifične baze.

8.5. Identifikacija i kultivacija ektomikoriznih gljiva

Procese identifikacije i kultivacije ove skupine gljiva detaljno su opisali Suz i suradnici (2008). Autori raznolikost ektomikoriznih gljiva temelje na identifikaciji pod mikroskopom i filotipiziranju (molekularnoj karakterizaciji). Ektomikorizne gljive se mogu karakterizirati i putem morfološkog opisa sporokarpa, no nedostatak ovog načina je pretpostavka da gljive koje rastu u blizini ektomikoriza zapravo i tvore ektomikorize, –to ne mora biti tako. Morfotipizaciju opisuju kao relativno povoljnu metodu, no ovaj način zahtijeva temeljitu obuku i znanje u prepoznavanju ključnih mikroskopskih karakteristika gljive te ne garantira uvijek identifikaciju na razini roda i vrste gljiva.

Filotipizacija zahtijeva nešto skuplje materijale ali zato uglavnom omogućava identifikaciju roda i vrste, te su kemijske reakcije korisne u identifikaciji sporokarpa i ektomikoriza.

Jako je malo ektomikoriznih gljiva detaljno opisano. Poznavanje morfologije je korisno ali se ne smatra pouzdanom metodom identifikacije budući da boja, grananje i veličina mikoriznog sustava ovise o uvjetima rasta i biljci domaćinu. Identifikacija pod mikroskopom je ograničena posebice kad su u pitanju rodovi *Russula*, *Lactarius* i *Cortinarius*.

Kako bi se pak proučavala struktura te morfološke i anatomske karakteristike, ektomikorizne gljive moraju biti netaknute pri uzorkovanju. Uzorci se mogu prikupiti sa korjenja ili pratećih hife koje se pružaju do rizomorfa ili sporokarpa. U oba slučaja uzorke treba uzeti zajedno sa

tlom, kako bi se osiguralo da poveznice izme u ektomikoriznog korjenja, hifa i rizomorfa nisu o-te ene ili prekinute.

Prikupljene uzorke moľemo skladi-titi do dva tjedna u plasti nim vre ama na 4°C.

Uzorke treba njeľno isprati kako bi se uklonilo tlo, no pritom treba paziti da se ektomikoriza ne o-teti te se pregledava gusto a mikorize i izraľava kao broj flivih mikoriza po metru korjena. Korjenje se pregledava pod mikroskopom, a prou avaju se boja, tip grananja, veli ina i tekstura, prisustvo hifa, cistidija rizomorfa te sklerocija (Suz i sur., 2008).

8.6. Identifikacija arbuskularnih gljiva

Budu i da se arbuskularne mikorize ne mogu uspje-no kultivirati bez biljke doma ina, bilo je mnogo poku-aja uzgoja ovih gljiva u sterilnim uvjetima i na raznim medijima no dosad bez puno uspjeha. Unato tome, mogu e je izdvajati kulture arbuskularnih gljiva putem nekoliko metoda. Pritom je najjednostavnije uzorak sa terena pomije-ati sa neinficiranim supstratom te zatim u takvom supstratu uzgojiti sjeme ili presadnice biljke doma ina i pustiti da se razvije mikoriza. Proces uspostavljanja mikorize obi no traje izme u jednog i -est mjeseci, no ova metoda uglavnom rezultira mije-anim inokulumom koji moľe posluľiti kao baza za daljnju izolaciju.

Dalje, mogu se uzeti presadnice sa terena na kojemu je utvr ena arbuskularna mikoriza ó takvim presadnicama se paľljivo pere korjenje kako bi se uklonio vi-ak zemlje i eksternog miceija te ih se sadi u prikladni sterilni supstrat. Ova metoda esto rezultira mije-anom kulturom mikoriza budu i da biljke doma ini mogu uspostaviti mikorizu sa simbionata, no nekada se dogodi da se razvije samo jedan soj.

Arbuskularne gljive moľemo razmnoľavati i putem malih djeli a korjenja koje stavljamo u kontakt sa nemikoriziranom biljkom doma inom u sterilnom supstratu. Ukoliko se koriste dovoljno sitni djeli i korjena, moľe se dobiti jednovrsna kultura.

Najpreciznija metoda, me utim, je sortiranje spora pod mikroskopom te kori-tenje nekoliko sli nih spora na nemikoriziranoj biljci doma inu (Walker, 1999).

PCR tehnike su postale obavezne za dobivanje dostatnih koli ina DNK, budu i da je ove organizme u pravilu nemogu e uzgojiti u kulturi te time samo mala koli ina DNK moľe biti izolirana iz spora i inficiranog korjenja (Reddy i sur., 2005).

Kako bi se postigli maksimalni rezultati, prikupljanje uzoraka treba biti dobro isplanirano te pažljivo provedeno. Potrebno je uzorkovati rizosferu biljke domaćina na dubini do 30 cm i broj prikupljenih uzoraka ovisi o topografiji mjesta, no prosječno to biti 3 do 15 uzoraka. Vrlo je važno da se pri prikupljanju uzoraka vodi računa o podacima o gljivama i okolišu u kojima su nastale, kao što su primjerice biljke koje rastu u blizini te svojstva tla.

Na zraku proučeni uzorci tla sa sporama se mogu pohranivati u hermetički zatvorenim plastičnim vrećicama koje se zatim mogu skladištit na hladnom sve do daljnjeg procesuiranja. Izolacija spora arbuskularnih gljiva se postiže mokrim prosijavanjem uzorka tla, čemu slijedi centrifugiranje i nakon centrifugiranja spore se prenose na petrijevku te se broje pod stereomikroskopom pod povećanjem od 100x. Koncentracija spora se izražava kao broj spora po gramu tla.

Spore se kategoriziraju ovisno o obliku, veličini i boji (Sasvari i sur., 2012). Propagule arbuskularnih gljiva mogu se sastojati od klamidospora ili azigospora te vezikula i micelija i sveukupno nazivaju se mijeliumi dok odvojene spore predstavljaju isti inokulum.

8.6.1. Inokulacija biljaka domaćina arbuskularnom gljivom

Površina sjemenke biljke domaćina treba biti sterilna, te je kod nekih vrsta sa dormantnim sjemenjem nužno dodatni tretman kako bi se osiguralo klijanje. Klijanje se inducira tako da se sjemenke drže izmeću u dvaju vlažnih papirnatih ručnik u zatvorenoj plastičnoj vrećici radi omogućavanja vlažnosti ali i radi omogućavanja protoka zraka.

Važno je da izabrani supstrat nema visoke koncentracije fosfora, budući da se pokazalo da arbuskularne mikorize najbolje uspijevaju na tlima sa niskim koncentracijama P te populacijska raznolikost vezikularno-arbuskularnih mikoriza značajno korelira sa dostupnim P_2O_5 u tlu (Suchitra i sur., 2012).

Medij za rast mora biti sterilan kako bi se osiguralo uspješno formiranje mikorizne asocijacije sa biljnim korjenom i kako bi se onemogućili eventualni patogeni ili kompeticija sa drugim mikroorganizmima tla. Inokulacija se vrši u omjeru 1 jedinice inokuluma naprama 20 jedinica supstrata. U takav se medij pohranjuje sterilno sjeme te se svakodnevno zalijeva vodom, sve dok voda ne počne otjecati iz posude u koju se sadi.

Primjenjuje se gnojidba sa niskim koncentracijama fosfora te se nakon otprilike 6 tjedana može provjeriti prisustvo mikorize (Miyasaka i sur., 2003).

9. Zaključak

Mikorizne asocijacije su se kroz brojna istraživanja pokazala izrazito korisnima za voćarsku proizvodnju i poljoprivredu općenito, no naftalost, upotreba mikoriznih gljiva još uvijek nije raširena i tek se polako počinje prepoznavati njihova komercijalna i ekološka vrijednost. Kao heterotrofni organizmi koji se hranidbeni obrasci razlikuju, mogu rasti u simbiozi sa različitim vrstama biljaka. Obzirom na svoju mogućnost mijenjanja fizikalnih i kemijskih svojstava tla, možemo ih koristiti na širokom rasponu različitih tala.

Mogu se koristiti u smanjivanju gubitaka hraniva iz tla do kojih dolazi putem raznih prirodnih pojava te općenito poboljšati usvajanje vode od strane biljke, čak i u uvjetima suše, budući da se hife gljiva u tlu šire daleko dalje nego korjenje biljaka –to omogućava biljci usvajanje vode i izvan nutritivno deficitarne zone kakva se formira u neposrednoj blizini korijena.

Njihova korist ne staje samo u voćarskoj proizvodnji ili poljoprivredi, već u globalnom ekološkom kontekstu u vidu rješavanja brojnih problema kakvi nastaju kao produkti suvremenog života.

Mikorizne gljive predstavljaju nužan preduvjet za vraćanje globalne ekološke ravnoteže.

Bilo kakvi pokušaji vraćanja prirodne ravnoteže, bilo da se radi o područjima oko rudnika gdje je tlo postalo nepogodno za rast velikog broja biljaka, mjestima zahvaćenima ekološkim katastrofama ili bilo kojim lokacijama na kojima je iz nekog razloga oštećena ili čak nemoguća sadnja drveća, neće se moći odvijati bez upotrebe mikoriznih gljiva.

Mikorizne gljive svojim grananjem kroz veliki volumen tla, putem micelija koji mogu neograničeno rasti, imaju mogućnost takva područja ponovno učiniti pogodnima za rast vegetacije, bilo da se radi o pošumljavanju ili podizanju novih voćnjaka na tlima na kojima prethodno voćne vrste nisu rasle. Mogućnost rasta hifa kroz veliki volumen tla je posebno zanimljiva jer omogućava korištenje gljiva u svrhu razvoja novih biotehnologija, kao bioindikatori onečišćenja ili prisustva teških metala. Na taj se način mikorizne gljive mogu pokušati koristiti u borbi protiv oštećenja i šteta izazvanih ljudskim djelovanjem.

Još jedan zanimljiv primjer je upotreba gljive u filtraciji fekalnih otpadnih voda. Na taj se način mogu u inkubatoru pripremiti, ili barem smanjiti bakterijsko onečišćenje vodnih tokova.

Bilo da se radi o ekološkom ili poljoprivrednom kontekstu, bila bi velika šteta i propust zanemariti ove mikroorganizme u suvremenoj poljoprivrednoj i ekološkoj praksi.

10. LITERATURA

1. Aleandri M.P., Martignoni D., Reda R., Chilosi G. (2015). Effects of Preconditioning through Mycorrhizal Inoculation on the Control of Melon Root Rot and Vine Decline Caused by *Monosporascus cannonballus*. *J Phytopathol* 163 (2015) 8986907 < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jph.2015.163.issue-11-12/issuetoc>>
2. Alguacil M., Torrecillas E., Lozano Z., Torres M.P., Roldan A. (2014). *Prunus persica* Crop Management Differentially Promotes Arbuscular Mycorrhizal Fungi Diversity in a Tropical Agro-Ecosystem. *PLoS ONE* 9(2): e88454 < www.plosone.org>
3. Almeida A.M., Freire Gomes V.F., Mendes Filho P.F., Feitosa de Lacerda C., Dias Freitas E. (2016). Influence of salinity on the development of the banana colonised by arbuscular mycorrhizal fungi. *Revista Ciência Agronômica*, v. 47, n. 3, p. 421-428 < www.ccarevista.ufc.br>
4. Ban D., Goreta Ban S., Oplani M., Horvat J., Novak B., fiani K., finidar i D. (2011). Growth and yield response of watermelon to in-row plant spacings and mycorrhiza. *Chilean Journal of Agricultural research* 71(4) < <http://www.scielo.cl/pdf/chiljar/v71n4/at01.pdf>>
5. Baum C., El-Tohamy W., Gruda N. (2015). Increasing the productivity and product quality of vegetable crops using arbuscular mycorrhizal fungi: A review. *Scientia Horticulturae* 187 (2015) 1316141 < www.elsevier.com/locate/scihorti>
6. Blaffinkov, M., (2006.). Geneti ka raznolikost prirodnih populacija *Rhizobium leguminosarum bv.viciae* u klima ekolo-kog podru ja sjeverozapadne Hrvatske. Doktorska disertacija, Agronomski fakultet, Sveu ili-te u Zagrebu
7. Bona E., Lingua G., Manassero P., Cantamessa S., Marsano F., Todeschini V., Copetta A., D'Agostino G., Massa N., Avidano L., Gamalero E., Berga G. (2014). AM fungi and PGP pseudomonads increase flowering, fruit production, and vitamin content in strawberry grown at low nitrogen and phosphorus levels. *Mycorrhiza* (2015) 25:1816193 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25169060>
8. Bowles T.M., Barrios-Masias F.H., Carlisle E.A., Cavagnaro T.R., Jackson L.E. (2016). Effects of arbuscularmycorrhizae on tomato yield, nutrient uptake, water relations, and soil carbon dynamics under deficit irrigation in field conditions. *Science*

- of the Total Environment 5666567 (2016) 122361234 <
www.elsevier.com/locate/scitotenv>
9. Calvo-Polanco M., Sanchez-Castro I., Cantos M., Garcia J.L., Azcon R., Ruiz-Lozano J.M., Beuzon C.R., Aroca R. (2016). Effects of different arbuscular mycorrhizal fungal backgrounds and soils on olive plants growth and water relation properties under well-watered and drought conditions. *Plant, Cell and Environment* (2016) 39, 24986-2514 < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/pce.v39.11/issuetoc>>
 10. Castillo C., Sotomayor L., Ortiz C., Leonelli G., Borie F., Rubio R. (2009). CHILEAN JOURNAL OF AGRICULTURAL RESEARCH 69 (1): 79-8 < <https://doaj.org/article/2125a414fa2c436aab9a071457b39422>>
 11. Cavagnaro T.R., Barrios-Masias, F.H., Jackson L.E. (2012). Arbuscular mycorrhizas and their role in plant growth, nitrogen interception and soil gas efflux in an organic production system. *Plant Soil* (2012) 353:1816194
<https://www.researchgate.net/publication/225551112_Arbuscular_mycorrhizas_and_their_role_in_plant_growth_nitrogen_interception_and_soil_gas_efflux_in_an_organic_production_system>
 12. Cavagnaro T.R., Bender S.F., Asghari H.R., Heijden M.G.A. (2015). The role of arbuscular mycorrhizas in reducing soil nutrient loss. *Trends in Plant Science*, May 2015, Vol. 20, No. 5 < <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2015.03.004>>
 13. Cecatto A.P., Ruiz F.M., Oliveira Calvete E., Martinez J., Palencia P. (2016). Mycorrhizal inoculation affects the phytochemical content in strawberry fruits *Maringá*, v. 38, n. 2, p. 227-237 < <http://www.uem.br/acta>>
 14. Chialva M., Zouari I., Salvioli A., Novero M., Vrebalov J., Giovannoni J.J., Bonfante P. (2016). Gr and hp-1 tomato mutants unveil unprecedented interactions between arbuscular mycorrhizal symbiosis and fruit ripening. *Planta* (2016) 244:1556165 < <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00425-016-2491-9>>
 15. Copetta A., Bardi L., Bertolone E., Berta G. (2011). Fruit production and quality of tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.) are affected by green compost and arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Biosystems*, Vol. 145, No. 1, < <http://www.tandfonline.com/toc/tplb20/145/1> >
 16. Derelle D., Courty P., Dajoz I., Declerk S., Aarle I.M., Carmignac D., Genet P. (2015). Plant identity and density can influence arbuscular mycorrhizal fungi colonization, plant growth, and reproduction investment in coculture. *Botany* 93: 4056-412 < <http://dx.doi.org/10.1139/cjb-2014-0180>>

17. Druffli Orli J., (2004.). Utjecaj arbuskularno mikoriznih gljiva roda *Glomus* na rast i razvoj vo ne podloge *Prunus cerasifera* L. klon MrS 2/5. Magistarski rad, Agronomski fakultet, Sveu ili-te u Zagrebu
18. Forge T., Neilsen G., Neilsen D. (2015). Organically acceptable practices to improve replant success oftemperate tree-fruit crops. *Scientia Horticulturae* 200 (2016) 2056-214 < www.elsevier.com/locate/scihorti >
19. Franca A.C., Flavia de Freitas A., Aparecido dos Santos E., Graziotti P.H., Carvalho de Andrade Junior V. (2016). Mycorrhizal fungi increase coffee plants competitiveness against *Bidens pilosa* interference. < <http://www.revistas.ufg.br/pat>>
20. Guissou T., Babana A.H., Sanon K.B., Ba A.M. (2016). Effects of arbuscular mycorrhizae on growth and mineral nutrition of greenhouse propagated fruit trees from diverse geographic grovenances. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2016 20(3), 417-426 < <http://www.pressesagro.be/ojs/index.php/base/article/viewFile/1841/826>>
21. Husnjak S., (2014). *Sistematika tala Hrvatske*. Hrvatska Sveu ili-na Naklada, Zagreb
22. Imamura A., Yumoto T. (2007.) Dynamics of fruit-body production and mycorrhiza formation of ectomycorrhizal ammonia fungi in warm temperate forests in Japan. *Mycoscience* (2008) 49:426-55 < <https://link.springer.com/article/10.1007/s10267-007-0393-1>>
In: *Mycorrhiza: Occurrence in Natural and Restored Environments*, Nova Science Publishers, 975-1-61209-226-3
23. Javanmardi J., Zarei M., Saei M. (2014). Influence of arbuscular mycorrhizal fungi on physiology and fruit quality of Pepino (*Solanum muricatum* Ait.) in vermicompost amended medium. *Adv. Hort. Sci.*, 2014 28(1): 35-42 < <http://web.b.ebscohost.com> >
24. Kara Z. Arslan D. Guler M. Guler S. (2015). Inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and application ofmicronized calcite to olive plant: Effects on some biochemicalconstituents of olive fruit and oil. *Scientia Horticulturae* 185 (2015) 2196-227 < www.elsevier.com/locate/scihorti>
25. Kaya C., Ashraf M., Sonmez O., Aydemir S., Tuna A.L., Cullu M.A. (2009). The influence of arbuscular mycorrhizal colonisation on key growth parameters and fruit yield of pepper plants grown at high salinity. *Scientia Horticulturae* 121 (2009) 166 < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030442380900003X>>
26. Kaya C., Higgs D., Kirnak H., Tas I. (2003). Mycorrhizal colonisation improves fruit yield and water use efficiency in watermelon (*Citrullus lanatus* Thunb.) grown under

- well-watered and water-stressed conditions. *Plant and Soil* 253: 2876292
 <<https://link.springer.com/article/10.1023/A:1024843419670>>
27. Koc A. (2015.) Effect of plant growth-promoting bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on lipid peroxidation and total phenolics of strawberry (*Fragaria × ananassa* -San Andreas) under salt stress. *Turk J Agric For* (2015) 39: 992-998
 <<http://journals.tubitak.gov.tr/agriculture/> >
 28. Koron D., Sonjak S., Regvar M. (2014). Effects of non-chemical soil fumigant treatments on root colonisation with arbuscular mycorrhizal fungi and strawberry fruit production. *Crop Protection* 55 (2014) 35e41 < www.elsevier.com/locate/cropro>
 29. Latef A.A.H.A., Chaoxing H. (2011). Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth, mineral nutrition, antioxidant enzymes activity and fruit yield of tomato grown under salinity stress. *Scientia Horticulturae* 127 (2011) 2286233 < www.elsevier.com/locate/scihorti>
 30. Maboko M.M., Bertling I., Du Plooy C.P. (2013). Effect of Arbuscular Mycorrhiza and Temperature Control on Plant Growth, Yield, and Mineral Content of Tomato Plants Grown Hydroponically. *HORTSCIENCE* 48(12):147061477. 2013.
 <<http://hortsci.ashspublications.org/content/48/12/1470.full.pdf> >
 31. Manian S., Sreenivasaprasad S., Mills P.R. (2001).DNA extraction method for PCR in mycorrhizal fungi. *Letters in Applied Microbiology* 2001, 33, 307-310 < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1472-765X.2001.01001.x/pdf>>
 32. Miyasaka S.C., Habte M., Friday J.B., Johnson E.V. (2003). Manual on Arbuscular Mycorrhizal Fungus Production and Inoculation Techniques. *Soil and Crop Management, SCM-5* <<https://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/SCM-5.pdf>>
 33. Ortas I., Ustuner O. (2014). The effects of single species, dual species and indigenous mycorrhiza inoculation on citrus growth and nutrient uptake. *European Journal of Soil Biology* 63 (2014) 64e69 < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejsobi.2014.05.007>>
 34. Oye Anda C.C., Dupre de Boulois H., Declerck S. (2014). The arbuscular mycorrhiza fungus *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833 decreases disease severity of Black Sigatoka on banana c.v. Grande naine, under in vitro culture conditions. *Fruits*, 2015, vol. 70(1), p. 37-46 <<http://www.pubhort.org/fruits/2015/1/fruits140041.htm>>
 35. Oztekin, G.B., Tuzel Y., Tuzel H. (2012). Does mycorrhiza improve salinity tolerance in grafted plants. *Scientia Horticulturae* 149 (2013) 55660 < www.elsevier.com/locate/scihorti>
 36. Pagano M.C., Cabello M.N. (2012). Ocurrence of Mycorrhizas in Highland Fileds.

37. Paul E.A., Clark F.E. (1998). *Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, San Diego
38. Pohajda, I., (2011.). *Simbiozna u inkovitost autohtonih sojeva *Rhizobium spp.* izoliranih iz tala Zagreba ke flupanije*. Disertacija, Agronomski fakultet, Sveu ili-te u Zagrebu
39. Reddy S.R., Pindi P.K., Reddy S.M. (2005). Molecular methods for research on arbuscular mycorrhizal fungi in India: problems and prospects. *CURRENT SCIENCE*, VOL. 89, NO. 10 <
<https://pdfs.semanticscholar.org/e9ef/6bf953db488ad91193a4435f3cb371d7181e.pdf>>
40. Sabella E., Nutricati E., Aprile A., Miceli A., Negro C., Rampino P., Lenucci M. De bellis L. (2016). Tuber borchii Vitt. mycorrhiza protects Cistus creticus L. from heavy metal toxicity. *Environmental and Experimental Botany* 130 (2016) 1816188 <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0098847216301113>>
41. Salvioli A., Zouari I., Chalot M., Bonfante P. (2012). The arbuscular mycorrhizal status has an impact on the transcriptome profile and amino acid composition of tomato fruit. *BMC Plant Biology* 2012, 12:44, < <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/12/44>>
42. Sasvari Z., Magurno F., Galanics D., Hang T.T.N., Ha T.T.H., Luyen N.D., Huong L.M., Posta K. (2012). Isolation and Identification of Arbuscular Mycorrhizal Fungi from Agricultural Fields of Vietnam. *American Journal of Plant Sciences*, 2012, 3, 1796-1801 < <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2012.312A220> >
43. Seifi E., Teymoor Y.S., Alizadeh M., Fereydooni H. (2014). Olive mycorrhization: Influences of genotype, mycorrhiza, and growing periods. *Scientia Horticulturae* 180 (2014) 2146219 <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423814005913>>
44. Shu B., Li W., Liu L., Wei Y., Shi S. (2016.) Effects of girdling on arbuscular mycorrhizal colonization and root hair development of litchi seedlings *Scientia Horticulturae* 210 (2016) 25633 < www.elsevier.com/locate/scihorti >
45. Smith S.E., Read D.J. (1996). *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, San Diego
46. Stamets P. (2005). *Mycelium running*. Ten Speed Press, Berkley
47. Subba Rao N.S. (1999). *Soil Microbiology*. Science Publishers, Inc., Plymouth
48. Suchitra R, Kumutha K., Balachandar D. (2012). Morpho-Typing and Molecular Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Sub-Tropical Soils of Coimbatore

- Region, Tamil Nadu, India. Indian J Microbiol. 2012 Jun; 52(2): 1456152. <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3386459/>>
49. Suz L.M., Azul A.M., Morris M.H., Bledsoe C.S., Martin M.P. (2008). Morphotyping and Molecular Methods to Characterize Ectomycorrhizal Roots and Hyphae in Soil. Soil Biology 15, DOI: 10.1007/978-3-540-75575-3 < http://cfe.uc.pt/files/Suz-Azul-Morris-Bledsoe-Martín%20Springer_Chapter.pdf >
 50. Sylvia D.M., Fuhrmann J.J., Hartel P.G., Zuberer D.A. (2005). Principles and Applications of Soil Microbiology. Prentice Hall, New Jersey
 51. Tarkka M., Frey-Klett P. (2008). Mycorrhiza helper Bacteria. U: Mycorrhiza (Varma A.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg
 <https://www.researchgate.net/publication/278717863_Mycorrhiza_Helper_Bacteria>
 52. Trouvelot S., Bonneau L. Redecker D., Tuinen D., Adrian M., Wipf D. (2015). Arbuscular mycorrhiza symbiosis in viticulture: a review. Agron. Sustain. Dev. (2015) 35:144961467 < <https://link.springer.com/article/10.1007/s13593-015-0329-7>>
 53. Upreti K.K., Bhatt R.M., Panneerselvam P., Varalakshmi L.R. (2015). Morpho-Physiological Responses of Grape Rootstock ‘Dogridge’ to Arbuscular Mycorrhizal Fungi Inoculation Under Salinity Stress. INTERNATIONAL JOURNAL OF FRUIT SCIENCE 2016, VOL. 16, NO. 2, 1916209 <
<http://dx.doi.org/10.1080/15538362.2015.1111185> >
 54. Vasilj, V., (2013.). Genetska identifikacija i simbiozna u inkovitost autohtonih sojeva *Rhizobium leguminosarum bv.viciae* izoliranih iz razli itih tipova tala Hercegovine. Doktorski rad, Agronomski i prehrambeno tehnolo–ki fakultet, Sveu ili–te u Mostaru
 55. Vukadin, B., (2014.), Zna aj i primjena mikoriznih gljiva u odrflivoj poljoprivredi i –umarstvu. Diplomski rad, Agronomski i prehrambeno-tehnolo–ki fakultet, Sveu ili–te u Mostaru
 56. Walker C. (1999). Methods for culturing and isolating arbuscular mycorrhizal fungi. Mycorrhiza News 11(2) < <https://www.researchgate.net/publication/230752336> >
 57. Waters E.K., Scagel C. F., McLean C. (2008). A Survey of Vaccinium Cultural Practices in Australia Emphasizing Implications for Mycorrhizal Infection. International Journal of Fruit Science, Vol. 8(162), < <http://www.haworthpress.com>>
 58. Wu Q., Liu C-Y., Zhang D., Zou Y., He X., Wu Q. (2016). Mycorrhiza alters the profile of root hairs in trifoliolate orange. Mycorrhiza (2016) 26:2376247 <
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00572-015-0666-z>>

59. Yao Y., Lou Y., Zhang Z., Jin L., Li C., Su F., Pei X., Wu Q., Yang S. (2016). Common mycelium network of mycorrhizas alters plant biomass and soil properties between trifoliolate orange seedlings. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 2016. 28(4): 257-263 <<http://www.ejfa.me/>>
60. Zou Y., Wu Q. (2011). Efficiencies of five arbuscular mycorrhizal fungi in alleviating salt stress of trifoliolate orange. *Int. J. Agric. Biol.*, 13: 9916995 <<http://www.fspublishers.org> >
61. Zou Y-N., Srivastava A.K., Wu Q-S. (2016). Glomalin: a potential soil conditioner for perennial fruits. *Int. J. Agric. Biol.*, 18: 293 297 <<http://www.fspublishers.org>>

Internetske stranice:

1. https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction (Pristupljeno: 7. Oflujka 2017.)
2. [https://en.wikipedia.org/wiki/Primer_\(molecular_biology\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Primer_(molecular_biology)) (Pristupljeno: 7 oflujka 2017.)
3. https://en.wikipedia.org/wiki/Restriction_fragment_length_polymorphism (pristupljeno (9. Oflujka 2017.)
4. <https://www.sciencelearn.org.nz/resources/2031-DNK-cloning> (Pristupljeno: 10. Oflujka 2017.)
5. <http://mycorrhizae.org.in> (Pristupljeno: 10. Oflujka 2017.)
6. <https://hr.wikipedia.org/wiki/Gljive> (Pristupljeno: 10. Oflujka 2017.)
7. <https://hr.wikipedia.org/wiki/Sklerocij> (Pristupljeno: 15. Oflujka 2017.)
8. <http://bioteka.hr/modules/lexikon/entry.php?entryID=133> (Pristupljeno: 15. Oflujka 2017.)
9. <http://archive.bio.ed.ac.uk/jdeacon/microbes/biotroph.htm> (Pristupljeno: 15. Oflujka 2017.)
10. <https://hr.wikipedia.org/wiki/Parazitizam/> (Pristupljeno: 5. Oflujka 2017.)
11. <http://www.agroklub.com/eko-proizvodnja/mikoriza-nova-tehnologija-u-poljoprivredi/21940/> (Pristupljeno: 5. Oflujka 2017.)
12. https://bs.wikipedia.org/wiki/Mikoriza#Tipovi_mikorize (Pristupljeno: 5. Oflujka 2017.)
13. http://www.davidmoore.org.uk/assets/mostly_mycology/diane_howarth/arbutoid.htm (Pristupljeno: 8. Oflujka 2017.)

14. http://www.davidmoore.org.uk/assets/mostly_mycology/diane_howarth/monotropoid.htm (Pristupljeno: 8. Oflujka 2017.)
15. https://en.wikipedia.org/wiki/Mycorrhiza#Monotropoid_mycorrhiza (Pristupljeno: 8. Oflujka 2017.)
16. https://bs.wikipedia.org/wiki/Mikoriza#ErikoiDNK_mikoriza (Pristupljeno: 8. Oflujka 2017.)
17. [https://en.wikipedia.org/wiki/Leaching_\(agriculture\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Leaching_(agriculture)) (Pristupljeno: 6. Oflujka 2017.)
18. <http://www.growingproduce.com/vegetables/getting-to-the-root-of-improved-fruit-and-vegetable-production/> (Pristupljeno: 10. Oflujka 2017.)
19. <http://www.motherearthnews.com/organic-gardening/gardening-techniques/mycorrhizal-fungi-zm0z14aszkin> (Pristupljeno: 15. Oflujka 2017.)

ŽIVOTOPIS

Studentica Andrea Cimpri ro ena je 29. Oflujka 1992. Godine u Zagrebu. Osnovnu i srednju –kolu poha ala je u Zagrebu, gdje je 2010. godine maturirala u Upravnoj i birotehni koj –koli, smijer poslovni tajnik. Tokom srednje –kole zavr–ila je te aj fotografije u foto klubu Zagreb. Nakon mature upisuje preddiplomski studij Hortikulture na Agronomskom fakultetu Sveu ili–ta u Zagrebu, a zatim 2013. godine diplomski studij Vo arstva tako er na Agronomskom fakultetu sveu ili–ta u Zagrebu.

Za vrijeme studija studentica je stjecala radno isustvo u Tiskari Zagreb d.o.o., 2011. god., Ve ernjem listu, 2012. god., te od 2014. godine do danas radi u Business sales odjelu u Tele2. U jesen 2015. godine upisuje Callegari –kolu mode i dizajna, smijer vizaflist, te istu zavr–ava u jesen 2016. godine te od tad radi kao asistent –minke na brojnim filmovima i televizijskim reklamama. U slobodno vrijeme studentica se bavi borila kim vje–inama, plesom te rezbarenjem drveta.