

Utjecaj arbuskularno-mikoriznih gljiva roda *Glomus* na rast i razvoj podloge MrS 2/5 (*Prunus cerasifera* L.)

Influence of arbuscular mycorrhizal fungi genera *Glomus* on growth and development of rootstock MrS 2/5 (*Prunus cerasifera* L.)

Jasmina Družić Orlić, Z. Čmelik, S. Redžepović

SAŽETAK

U ovom istraživanju proučavan je utjecaj četiriju izolata arbuskularno-mikoriznih gljiva *Glomus mossae*, *G. intraradices*, *G. coronatum* i *G. viscosum* na rast i razvoj podloge MrS 2/5 (*Prunus cerasifera* L.). Na osnovi dobivenih rezultata istraživanja možemo ustvrditi kako su svi inokulirani tretmani postigli veće vrijednosti mjerenih parametara u odnosu na kontrolne neinokulirane. To se posebno odnosi na postotak preživljavanja transplantacijskog stresa koji se kod kontrolnih biljaka kretao oko 60 %, dok je kod inokuliranih biljaka bio između 80 i 90 %. *G. mossae* pokazao se kao najuspješnija kombinacija s odabranom podlogom, no odmah iza njega je bio *G. coronatum*, tako da u nekim mjerenim parametrima među njima nije bilo statistički opravdane razlike. Najslabije rezultate unutar inokuliranih podloga imale su one tretirane s *G. viscosum*.

ABSTRACT

This research studied influence of four arbuscular mycorrhizal fungi isolates of *Glomus mossae*, *G. intraradices*, *G. coronatum* and *G. viscosum* on growth and development of rootstock MrS 2/5 (*Prunus cerasifera* L.). Inoculated treatments showed improved plant growth and development in comparison with those uninoculated. This can especially be seen in the survival percentage of transplantation stress, which was 60 % for the control and between 80-90 % for inoculated plants. The most effective symbiotic combination was host rootstock with *G. mossae*, however

G. coronatum was also a successful combination and in some investigated parameters there was no significant difference between them. Among inoculated rootstocks those treated with *G. viscosum* were the least effective.

UVOD

Sadni materijal visoke kakvoće i fitosanitetske ispravnosti je jedan od glavnih preduvjeta za unapređenje voćarske proizvodnje. Cilj modernog rasadničarstva je dobiti bezvirusne podloge i sadnice visoke kakvoće. Mikropropagacija se primjenjuje u rasadničarskoj proizvodnji kao tehnika za dobivanje kvalitetnog, sadnog materijala u kratkom vremenskom razdoblju. Problem mikropropagacijskog razmnožavanja je transplantacijski stres, koji nastaje pri prelasku biljaka iz sterilnih uvjeta komore za rast u uzgojni supstrat i proizvodne uvjete staklenika. U tom razdoblju može doći do većeg gubitka sadnog materijala. Jedan od uzroka pojačanog transplantacijskog stresa je i nedostatak mikroorganizama u uzgojnom supstratu, koji su inače prisutni u tlu, i za koje je dokazano da imaju pozitivan utjecaj na rast i razvoj biljaka (Kleinschmidt and Gerdemann 1972; Lambert et al 1979; Pons et al.; 1983). Primjenom inokulacije mikropropagacijom dobivenih podloga u rasadničarstvu sa arbuskularno mikoriznim (AM) gljivama pozitivno se utječe na preživljavanje mikropropagacijskih biljaka podvrgnutih transplantacijskom stresu (Sbrana et al. 1994). Pozitivan utjecaj inokulacije se pripisuje poboljšanoj mineralnoj ishrani, promjeni morfologije korijena, te povećanoj otpornosti ili tolerantnosti na neke patogene. (Brazanti et al. 1992, Vestberg et al. 1992, Berta et al, 1995).

Arbuskularne mikorize su simbiozne asocijacije između brojnih vrsta arbuskularno mikoriznih gljiva i korijenja većine vrsta kopnenih biljaka. Interakcija između biljke domaćina i gljive simbionta pozitivno utječe na oba partnera. Gljive koloniziraju korijen i na taj način primaju iz biljke fotoasimilate koje nisu u stanju samostalno sintetizirati, dok biljke primaju mineralna hranjiva koje su arbuskularno mikorizne (AM) gljive apsorbirale iz tla putem svoje mreže razgranatih hifa. Arbuskularne mikorize su rasprostranjene širom svijeta, te se pojavljuju u oko 80% kopnenih biljnih vrsta, u koje su uključene i najvažnije poljoprivredne kulture. Imaju vrlo važnu ulogu u održavanju plodnosti tla i ishrani biljaka, te također u održavanju ravnoteže i bioraznolikosti unutar biljnih zajednica. AM gljive pripadaju razredu *Zygomycetes*, redu *Glomales* (Smith, S.E. and Read, D.J., 1997). One su obavezni biotrofi, koje nakon uspostavljanja uspješne simbioze s biljkom domaćinom, stvaraju spore u tlu koje su sposobne

klijati i rasti. AM gljive međutim nisu sposobne stvarati veći micelij i završiti životni ciklus bez biljke domaćina (Mosse, B., 1959; Logi, C. et al., 1998). Pokusi provedeni u laboratoriju i na polju pokazali su pozitivan utjecaj AM gljiva na rast i razvoj biljaka (Gianinazzi et al., 1996, Schubert et al, 1996). Njihova učinkovitost ovisi o različitim agroekološkim uvjetima, te o interakciji između različitih vrsta i izolata AM gljiva s različitim biljnim vrstama, što sve pridonosi većoj ili manjoj djelotvornosti određene AM simbioze (Taylor and Harrier, 2000, 2001). Zato je za postizanje optimalnih rezultata, od izuzetne važnosti ustanoviti najproduktivniju kombinaciju simbioznih partnera gljive simbionta i biljke domaćina. Pri karakterizaciji AM gljiva obraća se pozornost na više parametara kao npr. njihova sposobnost infekcije, njihova djelotvornost i stupanj preživljavanja u različitim agroekološkim uvjetima, te sposobnost širenja u različitim staništima (Molina et al, 1992). Svi prije navedeni parametri vrlo su bitni ne samo pri karakterizaciji AM gljiva, nego i pri proučavanju mogućnosti njihove biotehnoške iskoristivosti u ekološki prihvatljivom sustavu gospodarenja tлом. Pri proučavanju njihove učinkovitosti, vrlo je važno uzeti u obzir njihovu sposobnost da tvore vrlo raširenu mrežu hifa, kojom prorastaju veći volumen tla i na taj način primaju, translociraju, te transferiraju mineralna hraniva u biljku. Važna je i vijabilnost izvankorijenskog micelija, brzina kojom hife apsorbiraju hraniva, te ih transferiraju i translociraju u stanice domaćina.

CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je utvrditi koja od četiri odabrane vrste AM gljiva: *Glomus mossae* izolat IMA1 41.98, *Glomus intraradices* izolat DJ. 61.98., *Glomus coronatum* izolat BEG28 81.93. i *Glomus viscosum* izolat BEG 12.98. ima najbolji učinak na preživljavanje i *post vitro* razvoj mikropropagacijom dobivenih podloga, MrS 2/5 (*Prunus cerasifera* L.).

MATERIJALI I METODE

Biljni materijal

Polivalentna podloga za koštićave vrste u voćarstvu MrS 2/5 (*Prunus cerasifera* L.) proizvedena mikropropagacijom, nabavljena je iz talijanske rasadničarske kuće Vitroplant, uvoznik poduzeće Fragaria d.o.o. Klonirane

podloge MrS 2/5 uzgajane su na modificiranom MS mediju (modificirano od Murashige and Skoog, 1964; Morini et al., 1990), uz dodatak regulatora rasta i vitamina. Točna formula medija nije se mogla dobiti zbog zaštite komercijalnih interesa proizvođača rasadnog materijala. Mikropropagacijom dobivene mikropodloge uzgajane su u komorama za rast pri fotoperiodu od 16 h, 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fotonskom zračenju i temperaturi od 21 °C (podaci dobiveni od proizvođača).

Inokulum

Izvorni inokulum dobiven je od Banke gena Instituta za mikrobiologiju tla, C.N.R., Sveučilišta u Pisi, Italija. Uzeta su četiri različita inokuluma koja su sadržavala četiri različite vrste AM gljiva: *Glomus mossae* izolat IMA1 41.98, *Glomus intraradices* izolat DJ. 61.98., *Glomus coronatum* izolat BEG28 81.93. i *Glomus viscosum* izolat BEG 12.98., na pjeskovitom tlu kao nosaču. Budući da dobivena količina izvornih inokuluma od 100g po svakome nije zadovoljavala količinu potrebnu za izvođenje pokusa, pristupilo se razmnožavanju inokuluma metodom pot-kultura (Avio et al., 1984). Tako pripremljen inokulum kasnije je korišten u pokusu, a dio inokuluma odvojen je za čuvanje i buduću proizvodnju. Svjež inokulum bio je proizveden za svaku godinu istraživanja.

Supstrat

Biljke su bile uzgajane na supstratu koji se sastojao od mješavine tla iz voćnjaka pokusno-nastavnog poligona «Jazbina», koje je karakterizirano kao obronačni pseudoglej, kvarcnog pijeska i šljunka u volumnom omjeru 1:1:1, koji su primijenjeni radi poboljšanja strukture supstrata. Kemijskom analizom prirodnog tla ustanovljen je sadržaj 0,18% N; 5,2 mg P₂O₅/100 g tla; 25,8 mg K₂O/100 g tla. Sadržaj humusa je bio 0,54%, a pH tla 5,9 (H₂O). Analize tla napravljene su u Zavodu za ishranu bilja Agronomskog fakulteta u Zagrebu.

Prije pripravljanja supstrata tlo iz voćnjaka je prosijano na situ od 2 cm kako bi se uklonile veće čestice tla i ostatak nativnog biljnog materijala, te je zatim poslano zajedno s pijeskom i šljunkom na sterilizaciju gama zračenjem u Institut Ruđer Bošković. Tako sterilizirane komponente čuvane su u vakumiranim vrećama za autoklaviranje od 20 L. Supstrat je iz navedenih komponenata bio pripravljan svake godine neposredno pred sadnju.

Plan pokusa

Istraživanje je trajalo dvije godine. Pokus je bio postavljen po modelu slučajnog bloknoeg rasporeda s pet tretiranja u pet repeticija. Svaka repeticija sadržavala je dvadeset podloga MrS 2/5 dobivenih mikropropagacijom *in vitro* koje su bile posađene u zasebne lončice. Tretiranja su uključila inokuliranje s četiri vrste AM gljiva: *Glomus mossae* izolat IMA1 41.98, *Glomus intraradices* izolat DJ. 61.98., *Glomus coronatum* izolat BEG28 81.93. i *Glomus viscosum* izolat BEG 12.98., uz neinokuliranu kontrolu. Po svakoj biljci dodano je 10 grama inokuluma. Svake godine biljke su bile posađene u četvrtom, a izvađene u osmom mjesecu.

Ekološki uvjeti pokusa

Prva dva tjedna aklimatizacije biljke su provele u laboratorijskim uvjetima Zavoda za mikrobiologiju Agronomskog fakulteta u Zagrebu, nakon čega su prenesene u staklenik obiteljskog gospodarstva u okolici Ivanić Grada. Osvjetljenje i fotoperiod su bili prirodni, početna vlaga kretala se od 90-100%, jer su prva dva tjedna aklimatizacije biljke bile zatvorene u polietilenskim vrećicama, radi održavanja poželjne mikroatmosfera. Nakon prenošenja u staklenik i postupnog otvaranja vrećica vlaga se spustila na 60-70%. Noćna temperatura bila je između 18-20 °C, a dnevna od 23-25 °C. Staklenik je po potrebi bio zasjenjivan. Biljke su bile zalijevane destiliranom vodom tjedno ili po potrebi, te prihranjivane svaka dva tjedna Long Ashtonovom hranjivom otopinom (Berta et al. 1995).

Analiza biljnog materijala

Na završetku pokusnog razdoblja u svakoj godini biljke su vađene i analizirane. Neposredno nakon vađenja izvagana je masa svježeg nadzemnog (stabljika + lišće) dijela stabljike, te masa svježeg korijena. Nakon sušenja utvrđena je masa suhog nadzemnog dijela stabljike i masa suhog korijena. Mjereni su i visina i promjer nadzemnog dijela stabljike. Utvrđivan je omjer mase svježeg korijena/mase svježeg nadzemnog (lišće + stabljika) dijela biljke, radi procjenjivanja djelotvornosti korijenovog sustava s obzirom na biomasu nadzemne dijela.

Analiza sadržaja fosfora u listu napravljena je na Zavodu za kemiju Agromorskog fakulteta u Zagrebu. Sadržaj fosfora je određivan spektrofotometrijski prema Bašović et al. (1978).

Također je utvrđivan postotak preživjelih biljaka s obzirom na početni broj biljaka po repeticiji svakog tretmana i preostali broj biljaka po repeticiji svakog tretmana, po formuli (Sbrana et al., 1994):

$$\% \text{ preživljavanja transplatacijskog stresa} = \frac{\text{preostali broj biljaka}}{\text{početni broj biljaka}} \times 100$$

Utvrđivanje prisutnosti AM gljiva u korijenovom sustavu i određivanje postotka kolonizacije

Pri odvajanju korijena od nadzemnog dijela, korijenje je ispirano od ostataka supstrata s destiliranom vodom, te je od svake repeticije određenog tretmana uzet prosječan uzorak od dva korijenčića po biljci. Korijenčići su zatim pripremljeni za mikroskopiranje po Phillips-Haymannovoj metodi (1970).

Prisutnost struktura karakterističnih za AM gljive u korijenu biljke domaćina utvrđivana je promatranjem obojanog korijena pod svjetlosnim mikroskopom (Olympus, povećanje x140-200; Zavod za mikrobiologiju, Agronomski fakultet Zagreb)

Postotak mikorizne kolonizacije procijenjen je po principu "grid line intersect" metode (Giovannetti and Mosse, 1980). Prisutnost spora u zoni korijenja ustanovljena je putem metode mokrog prosijavanja, «wet sieving» (Gerdemann and Nicolson, 1963). Izdvojene spore stavljane su u Petrijeve zdjelice i zatim promatrane pod binokularom (Zeiss, povećanje x 40, Zavod za voćarstvo). Osim toga obavljeno je promatranje i pod svjetlosnim mikroskopom (Olympus, povećanje x 200, Zavod za mikrobiologiju).

Statistička analiza podataka

Dobiveni podaci statistički su analizirani po modelu slučajnog blokno rasporeda. Provedena je analiza varijance i određena najmanja signifikantna razlika (LSD), uz vjerojatnost $P = 5\%$, za svako promatrano svojstvo, osim za sadržaj fosfora u listu, koji je prikazan samo kao prosječna vrijednost.

Statistička obrada podataka izvršena je pomoću statističkog softverskog programa SAS (SAS Institute Inc., Cary N.C., verzija 8.2., 2000 g., USA).

REZULTATI ISTRAŽIVANJA S RASPRAVOM

Pozitivan utjecaj arbuskularno-mikoriznih gljiva na rast i razvoj inokuliranih mikropodloga utvrdili su mnogi istraživači. Tako su Berta et al. (1995), Guillemain et al. (1992) i Sbrana et al. (1994), zamijetili da se dodavanjem AM gljiva u inače sterilan supstrat pri prelasku u *in vivo* uvjete uzgoja, pozitivno utječe na preživljavanje transplantacijskog stresa mikropropagacijom dobivenih biljaka. Bolji rast i razvoj biljaka najčešće se objašnjava poboljšanom mineralnom ishranom, do koje dolazi promjenom morfologije korijena i povećanjem adsorpcijske površine korijena za primanje hraniva, zbog prisutnosti mreže tankih hifa AM gljiva koje su u simbiozi s biljkom (Berta et al., 1995). Isto tako prisutnost AM gljiva u korijenu i rizosferi biljke pozitivno utječe na povećanu otpornost ili tolerantnost prema nekim patogenima (Pinochet et al., 1997; Caron et al., 1986; Cordier et al., 1998).

Unatoč činjenici da arbuskularno-mikorizne gljive nemaju specifične sklonosti prema određenoj biljci domaćinu, istraživanjima je utvrđeno da ipak postoje više ili manje uspješne kombinacije određene vrste, odnosno soja AM gljive i vrste odnosno sorte biljke domaćina (Taylor and Harrier, 2000; 2001). Do sada je utvrđeno da uspješnost određene simbiozne kombinacije ovisi o ekološkim uvjetima i tipu tla iz kojeg je AM gljiva izolirana, što znači da bi se pojedini izolati uglavnom trebali koristiti u sličnim pedoekološkim uvjetima matičnog područja AM gljive, od čega ima određenih odstupanja koja su vrlo rijetka (Giovannetti M., 2001). Na tu smo činjenicu posebno pazili pri odabiru izolata pojedine vrste AM gljive kako bi odgovarao našem tipu supstrata u koji smo uključili izvorno tlo iz voćnjaka nastavno-pokusnog poligona Jazbina. Uspješnost određene simbiozne kombinacije ovisi i o infektivnoj sposobnosti AM gljive i brzini stvaranja njenih karakterističnih struktura unutar korijena biljke domaćina, te brzini postizanja izmjene hranjivih tvari između dva simbionta (Giovannetti et al., 2002).

U našim istraživanjima željeli smo utvrditi koji od četiri odabrana izolata AM gljiva u kombinaciji s izabranom podlogom daju najbolje rezultate, u zadanim uzgojnim uvjetima.

Postotak kolonizacije korijena s AM gljivama

Tablica 1. Prosječan postotak kolonizacije korijena s AM gljivama

Table 1. Everage percentage of root colonization with AM fungi

Tretiranje - Treatments	2002. god.	2003. god.
<i>Glomus intraradices</i>	80,76 ^a	81,83 ^a
<i>Glomus mossae</i>	69,88 ^b	70,57 ^b
<i>Glomus viscosum</i>	40,27 ^c	40,99 ^c
<i>Glomus coronatum</i>	68,80 ^b	67,82 ^b
LSD _{p=5%}	9,11	10,45

Sve vrijednosti označene istim slovom signifikantno se ne razlikuju pri P=5%

All values named with the same letter are not significantly different at P=5%

Prije procjene učinkovitosti određene zajednice biljke domaćina i AM gljive potrebno je ustanoviti prisutnost određenih AM struktura unutar korijena domaćina te izračunati postotak kolonizacije, kako bi bili sigurni da je došlo do uspješne inokulacije. U našim istraživanjima u svim tretmanima AM gljive bile su prisutne u korijenu i rizosferi. Najveći postotak kolonizacije imao je *Glomus intraradices*, no najuspješnijim u pozitivnom djelovanju na rast i razvoj podloge MrS 2/5 pokazali su se tretmani s *G. mossae* i *G. coronatum*, koji su imali niži postotak kolonizacije. Razna istraživanja su pokazala da se postotak kolonizacije korijena ne mora uvijek podudarati s najuspješnijom simbioznom kombinacijom, jer to često zna samo ukazivati na agresivnost određene vrste AM gljive pri kolonizaciji domaćina (Abbott and Robbison, 1984). Agresivna kolonizacija može uzrokovati veći gubitak fotoasimilata, nego što je primanje hraniva putem hifa AM gljive, što se može negativno odraziti na razvoj biljke (Clapperton and Reid, 1992). Međutim, u našim istraživanjima tretman s *G. viscosum* imao je najniži postotak kolonizacije, ali i najslabije rezultate u odnosu na druge tretmane. Iz toga se može zaključiti da vjerojatno postoji određena donja i gornja granica stupnja kolonizacije pri kojoj se postižu optimalni rezultati za pojedinu kombinaciju izolata AM gljive i biljke domaćina.

Masa svježeg nadzemnog dijela (stabljika + list) i svježeg korijena

Tablica 2. Prosječna masa svježeg nadzemnog (stabljika + list) dijela biljke i prosječna masa svježeg korijena

Table 2. Everage fresh shoot (stem + leaf) and everage fresh root mass

Tretiranje - Treatments	2002.god.	2003.god.	2002.god.	2003.god.
Prosječna masa svježeg nadzemnog dijela biljke u g Everage fresh shoot mass in g			Prosječna masa svježeg korijena u g Everage fresh root mass in g	
<i>Glomus intraradices</i>	8,13 ^c	9,46 ^b	5,17 ^c	5,33 ^b
<i>Glomus mossae</i>	10,47 ^a	11,38 ^a	7,60 ^a	7,56 ^a
<i>Glomus viscosum</i>	7,64 ^c	8,30 ^c	4,46 ^{cd}	4,81 ^{bc}
<i>Glomus coronatum</i>	9,36 ^b	10,58 ^a	6,60 ^b	6,68 ^a
Kontrola - Control	2,40 ^d	2,58 ^d	3,94 ^d	4,16 ^c
LSD _{P=5%}	0,53	1,03	0,76	1,03

Sve vrijednosti označene istim slovom signifikantno se ne razlikuju pri P=5%

All values named with the same letter are not significantly different at P=5%

Masa svježeg nadzemnog dijela biljke koju čine lišće i stabljika važan je parametar u procjeni uspješnosti utjecaja određene AM gljive na rast i razvoj, jer je utvrđeno da se biljke veće biomase kasnije bolje razvijaju u rasadniku (Barea et al., 1995; Vestberg et al., 1992). Sva četiri izolata AM gljiva utjecala su na signifikantno povećanje prosječne mase nadzemnog dijela u odnosu na kontrolne neinokulirane biljke. Podloge mikorizirane s *G.mossae* imale su najveću prosječnu masu nadzemnog dijela biljke u obadvije godine istraživanja, dok je u 2002. godini vrijednost tretmana s *G.mossae* bila sinifikantno veća od postignutih vrijednosti ostalih tretmana u pokusu, u 2003. godini nije uočena signifikantna razlika između njega i tretmana s *G.coronatum*. U istraživanjima Berta et al. (1995), *G.mossae* je također bio najuspješnija varijanta s obzirom na masu svježeg nadzemnog dijela biljke, a u odnosu na druge odabrane AM gljive u pokusu.

Utjecaj na morfologiju, povećanje mase korijena i pojačano grananje lateralnog korijena nakon inokulacije s AM gljivama zamijećeno je kod mnogih mikropropagacijom dobivenih biljaka (Berta et al., 1995; Schellenbaum et al., 1991). U našim istraživanjima signifikantno najveća prosječna masa svježeg korijena zabilježena je kod tretmana *G.mossae* u 2002.

godini, dok je u 2003. godini nije bilo signifikantne razlike između njega i *G.coronatum*. Zanimljivo je da dok su svi ostali tretmani imali signifikantno veće vrijednosti u odnosu na neinokuliranu kontrolu, *G.viscosum* nije se od nje razlikovao, što ukazuje na njegovu slabiju djelotvornost u kombinaciji s podlogom MrS 2/5.

Omjer mase svježeg korijena i mase svježeg nadzemnog dijela biljke

Tablica 3. Omjer prosječne mase svježeg korijena i prosječne mase svježeg nadzemnog (lišće + stabljika) dijela biljke

Table 3. Fresh root to fresh shoot ratio

Tretiranje - Treatments	2002.god.	2003.god.
<i>Glomus intraradices</i>	0,63 ^c	0,56 ^d
<i>Glomus mossae</i>	0,72 ^b	0,66 ^b
<i>Glomus viscosum</i>	0,58 ^c	0,59 ^{cd}
<i>Glomus coronatum</i>	0,70 ^b	0,63 ^{bc}
Kontrola - Control	1,64 ^a	1,60 ^a
LSD _{P=5%}	0,06	0,05

Sve vrijednosti označene istim slovom signifikantno se ne razlikuju pri P=5%

All values named with the same letter are not significantly different at P=5%

Posebno zanimljiv parametar je odnos mase svježeg korijena i mase svježeg nadzemnog dijela biljke. Karakteristika biljaka koloniziranih arbuskularno-mikoriznim gljivama je da imaju nižu vrijednost omjera mase korijena i mase nadzemnog dijela biljke u odnosu na kontrolne biljke (Azcon-Aguilar et al., 1996; Taylor and Harrier, 2001 itd.). Naši podaci su u skladu s navodima u literaturi, pri čemu su kontrolne biljke imale signifikantno veće vrijednosti ovog parametra u odnosu na inokulirane biljke. Zbog formirane simbioze i pridonosa hifa AM gljiva u ishrani biljke, postiže se puno veća učinkovitost takvog korijenovog sustava, te unatoč činjenici da se biomasa korijena povećava pri kolonizaciji, dolazi do znatnijeg povećanja mase nadzemnog dijela. Iz prije navedenih činjenica možemo zaključiti da se mikorizacijom postiže veća učinkovitost korijenovog sustava.

Masa suhe tvari nadzemnog (stabljika + lišće) dijela biljke, masa suhe tvari korijena, visina stabljike i promjer stabljike

Tablica 4. Prosječna masa suhe tvari nadzemnog dijela (stabljika + lišće) biljke i suhe tvari korijena

Table 4. Average dry shoot (stem + leaf) and dry root mass

Tretiranje Treatments	2002.god.	2003.god.	2002.god.	2003.god.
	Prosječna masa suhe tvari nadzemnog (stabljika + lišće) dijela biljke u g Average dry shoot mass in g		Prosječna masa suhe tvari korijena u g Average dry root mass in g	
<i>Glomus intraradices</i>	2,53 ^c	2,92 ^b	1,23 ^c	1,25 ^b
<i>Glomus mossae</i>	3,27 ^a	3,53 ^a	1,82 ^a	1,80 ^a
<i>Glomus viscosum</i>	2,39 ^c	2,56 ^c	1,06 ^{cd}	1,14 ^{bc}
<i>Glomus coronatum</i>	2,92 ^b	3,30 ^a	1,54 ^b	1,60 ^a
Kontrola - Control	0,75 ^d	0,79 ^d	0,91 ^d	0,95 ^c
LSD _{P=5%}	0,17	0,30	0,20	0,26

Sve vrijednosti označene istim slovom signifikantno se ne razlikuju pri P=5%
All values named with the same letter are not significantly different at P=5%

Tablica 5. Prosječna visina i promjer stabljike

Table 5. Average shoot height and diameter

Tretiranje Treatments	2002.god.	2003.god.	2002.god.	2003.god.
	Prosječna visina stabljike u cm Average shoot height in cm		Prosječan promjer stabljike u mm Average shoot diameter in mm	
<i>Glomus intraradices</i>	20,57 ^b	25,52 ^{bc}	3,53 ^c	3,55 ^b
<i>Glomus mossae</i>	25,41 ^a	27,21 ^a	3,74 ^a	3,70 ^a
<i>Glomus viscosum</i>	20,00 ^b	24,48 ^c	3,36 ^d	3,44 ^c
<i>Glomus coronatum</i>	24,67 ^a	26,78 ^{ab}	3,64 ^b	3,66 ^a
Kontrola - Control	15,50 ^c	18,39 ^d	1,14 ^e	1,18 ^d
LSD _{P=5%}	0,84	1,62	0,10	0,09

Sve vrijednosti označene istim slovom signifikantno se ne razlikuju pri P=5%
All values named with the same letter are not significantly different at P=5%

Ostali parametri koji ukazuju na razvoj biljke u koje ubrajamo masu suhe tvari nadzemnog dijela biljke, masu suhe tvari korijena, visinu i promjer stabljike također su ukazivali na pozitivan utjecaj inokulacije. Sličan trend su zamijetili i Schubert et al. (1996), Schellenbaum et al. (1991) i Azcon-Aguilar et al. (1992) itd. Osim kod mase suhe tvari korijena gdje nije uočena signifikantna razlika između tretmana s *G.viscosum* i kontrole, ostali tretmani pokazivali su signifikantno veće vrijednosti izmjerenih parametara u odnosu na kontrolu. Najveće vrijednosti pokazivao je *G. mossae*, a *G.coronatum* ga je slijedio, tako da se ta dva tretmana uglavnom nisu međusobno signifikantno razlikovala u ovim parametrima.

Postotak preživljavanja transplantacijskog stresa

Tablica 6. Prosječan postotak preživljavanja transplatacijskog stresa

Table 6. Average percentage of transplatation stress survival

Tretiranje - Treatments	2002.god.	2003.god.
<i>Glomus intraradices</i>	82 ^c	81 ^a
<i>Glomus mossae</i>	91 ^a	88 ^a
<i>Glomus viscosum</i>	83 ^{bc}	79 ^b
<i>Glomus coronatum</i>	87 ^{ab}	85 ^{ab}
Kontrola - Control	63 ^d	65 ^c
LSD _{P=5%}	4,69	6,99

Sve vrijednosti označene istim slovom signifikantno se ne razlikuju pri P=5%

All values named with the same letter are not significantly different at P=5%

Postotak preživljavanja transplantacijskog stresa jedan je od ključnih čimbenika za ocjenjivanje uspješnosti pojedine simbiozne kombinacije (Sbrana et al., 1994). Što se tiče ovog svojstva sve mikorizirane biljke imale su signifikantno veći postotak preživljavanja transplantacijskog stresa naspram kontrolnih biljaka. Ti podaci su u skladu s prijašnjim istraživanjima Fortuna et al. (1996), Guillemin et al. (1992), Sbrana et al. (1994) itd. Kao i kod većine ostalih mjerenih parametara u 2002. godini najveće vrijednosti pokazivao je tretman *G. mossae*, ali ipak između njega i *G.coronatum* nije postojala statistički opravdana razlika. U 2003. godini inokulirani tretmani bili su prilično ujednačeni pri čemu je *G.viscosum* zaostajao za ostalima.

Sadržaj fosfora u listu

Tablica 7. Prosječan sadržaj fosfora u listu u $\mu\text{g P / g}$ suhe tvari

Table 7. Everage leaf phosphorus content in $\mu\text{g P / g}$ dry matter

Tretiranje - Treatments	2002.god.	2003.god.
<i>Glomus intraradices</i>	500	425
<i>Glomus mossae</i>	650	1000
<i>Glomus viscosum</i>	350	375
<i>Glomus coronatum</i>	400	550
Kontrola	255	250

Utjecaj AM gljiva na poboljšano primanje hraniva, povećanje sadržaja određenih mikroelemenata i makroelemenata u biljci, a naročito fosfora, zabilježeno je u mnogim istraživanjima (Berta et al,1995; Fortuna et al, 1998; Schellenbaum et al, 1991 itd). Budući da je snabdijevanje fosforom u uvjetima suboptimalnog sadržaja u tlu otežano, a u sustavu organske proizvodnje ne primjenjuju se mineralna gnojiva, značenje AM gljiva u snabdijevanju s tim elementom postaje veoma važno. Iz tog razloga odlučili smo analizirati lišće na sadržaj P. Zbog male količine dobivenog listnog materijala analizirani su prosječni uzorci za svaki tretman u pokusu kroz dvije godine. Na slične probleme su naišli i (Planchette et al, 1983a i b), koji su iz tog razloga pribjegli analiziranju sadržaja fosfora u cjelokupnom nadzemnom dijelu biljke, a ne samo u listu. Kasnijim usporednim testovima pokazano je da podaci dobiveni na taj način nisu reprezentativni, (Brazanti et al, 1992) te da je u slučajevima kada nema dovoljno listnog materijala za kemijsku analizu po repetacijama, bolje napraviti samo prosječne podatke za svaki tretman, te podatke prikazati kao okvirne vrijednosti.

Dobivene prosječne vrijednosti pokazale su da inokulirane biljke imaju dva do tri puta veći sadržaj fosfora u odnosu na kontrolu, osim tretmana *G.viscosum* koji nije imao puno veće vrijednosti od kontrole. Najveći sadržaj fosfora utvrđen je kod tretmana *G.mossae*.

ZAKLJUČAK

Na osnovi provedenih istraživanja možemo zaključiti da je inokulacija mikropropagacijom dobivene podloge MrS 2/5 (*Prunus cerasifera* L.) s

arbuskularno-mikoriznim gljivama roda *Glomus* pozitivno utjecala na preživljavanje transplantacijskog stresa, rast i razvoj podloga, te sadržaj fosfora u lišću. Podloge inokulirane s *G.mossae*, a zatim i s *G.coronatum* pokazale su se kao najuspješnija simbiozna kombinacija. Tretman s *G.mossae* postizao je nešto bolje rezultate od *G.coronatum*, no među njima uglavnom nije bilo signifikantne razlike. Smatramo da se primjenom AM gljiva i odabirom optimalnih simbioznih partnera može unaprijediti rasadničarska proizvodnja, te su neophodna daljnja istraživanja u ovom području.

LITERATURA

- Abbott, L. K. and Robson, A. D. 1984. The effect of VA mycorrhizae on plant growth. In: VA mycorrhiza. CRC Press, Boca Raton, USA, str. 113-130.
- Azcon-Aguilar, C., Barcelo, A., Vidal, M. T. and de la Vina, G. 1992. Further studies on the influence of mycorrhizae on growth and development of micropropagated avocado plants. *Agronomie* 12: 837-840.
- Azcon-Aguilar, C., Padilla, I. G., Encina, C. L., Azcon, R. and Barea, J. M. 1996. Arbuscular mycorrhizal inoculation enhances plant growth and changes root system morphology in micropropagated *Annona cherimola* Mill. *Agronomie* 16: 647-652.
- Avio, L., Giovannetti, M., Picci, G. 1984. Applicazioni delle micorize vesiculo arbuscolari in agricoltura. *L' Agricola Italiana* 5/6: 1-26.
- Bašović, M., Čmelik, Z. 1978. Praktikum iz fiziologije bilja. Naklada Sarajevo
- Berta, G., Trotta, A., Fusconi, A., Hooker, J. E., Munro, M., Atkinson, D., Giovannetti, M., Morini, S., Fortuna, P., Tisserant, B., Gianinazzi-Pearson, V. and Gianinazzi, S. 1995. Arbuscular mycorrhizal induces changes to plant growth and root system morphology in *Prunus cerasifera*. *Tree Physiology* 15: 281-293.
- Brazanti, B., Gianinazzi-Pearson, V. and Gianinazzi, S. 1992. Influence of phosphate fertilization on the growth and nutrient status of micropropagated apple infected with endomycorrhizal fungi during the weaning stage. *Agronomie* 12: 841-845.
- Caron, M., Fortin, J. A. and Richard, C. 1986. Effect of phosphorus concentration and *Glomus intraradices* on *Fusarium* crown and root rot of tomatoes. *Phytopathology* 76: 942-946.

- Cordier, C., Pozo, M. J., Barea, J. M., Gianinazzi, S. and Gianinazzi-Pearson, V. 1998. Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Molecular Plant-Microbe Interact.* 11: 1017-1028.
- Clapperton, M. J. and Reid, D. M. 1992. A relationship between plant growth and increasing VA mycorrhizal inoculum density. *New Phytologist* 120: 227-234.
- Fortuna, P., Citernes, A. S., Morini, S., Vitagliano, C. and Giovannetti, M. 1996. Influence of arbuscular mycorrhizae and phosphate fertilization on shoot apical growth of micropropagated apple and plum rootstocks. *Tree Physiology* 16: 757-763.
- Fortuna, P., Morini, S. and Giovannetti, M. 1998. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on *in vivo* root initiation and development of micropropagated plum shoots. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 73: 19-28.
- Gerdemann, J. W. and Nicolson, T. H. 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans British mycological Society* 46: 235-246.
- Guillemin, J. P., Gianinazzi, S. and Trouvelot, A. 1992. Screening of arbuscular endomycorrhizal fungi for establishment of micropropagated pineapple plants. *Agronomie* 12: 831-836.
- Giovannetti, M. and Mosse, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* 84: 489-500.
- Giovannetti, M., 2001. Survival strategies in arbuscular mycorrhizal symbionts. In: *Symbiosis*. Kulwer Academic Press, Dordrecht, Netherlands.
- Giovannetti, M., Sbrana, C. and Avio, L. 2002. Arbuscular mycorrhizal fungal mycelium: from gremlings to hyphal networks. *Mycorrhizal Technology in Agriculture*. Birkhausen Verlag, Switzerland.
- Gianinazzi-Pearson, V. 1996. Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the roots of the symbiosis. *Plant Cell* 8:1871-1883.
- Kleinschmidt, G. D. and Gerdemann, J. W. 1972. Stunting of citrus seedlings in fumigated nursery soils related to absence of endomycorrhizae. *Phytopathology* 62: 1447-1453.
- Logi, C., Sbrana, C. and Giovannetti, M. 1998. Cellular events involved in survival of individual arbuscular mycorrhizal symbionts growing in the absence of the host. *Applied Environmental Microbiology* 64: 3473-3479.

- Lambert, D. H., Stouffer, R. F. and Cole, H. 1979. Stunting of peach seedlings following fumigation. *Journal of American Society for Horticultural Science* 104: 433-435.
- Morini, S., Fortuna, P., Sciutti, R. and Muleo, R. 1990. Effect of different light-dark cycles on growth of fruit tree shoots cultured *in vitro*. *Advanced Horticulture Science* 4: 163-166.
- Molina, R., Massicotte, H. and Trappe, J. M. 1992. Specificity phenomena in mycorrhizal symbioses: community-ecological consequences and practical implications. In: *Mycorrhizal Functioning*. Chapman & Hall, New York str. 357-423.
- Mosse, B. 1959. Observations on the extra-matrical mycelium of a vesicular-arbuscular endophyte. *Trans British mycological Society* 42: 439-448.
- Phillips, J. M and Hayman, D. S. 1970. Improved procedure for clearing roots and staining parasites and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans British mycological Society* 55: 158-161.
- Planchette, C., Furlan, V., Fortin, J. A. (1983a). responses of endomycorrhizal plants grown in a calcined monmorillonite clay to different levels of soluble phosphorus. I. Effect on growth and mycorrhizal development. *Canadian Journal of Botany* 61: 1377-1383.
- Planchette, C., Furlan, V., Fortin, J. A. (1983b). responses of endomycorrhizal plants grown in a calcined monmorillonite clay to different levels of soluble phosphorus. II. Effect on growth and mycorrhizal development. *Canadian Journal of Botany* 61: 1385-1391.
- Pinochet, J., Fernandez, C., Jazme, M. D. and Tenoury, P. 1997. Micropropagated banana infected with *Meloidogyne javanica* responds to *Glomus intraradices* and phosphorus. *HortScience* 32: 101-103.
- Sbrana, C., Giovannetti, M and Vitagliano, C. 1994. The effect of mycorrhizal infection on survival and growth renewal of micropropagated fruit rootstocks. *Mycorrhiza* 5: 153-156.
- Smith, S. E. and Read, D. J. 1997. *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, London, str. 1-605.
- Schubert, A., Bodrino, C. and Gribaudo, I. 1992. Vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculation of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) micropropagated plants. *Agronomie* 1992 12: 847-850.
- Schellenbaum, L., Berta, G., Ravolanirina, F., Tisserant, B., Gianinazzi, S. and Fitter, A. H. 1991. Influence of the endomycorrhizal infection on root

morphology in a micropropagated woody plant species (*Vitis vinifera* L.). *Annals of Botany* 68: 135-141.

- Taylor, J. and Harrier, L. A. 2000. A comparison of nine species of arbuscular mycorrhizal fungi on the development and nutrition of micropropagated *Rubus idaeus* L.cv. Glen Prosen (Red Raspberry). *Plant and Soil* 225: 53-61.
- Taylor, J. and Harrier, L. A. 2001. A comparison of development and mineral nutrition of micropropagated *Fragaria ananassa* cv. Elvira (Strawberry) when colonised by nine species of arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied Soil Ecology* 18: 205-215.
- Vestberg, M. 1992. Arbuscular mycorrhizal inoculation of micropropagated strawberry and field observations in Finland. *Agronomie* 12: 865-867.

Adresa autora – Authors address:

Mr. sc. Jasmina Družić Orlić
Prof. dr. sc. Zlatko Čmelik
Prof. dr. sc. Sulejman Redžepović
Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Svetošimunska 25
10000 Zagreb, Hrvatska

Primjeno - Received:

12. 12. 2005.