UDK / *UDC*: 582.632.2+635.85
DOI: https://dx.doi.org/10.21857/mnlqgc3jjy
Prethodno priopćenje / *Preliminary communication*
Prispjelo / *Received*: 28. 3. 2024.
Prihvaćeno / *Accepted*: 25. 3. 2025.

Inokulacija sadnica hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.) dvjema vrstama crnih tartufa

The inoculation of the pedunculate oak (Quercus robur L.) seedlings with two species of black truffles

Ivana Zegnal, Anton Brenko, Jasnica Medak*

Sažetak

Ektomikorizne gljive imaju važnu biološku i ekološku ulogu u šumama umjerenog pojasa i stvaraju simbiotske odnose s oko 60 % drveća na svijetu. Među ektomikorizne gljive spadaju i vrste roda *Tuber,* odnosno tartufi. U mutualističkoj simbiozi s drvećem, npr. s hrastovima, lijeskama i drugim širokolisnim drvećem, tartufi pomažu svoje biljne simbionte opskrbljujući ih potrebnim hranivom i štiteći ih od stresa. Zauzvrat tartufi dobivaju organske tvari, bez kojih ne mogu dovršiti svoj životni ciklus. Tartufi su podzemne gljive koje se intenzivno uzgajaju zbog svoje gastronomske vrijednosti i smanjenja razvoja plodišta u prirodnim uvjetima. Suvremeni uzgoj tartufa temelji se na sadnji inokuliranih sadnica na zemljištima odgovarajućih ekoloških obilježja. Gospodarski najvažnije vrste tartufa u Europi jesu *Tuber magnatum* Picco, *Tuber melanosporum* Vittad., *Tuber aestivum* (Wulfen) Spreng. i *Tuber borchii* Vittad. Cilj istraživanja jest pronaći optimalnu metodu inokulacije sadnica hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.) s dvije vrste crnih tartufa, *T. melanosporum*

* Ivana Zegnal, mag. ing. silv., stručna suradnica, Hrvatski šumarski institut, Zavod za ekologiju šuma, Cvjetno naselje 41, 10450 Jastrebarsko, ivanaz@sumins.hr
* Anton Brenko, dipl. ing. šum., stručni suradnik, Hrvatski šumarski institut, Centar za općekorisne funkcije šuma Josip Ressel, 154. brigade Hrvatske vojske 2, 52000 Pazin
* Dr. sc. Jasnica Medak, viša znanstvena suradnica, Hrvatski šumarski institut, Zavod za ekologiju šuma, Cvjetno naselje 41, 10450 Jastrebarsko

(crni perigordski tartuf) i *T. aestivum* (ljetni tartuf). Dosadašnji rezultati, nakon devet mjeseci od inokulacije, pokazuju uspješnost istraživane metode provedene u stakleničkim uvjetima.

Ključne riječi: crni tartufi; ektomikoriza; inokulirane sadnice; protokol; uzgoj tartufa; *Quercus robur*

Abstract

Ectomycorrhizal fungi play an essential ecological role in temperate forests, and form symbiotic relationships with about 60 % of the world's trees. Ectomycorrhizal fungi include the species of the genus Tuber, i.e. truffles. In common symbiosis with trees, such as oaks, hazels and other broad-leaved trees, truffles strengthen their plant hosts by supplying them with the necessary nutrients, and protecting them from stress. In addition to receiving carbon in return, truffles can only complete their life cycle with a plant host. Truffles are underground fungi intensively cultivated due to their gastronomic value and decline in natural production. Modern truffle cultivation is based on planting inoculated seedlings on suitable soils in suitable ecological conditions. The most important truffle species in the economical sense are the Tuber magnatum *Picco, the* Tuber melanosporum *Vittad., the* Tuber aestivum *(Wulfen) Spreng, and the* Tuber borchii *Vittad. This research aims at finding the optimal method for the inoculation of the pedunculate oak (*Quercus robur *L.) seedlings with two species of black truffles, namely the* T. melanosporum *(black truffle) and summer truffle (*T. aestivum*). Nine months after the inoculation, preliminary results show the success of the investigated method carried out in greenhouse conditions.*

Keywords: *black truffles; ectomycorrhiza; inoculated seedlings; protocol; truffle cultivation;* Quercus robur

Uvod
Introduction

Korijenje većine biljaka kopnenih ekosustava koloniziraju simbiotske gljive koje tvore mikorizu. Mikoriza ima ključnu ulogu u apsorpciji hranjivih tvari iz tla, a time i u prehrani biljaka (Smith i Read 2008). To je mutualistička simbioza između biljaka i gljiva u kojoj gljive pomažu biljci u upijanju hranjivih tvari, posebno teško topljivih elemenata poput fosfora, a zauzvrat biljka gljivi daje organske tvari nastale fotosintezom. Osim toga mikorizne gljive svojim biljnim simbiontima osiguravaju zaštitu od patogena korijena i štetnika (Pruett i dr. 2009) te znatno povećavaju volumen korijenskog sustava (Zgrablić 2016). Među različitim tipovima mikorize najrasprostranjenije su arbuskularna mikoriza (AM), ektomikoriza (ECM) i erikoidna mikoriza, koje se razvijaju na više od 85 % vaskularnih biljaka kopnenih ekosustava (Soudzilovskaia i dr. 2019). U mikoriznoj simbiozi gljiva se razvija na korijenu biljnog simbionta kao kod ektomikoriznih gljiva ili u korijenu simbionta, kao kod arbuskularnih mikoriznih gljiva (Kentelky i dr. 2022)is important to know the necessary pH level of the soil, on which the mycorrhization occurs. The\nselected tree species are known to have a high percentage of inoculation level under the effect of truffle spore inoculum.\nIn the study, seedlings of the previously mentioned species were subjected to truffle infection at three soil pH levels (7.3,\n7.5, 7.7. Ektomikorizne gljive uglavnom potječu iz koljena *Basidiomycota* i *Ascomycota*. Procjenjuje se da na globalnoj razini postoji 10.000 – 20.000 vrsta ektomikoriznih gljiva koje uspostavljaju mikorizne odnose sa 6.000 – 8.000 biljnih vrsta. Iako ta brojka predstavlja samo mali dio ukupnog broja kopnenih biljaka, te vrste često čine dominantne biljne vrste šumskih ekosustava (Finlay 2008, Van Der Heijden i dr. 2015). Biljni simbionti ektomikoriznih gljiva ekonomski su i ekološki važne vrste šumskog drveća iz rodova *Pinus, Picea, Abies, Populus, Salix, Fagus, Betula, Quercus* te vrste šumskog drveća južne hemisfere iz roda *Eucalyptus* (Tyub i dr. 2015).

Tartufi (*Tuber* spp.) su gljive koje formiraju podzemna plodišta i uspostavljaju ektomikorizni odnos (Otsing i Tedersoo 2015) s biljnim vrstama bez kojih ne mogu dovršiti svoj životni ciklus. Zbog podzemnog načina života, tartufi su otporniji na isušivanje i smrzavanje od gljiva koje razvijaju svoja plodišta nadzemno (Fischer i dr. 2017). Tartufi se najčešće rasprostranjuju zoohornim načinom, a u prirodi je to pomoću micetofagnih životinja, kao što su divlje

svinje (Brenko i dr. 2020). Općenito, micetofagne životinje privlači miris podzemnih plodišta tartufa, koje one konzumiraju i tako šire spore tartufa u svojim fekalnim ekskrementima. Micetofagne životinje pomažu podzemnim vrstama gljiva u rasprostiranju na veće udaljenosti nego što bi se one mogle samostalno rasprostirati hifama (Tang i dr. 2015).

Tartufi pripadaju carstvu *Fungi*, odjeljku *Ascomycota*, pododjeljku *Pezizomycotina*, razredu *Pezizomycetes*, redu *Pezizales*, obitelji *Tuberaceae* i rodu *Tuber* (Brenko i dr. 2020). Prema procjenama, u svijetu postoji između 180 i 230 vrsta tartufa, a oko 30 vrsta pridolazi u Europi (Fischer i dr. 2017, Kentelky i dr. 2022). Približno se 13 vrsta tartufa koristi komercijalno (Özderin 2018). Jedinstvene arome i organoleptičke kvalitete čine tartufe jedinstvenima u europskoj gastronomiji. Gospodarski su najvažnije vrste tartufa *Tuber magnatum* Picco (veliki ili talijanski bijeli tartuf), *Tuber melanosporum* Vittad. (crni ili perigordski tartuf), *Tuber aestivum* (Wulfen) Spreng. (ljetni tartuf ili burgundski tartuf) i *Tuber borchii* Vittad. (rani ili borhijev tartuf), koji prirodno rastu samo u Europi, a Italija i Francuska zemlje su s najduljom tradicijom njihova korištenja (Zambonelli i dr. 2017, Brenko i dr. 2020). Gospodarska vrijednost tartufa potaknula je istraživače i poduzetnike da razviju metode uzgoja tartufa u različitim klimatskim uvjetima i na različitim tlima (Otsing i Tedersoo 2015). Najpovoljnija obilježja tla za gljive roda *Tuber* jesu tla s pH 7,5, udjelom Ca-Mg 25 – 55, K-Mg 0,3 – 2,1, C-N = 13 i sadržajem humusa 12 % (Kentelky i dr. 2022)is important to know the necessary pH level of the soil, on which the mycorrhization occurs. The\nselected tree species are known to have a high percentage of inoculation level under the effect of truffle spore inoculum.\nIn the study, seedlings of the previously mentioned species were subjected to truffle infection at three soil pH levels (7.3,\n7.5, 7.7. Za razliku od crnoga perigrodskog tartufa, ljetni je tartuf manje termofilan, zahtijeva više vode i razvija se na različitim tipovima tala, od pjeskovitih do glinovitih, na vapnenačkim i manje vapnenačkim, više ili manje humusnim tlima (Chevalier 2010), dok se veliki bijeli tartuf obično razvija u dobro strukturiranim tlima s velikim sadržajem vode (Bach i dr. 2021).

Suvremeni uzgoj tartufa započeo je ranih 1970-ih godina, kada su talijanski i francuski istraživači poboljšali tehnike za proizvodnju sadnica kolonizirani ciljnom vrstom tartufa. Prve plantaže crnih tartufa u Europi podignute su u Italiji i Francuskoj, a nekoliko godina kasnije i u Španjolskoj. Tijekom 1980-ih godina uzgoj tartufa uveden je i u druge europske zemlje u kojima

se tartufi nisu uzgajali, kao i u mnoge izvaneuropske zemlje, uključujući Argentinu, Australiju, Čile, Kinu, Izrael, Maroko, Novi Zeland, Južnu Afriku i SAD. Plantažni uzgoj crnoga ljetnog tartufa razvio se tek početkom 21. stoljeća metodom sadnje inokuliranih sadnica s tartufima, zbog čega se ljetni tartuf plantažno uzgaja i u zemljama u kojima nije prirodno rasprostranjen, kao što je Novi Zeland (Zambonelli i dr. 2017, Samils i dr. 2008).

Zbog velike ekonomske vrijednosti tartufa, nastoje se pronaći najučinkovitiji načini njihova uzgoja. To je često dosta teško, ne samo zato što tartufi imaju složen životni ciklus, koji uključuje simbiotski odnos s biljnim simbiontom, nego i zbog toga što njihov razvoj uključuje i složen odnos s mikroorganizmima u tlu. Načini uzgoja inokuliranih sadnica s tartufima objavljeni u literaturi često manjkaju u važnim detaljima inokulacije (Pruett i dr. 2009). Cilj ovog istraživanja bio je testirati metodu inokulacije sadnica hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.) tartufom. Ovo istraživanje nastavak je prethodnog istraživanja inokulacije sadnica hrasta crnike (*Q. ilex* L.) (Brenko i dr. 2022). Zaključci iz tog istraživanja bili su smjernice za postavljanje pokusa u ovom istraživanju. U istraživanju su korišteni biljni i gljivlji materijali s područja Hrvatske.

Materijali i metode

Materials and methods

Obrada sjemena

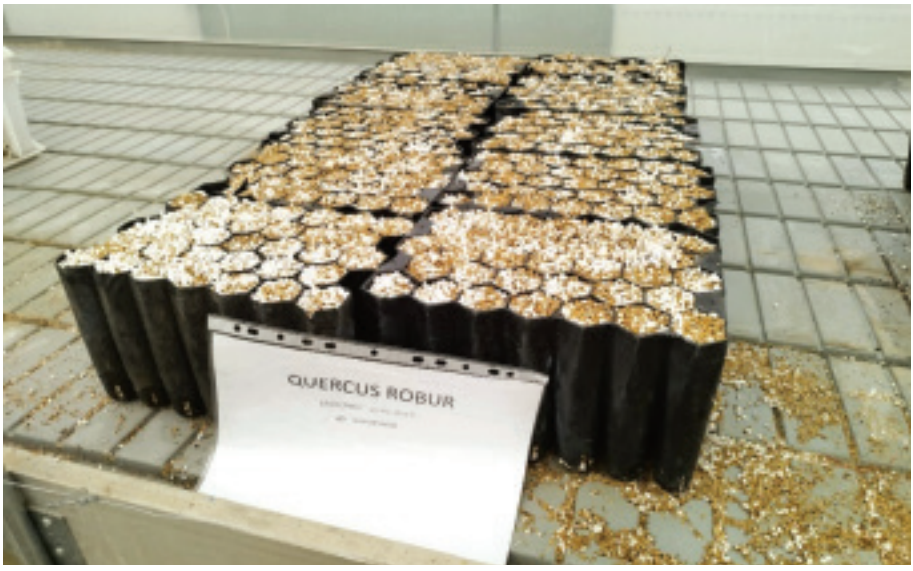
Seed treatment

Žirevi hrasta lužnjaka namijenjeni za proizvodnju sadnica za inokulaciju tartufima sakupljeni su u studenome 2022. na području Motovunske šume, u sjemenskoj sastojini Mirna, u odjelu 8d. Prije skladištenja u hladnoj komori žirevi su podvrgnuti procesu termoterapije na temperaturi od 41 °C u trajanju od 2,5 sata radi površinske sterilizacije i uništavanja biljnih patogena i insekata te je obavljena flotacija žira. Na kraju su žirevi tretirani 20-postotnim *FitoBakrom*, nakon čega su uskladišteni u hladnoj komori pri temperaturi 1 – 4 °C u trajanju od tri mjeseca. Pri zaprimanju sjemena uzet je nasumični uzorak za laboratorijsku analizu kvalitete sjemena prema ISTA metodama. Analiza je provedena u Laboratoriju za ispitivanje sjemena, u Odjelu za laboratorijska ispitivanja Hrvatskoga šumarskog instituta iz Jastrebarskog. Klijavost sjemena iznosila je 91 %.

Proizvodnja sadnica za inokulaciju tartufima

The production of seedlings for truffle inoculation

Za proizvodnju sadnica za inokulaciju tartufima korišteni su kombinirani *Multipot* kontejneri veličine 33/18, volumena 220 cm^3. Kao supstrat za sadnju žireva korištena je smjesa vermikulita i perlita u omjeru 2 : 1, neutralne reakcije, s dobrim vodnim kapacitetom. Korištena je sterilna smjesa za sadnju žireva jer sprječava razvoj spora i hifa neželjenih vrsta spora gljiva koje bi se mogle razviti npr. iz prirodnog tla ako bi se ono koristilo za sadnju. Ukupno je napunjeno 10 *Multipot* kontejnera i u njima je posađeno 330 žireva (slika 1).



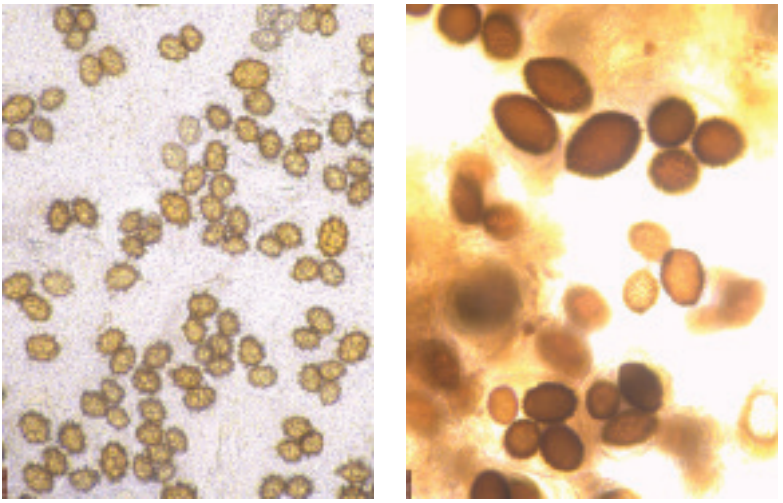
Slika 1. Kontejneri sa supstratom u kojima je posađen žir hrasta lužnjaka za proizvodnju sadnica za inokulaciju tartufima.

Priprema inokuluma

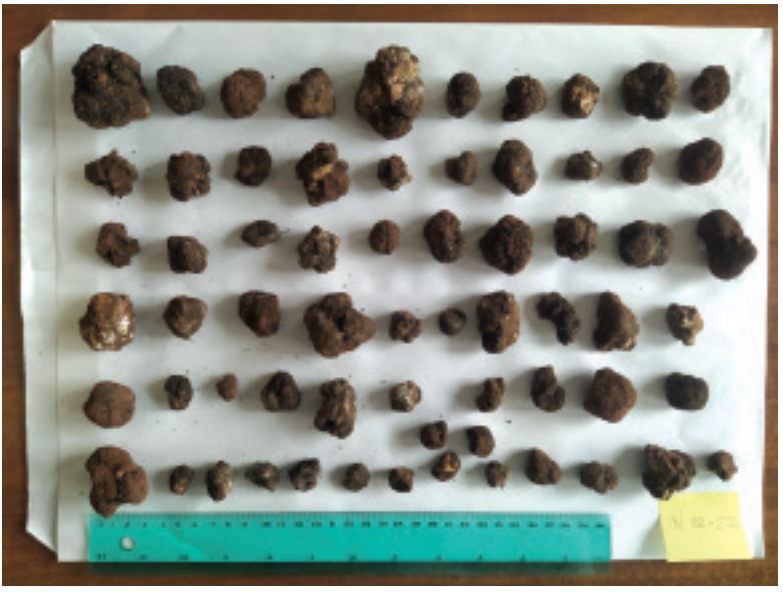
Inoculum preparation

Kao inokulum korištena su plodišta crnih tartufa *T. melanosporum* i *T. aestivum* (slika 2). Većina uzoraka tartufa sakupljena je na području Istre, dok je jedan uzorak sakupljen na području Dalmatinske zagore (slika 3). Plodišta su očišćena od zemlje, površinski sterilizirana i narezana na listiće. Zatim su osušena 24 sata na temperaturi od 35 °C, vakumirana i pohranjena u hladnu komoru pri temperaturi 1 – 4 °C do inokulacije. Za svaki uzorak inokuluma

ispunjen je obrazac s podacima o masi (g) prije i nakon sušenja radi kasnijeg preračunavanja potrebne količine plodišta po biljci. Osim toga, pri obradi plodišta uzet je uzorak za DNA sekvenciranje radi utvrđivanja vrste tartufa. Zrelost spora utvrđena je mikroskopskom analizom glebe plodišta na svjetlosnom mikroskopu Leica DM3000 LED (slika 2).



Slika 2. Spore crnoga ljetnog tartufa (*T. aestivum*) – lijevo; i spore crnoga perigordskog tartufa (*T. melanosporum*) – desno, povećanje 400 puta.



Slika 3. Obrada svježih crnih tartufa iz Istre i iz Dalmatinske zagore pri zaprimanju uzoraka.

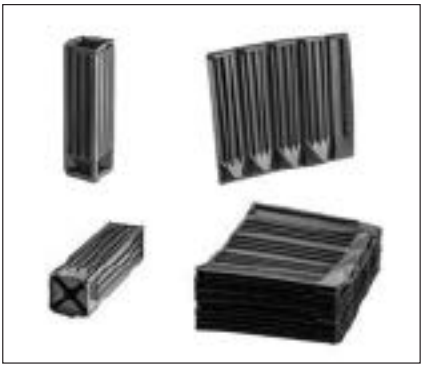
Metoda presadnje

Transplant method

Nakon što su klijanci razvili po jedan do dva para listova i nakon što su formirali postrano korijenje (slika 4), presađeni su u kontejnere za inokulaciju. Za inokulaciju su korišteni *Fullpot* sklopivi kontejneri zapremnine 450 cm^3 (slika 5). Za inokulaciju su korišteni pravilni klijanci kojima je prilikom presadnje korijen skraćen na 7 – 8 cm duljine. Klijanci su potapani u razblaženu fulvinsku kiselinu na 10 – 15 minuta, nakon čega su presađeni u *Fullpot* kontejnere (slika 6).



Slika 4. Klijanci hrasta lužnjaka s dobro razvijenim postranim korijenjem.



Slika 5. *Fullpot* kontejner za inokulaciju sadnica hrasta lužnjaka crnim tartufima. Izvor: www.arnabatagricola.com.

Metoda inokulacije

Inoculation method

Metoda inokulacije bila je dodavanje plodišta tartufa u praškastom obliku u supstrat. Vakumirana plodišta tartufa sa sporama usitnjena su u mikseru u fini praškasti oblik koji je dodavan u supstrat. Dodavan je po 1 gram svježih plodišta tartufa po biljci (tablica 1). Supstrat za inokulaciju sastojao se od mješavine fliša, treseta i vermikulita (pH = 7,4 – 7,9). Fliš je dostavljen s područja Istre, a treset je litavski treset koji se koristi u rasadničkoj proizvodnji Hrvatskoga šumarskog instituta iz Jastrebarskog. Supstrat je steriliziran u sušionicima u trajanju od 3 sata na temperaturi od 100 °C, čime se postiže temperatura supstrata



Slika 6. Punjenje *FullPot* kontejnera supstratom za inokulaciju i presadnja sadnica hrasta lužnjaka.

80 – 90 °C. Nakon sterilizacije supstrat je tri dana prozračivan premetanjem. Vermikulit je u supstratu služio kao nositelj inokuluma jer su se u njega dodavala plodišta tartufa u praškastom obliku, pomiješana s vodom. Supstrat je dobro homogeniziran, nakon čega je bio spreman za korištenje, odnosno punjenje *FullPot* kontejnera i presadnju biljaka (slika 6). U supstrat je dodavano 3 g/l sporo otapajućega mineralnog gnojiva Osmocote Exact 12 – 14 M u granulama (tablica 1).

Postavljanje pokusa

Trial setup

Fullpot kontejneri s inokuliranim sadnicama hrasta lužnjaka postavljeni su u plastične posude u plasteniku. Ukupno je inokulirano 180 sadnica hrasta lužnjaka, od kojih 60 s crnim perigordskim tartufom i 120 s crnim ljetnim

tartufom. Svaka skupina inokuliranih sadnica označena je odgovarajućom oznakom (tablica 1).

Tablica 1. Varijable pokusa inokulacije sadnica hrasta lužnjaka dvjema vrstama crnih tartufa

LOT	LOT2302	LOT2305	LOT2306
Vrsta biljnog simbionta	*Q. robur*	*Q. robur*	*Q. robur*
Vrsta tartufa	*T. melanosporum*	*T. aestivum*	*T. aestivum*
Datum inokulacije	2. 5. 2023.	4. 5. 2023.	4. 5. 2023.
Metoda inokulacije	Vermikulit / 1g plodišta po biljci	Vermikulit / 1g plodišta po biljci	Vermikulit / 1g plodišta po biljci
Mineralno hranivo	3 g Osmocote / 1 l supstrata	3 g Osmocote / 1 l supstrata	3 g Osmocote / 1 l supstrata
Datum naklijavanja sjemena	22. 2. 2023.	22. 2. 2023.	22. 2. 2023.
Broj ukupno inokuliranih sadnica	60	60	60



Slika 7. Inokulirane sadnice hrasta lužnjaka s crnim ljetnim tartufom (svibanj 2023.).

Preliminarni rezultati i rasprava
Preliminary results and discussion

Mikroskopska analiza korijena inokuliranih sadnica hrasta lužnjaka napravljena je u siječnju 2024., devet mjeseci nakon inokulacije. Prema slikama 8 i 9, na korijenu se uočava mikoriza, a mikroskopska analiza korijena napravljena je pomoću stereoskopa Kern OZM 953.

Osim mikoriznog statusa, kvaliteta inokuliranih šumskih sadnica ogleda se u ocjenjivanju vegetativnog zdravlja, npr. promjer sadnice pri korijenu, građa korijena ili omjer nadzemnog i podzemnog dijela. Inokulirane sadnice iz rasadnika trebaju zadovoljavati zahtjeve kakvoće šumskih sadnica i postići određenu razinu razvoja mikorize koja se utvrđuje posebnom metodom ocjenjivanja kvalitete. Isto tako inokulirane sadnice ne smiju imati mikorizu neželjenih vrsta tartufa ni mikorizu drugih vrsta gljiva (Andrés-Alpuente i dr. 2014). Metoda ocjenjivanja kvalitete i mikoriznog statusa inokuliranih sadnica važna je zbog postojanja rizika od unošenja neželjenih vrsta tartufa koje mogu biti invazivne i mogu zamijeniti domaću ili vrjedniju europsku vrstu tartufa (Zambonelli i dr. 2017). U Europi se uobičajeno koristi pet metoda za ocjenu kvalitete i mikoriznog statusa inokuliranih sadnica (Andrés-Alpuente i dr. 2014).

Sadnice hrasta lužnjaka inokulirane su u svibnju 2023., odnosno od trenutka inokulacije do trenutka pisanja ovoga rada prošlo je 10 mjeseci. Metoda kvantifikacije mikoriziranog korijena nije provedena jer nije prošlo dovoljno vremena da bi rezultati bili reprezentativni, nego je napravljena gruba procjena mikoriznog statusa, što predstavlja preliminarne rezultate. Gruba procjena mikoriznog statusa provedena je procjenom broja mikoriziranih vršaka po biljci, a po klasama: 1) < 10 vršaka; 2) 10 – 20 vršaka; 3) > 20 vršaka; 4) > 50 vršaka. Za procjenu su mikroskopirane tri sadnice, odnosno po jedna sadnica iz svakog LOT-a, te je svaka sadnica zadovoljila klasu 4 (tablica 2). Inokulirane sadnice u ovom istraživanju bit će ocijenjene metodom *Fischer and Colinas* (2014) najmanje 12 mjeseci nakon inokulacije.

Prema Donnini i dr. (2014), mikorizni status inokuliranih sadnica tartufima povećavao se s vremenom nakon inokulacije tartufa. Istraživanjem su obuhvatili 10 biljnih vrsta iz rodova *Quercus, Corylus, Tilia, Cistus, Ostrya* i *Pinus* i šest vrsta tartufa, uključujući kombinaciju hrasta lužnjaka s crnim ljetnim tartufom. Nakon provedenog ocjenjivanja, 50 % ocijenjenih uzoraka imalo je mikorizu. Intenzitet razvoja mikorize kretao se između 35 % i 55 % godinu

dana nakon inokulacije, 40 % – 60 % dvije godine nakon inokulacije, odnosno 45 % – 65 % tri godine nakon inokulacije.

Tablica 2. Preliminarni rezultati mikoriznog statusa dobiveni procjenom

LOT	Vrsta biljnog simbionta	Vrsta tartufa	Nadzemni dio (cm)	Korijen (cm)	Promjer sadnice pri korijenu (mm)	Broj listova	Klasa mikoriznog statusa (*Tuber sp.*)
2302	*Q. robur*	*T. melanosporum*	21	19	7	3	4) > 50 vršaka
2305	*Q. robur*	*T. aestivum*	30	19	6	6	4) > 50 vršaka
2306	*Q. robur*	*T. aestivum*	23	19	5	2	4) > 50 vršaka



Slika 9. Mikorizirani vršci korijena sadnica hrasta lužnjaka 11 mjeseci nakon inokulacije crnim perigorskim tartufom *(T. melanosporum)* s vidljivim zadebljanjima i hifama.

Metoda Fischer i Colinas (2014) učinkovita je u otkrivanju neželjenih vrsta gljiva jer zahtijeva detaljan pregled cijeloga korijenskog sustava. U istom uzorku dopuštena je samo jedna sadnica s neželjenom vrstom mikorize, maksimalne dopuštene razine manje od 25 % ukupnog broja mikoriznih vrhova. Preporučuje se napraviti pregled korijenskih sustava nasumično odabranih mladih sadnica prije, ali i nekoliko mjeseci nakon inokulacije, kako bi se smanjila prisutnost neželjenih vrsta gljiva, npr. vrsta *Sphaerosporella brunnea* i



Slika 10. Mikorizirani vršci korijena sadnica hrasta lužnjaka 11 mjeseci nakon inokulacije crnim ljetnim tartufom *(T. aestivum)* s vidljivim zadebljanjima i hifama.

Pulvinula constellatio, koje se obično pojavljuju tijekom prve faze rasta u klimatski kontroliranim staklenicima (Donnini i dr. 2014).

Prema istraživanju Ángeles-Argáiz i dr. (2016), tresetna mahovina sadrži ektomikorizne spore vrsta *Suillus brevipes*, *S. brunnea* i *Thelephora terrestris* koje mogu razviti mikorizu. Utvrđeno je da su *S. brevipes* i *T. terrestris* donesene u tresetnoj mahovini, dok *S. brunnea* potječe iz staklenika. Iznimno je važno izbjeći kontaminirajuće vrste ili ih pak držati na minimalnoj razini, jer se one natječu u rizosferi s manje konkurentskim vrstama kao što su tartufi (Ángeles-Argáiz i dr. 2016). Prisutnost konkurentskih vrsta gljiva u korijenskom sustavu inokuliranih sadnica smanjuje mikorizu tartufa zauzimajući nemikorizirane vrhove korijena (Falini i dr. 2013).

Nadalje, u povoljnim uvjetima tla, kao i u stakleničkim uvjetima, može doći do kompeticije između različitih vrsta tartufa. *T. brumale* (zimski tartuf) i *T. indicum* (kineski ili azijski crni tartuf) najvažnije su konkurentske vrste vrstama *T. melanosporum* i *T. aestivum* (Bonet i dr. 2006, Zambonelli i dr. 2017, Ori i dr. 2018). Prema brojnim studijama, različite vrste tartufa česti su konkurenti u nasadima tartufa (De Miguel i dr. 2014).

Kvaliteta inokuliranih sadnica ne ovisi samo o stupnju razvoja mikorize, nego i o vegetativnom zdravlju tih sadnica. Biotrofni gljivični patogeni uzrokuju pepelnicu, uobičajenu folijarnu bolest mnogih vrsta drveća uključujući i hrast

lužnjak. Bolest može biti vrlo štetna za mlade hrastove sadnice i predstavljati velik problem pri prirodnom pomlađivanju, u rasadnicima i nasadima (Kebert et al. 2022). Pepelnica se lako širi u stakleniku s velikom vlagom zraka te na otvorenom kada su klimatski uvjeti povoljni. Dobre preventivne i higijenske mjere nužne su u ograničavanju širenja te bolesti, a isto je tako potreban dodatan oprez pri upotrebi pesticida. Također se povremeno pojavljuju štetnici, poput lisnih uši, na novom listu (Trufficulture 2024). Problem pepelnice moguće je izbjeći i tako da se odabiru biljni domaćini koji nisu podložni pepelnici. Pruett i dr. (2009) u svojem su se pokusu inokulacije ljetnim tartufom koristili sadnicama hibrida *Q. bicolor* Willd. × Q. *robur* (močvarni bijeli hrast × hrast lužnjak).

Prema istraživanju Falini i dr. (2013), postoji pretpostavka kako je hrast (medunac) bolji biljni simbiont za inokulaciju ljetnim tartufom u odnosu na neke druge vrste. U svojem istraživanju Falini i dr. analizirali su mikorizni status na sadnicama hrasta medunca (*Q. pubescens*), crnog graba (*Ostrya carpinifolia*) i lijeske (*Corylus avellana*), inokuliranih s crnim ljetnim tartufom. U istim uvjetima okoline uzgajali su sadnice koje su tijekom pet godina uzorkovane radi provedbe morfološke i molekularne analize kako bi se kvantificirala prisutnost mikorize tartufa i ostalih ektomikoriznih gljiva. Sadnice crnoga graba ili lijeske pokazale su veći stupanj razvoja mikorize crnoga ljetnog tartufa, za razliku od hrasta medunca, no s druge strane one su također bile s većim stupnjem razvoja neželjenih vrsta gljiva. Ipak, zaključili su kako je najbolja vrsta hrast medunac, koji raste sporo i uspostavlja mikorizni odnos sporije u odnosu na druge istraživane vrste te se čini da više preferira gljive roda *Tuber* nego ostale prisutne ektomikorizne gljive. Vrlo slična pretpostavka potvrđena je i u istraživanju koje su proveli Doninni i dr. (2014) u kojem je stupanj razvoja mikorize crnoga perigordskog i crnoga ljetnog tartufa bio veći kod sadnica lijeske i crnoga graba nego kod hrasta crnike i hrasta medunca, iako su hrastovi imali najmanju prisutnost ostalih ektomikoriznih gljiva.

Važni preduvjeti dobroga plantažnog uzgoja tartufa jesu kvaliteta proizvedenih inokuliranih sadnica i odabir mjesta nasada prema uvjetima tla i klime. Kvaliteta plantažnog uzgoja tartufa temelji se: i) na velikom postotku ektomikorize tartufa, ii) na odsutnosti ili maloj zastupljenosti neželjenih vrsta gljiva te iii) na zdravom razvoju biljaka (Falini i dr. 2013).

Unatoč velikom napretku u istraživanju tartufa, sve su manji prinosi prirodnih nalazišta crnih tartufa diljem Europe. Najodrživija alternativa za obnovu proizvodnje tartufa jest pravilno, odnosno poboljšano upravljanje

kultiviranim plantažama i nasadima (Fischer i dr. 2017). Nadalje, upotreba inokuliranih sadnica s micelijem tartufa vrlo je široka, kao npr. podizanje plantaža, pošumljavanje, popravljanje degradiranih staništa ili slobodna prodaja (Brenko i dr. 2022).

Zaključak

Conclusion

Iako je plantažni uzgoj crnih tartufa razvijena praksa u zemljama Europe, on u Hrvatskoj još uvijek nije razvijen. Prvi korak prema plantažnom uzgoju tartufa jest uzgoj kvalitetnih sadnica sa što većim stupnjem mikorize tartufa. Dosadašnji rezultati pokazuju uspješne znakove za pronalazak optimalne metode inokulacije različitih, autohtonih šumskih vrsta drveća i grmlja, kao preduvjet podizanja plantaža i nasada, a posljedično i daljnjeg istraživanja razvoja mikorize crnih tartufa u različitim uvjetima klime i tla. Potrebna su daljnja istraživanja o uzgoju inokuliranih sadnica hrasta lužnjaka i zaštita vegetativnog zdravlja tih sadnica. Hrast lužnjak osjetljiv je na napad pepelnice, što može negativno utjecati na njegov rast, zdravlje te potencijalno na mikorizu. Istraživanje o učinku upotrebe pesticida na mikorizu predstavljalo bi bitan doprinos razumijevanju interakcija između zaštite biljaka i simbiotskih gljiva. Takva istraživanja mogla bi pružiti vrijedne spoznaje o mogućim posljedicama primjene pesticida na mikorizu tartufa.

Zahvale

Acknowledgements

Istraživanje inokulacije hrasta lužnjaka dvjema vrstama crnih tartufa sastavni je dio projekta *Razvoj metoda mikorizacije šumskih sadnica, poticanje zelene ekonomije te povećanje stabilnosti šumskih ekosustava* koji neposredno financira Fond za zaštitu okoliša i energetsku učinkovitost.

Autori članka zahvaljuju ravnateljici Hrvatskoga šumarskog instituta nasl. doc. dr. sc. Sanji Perić na podršci u provedbi istraživanja. Zahvalu upućuju i dr. sc. Ivici Čehuliću, dr. sc. Maji Gradečki-Poštenjak, dr. sc. Sanji Novak-Agbaba, dr. sc. Nevenki Ćelepirović i dr. sc. Tamari Jakovljević na provedenim analizama i ustupljenim potrebnim materijalima te ostalim kolegama iz Hrvatskoga šumarskog instituta u Jastrebarskom na pomoći prilikom inokulacije biljaka. Autori zahvaljuju i vanjskoj stručnjakinji Christine Fischer, koja je svojim dragocjenim savjetima i stručnim znanjem znatno pridonijela istraživanju.

Literatura

References

Andrés-Alpuente, A., S. Sánchez, M. Martín, Á. J. Aguirre, J. J. Barriuso, 2014: Comparative analysis of different methods for evaluating quality of *Quercus ilex* seedlings inoculated with *Tuber melanosporum*. Mycorrhiza, 24 (S1): 29 – 37, <https://link.springer.com/article/10.1007/s00572-014-0563-x>. Pristupljeno 15. 1. 2024.

Ángeles-Argáiz, R. E., A. Flores-García, M. Ulloa, R. Garibay-Orijel, 2016: Commercial sphagnum peat moss is a vector for exotic ectomycorrhizal mushrooms. Biological Invasions, 18 (1): 89 – 101, <https://link.springer.com/article/10.1007/s10530-015-0992-2>. Pristupljeno 25. 3. 2024.

Bach, C., P. Beacco, P. Cammaletti, Z. Babel-Chen, E. Levesque, F. Todesco, C. Cotton, B. Robin, C. Murat, 2021: First production of italian white truffle (*Tuber magnatum* Pico) ascocarps in an orchard outside its natural range distribution in France. Mycorrhiza, 31 (3): 383 – 388, <https://link.springer.com/article/10.1007/s00572-020-01013-2>. Pristupljeno 16. 1. 2024.

Bonet, J. A., C. R. Fischer, C. Colinas, 2006: Cultivation of black truffle to promote reforestation and land-use stability. Agronomy for sustainable development, 26 (1): 69 – 76 <https://www.agronomy-journal.org/articles/agro/abs/2006/01/a5037/a5037.html>. Pristupljeno 1. 3. 2024.

Brenko A., J. Medak, M. Gradečki-Poštenjak, N. Ćelepirović, I. Čehulić, T. Jakovljević, S. Novak Agbaba, I. Zegnal, 2022: Kontrolirano naklijavanje i inokulacija hrasta crnike (*Quercus ilex* L.) s dvije vrste roda *Tuber*. Radovi, 48: 28 – 36.

Brenko A., K. Indir, D. Vuletić, D. Buršić, 2020: Strategija održivog tartufarstva Varaždinske županije. Hrvatski šumarski institut, Jastrebarsko. <https://www.researchgate.net/publication/358797991_Strategija_odrzivog_tartufarstva_Varazdinske_zupanije> Pristupljeno 10. 1. 2024.

Chevalier, G., 2010: Truffes et trufficulture en Europe. 3° Congresso internazionale di Spoleto sul tartufo, Comunitá Montana dei Monti Martani, Serano e Subasio, 65 – 72, <https://www.montagneaperte.it/wp-content/uploads/pubblicazioni/congresso-internazionale-tartufo/atto3_ex.pdf>. Pristupljeno 10. 3. 2024.

De Miguel, A. M., B. Águeda, S. Sánchez, J. Parladé, 2014: Ectomycorrhizal fungus diversity and community structure with natural and cultivated truffle hosts: applying lessons learned to future truffle culture. Mycorrhiza, 24 (S1): 5 – 18, <https://link.springer.com/article/10.1007/s00572-013-0554-3>. Pristupljeno 14. 3. 2024.

Donnini, D., G. M. N. Benucci, M. Bencivenga, L. B. Falini, 2014: Quality assessment of truffle-inoculated seedlings in Italy: proposing revised parameters for certification. Forest systems, 23 (2): 385, <https://fs.revistas.csic.es/index.php/fs/article/view/5029>. Pristupljeno 1. 3. 2024.

Falini, L. B., G. M. Benucci, M. Bencivenga, D. Donnini, 2013: Mycorrhization level in truffle plants and presence of concurrent fungi. Acta Mycologica, 47 (2): 169 – 173, <https://pbsociety.org.pl/journals/index.php/am/article/view/am.2012.020>. Pristupljeno 2. 3. 2024.

Finlay, R. D., 2008: Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. Journal of experimental botany, 59 (5): 1115 – 1126, <https://academic.oup.com/jxb/article/59/5/1115/541125>. Pristupljeno 1. 12. 2023.

Fischer, C. R., D. Oliach, J. A. Bonet, C. Colinas, 2017: Best practices for cultivation of truffles. Forest sciences centre of Catalonia, Solsona, Spain and Yaşama Dair Vakıf, Antalaya, Turkey, 8 – 25.

Fischer, C., C. Colinas, 2014: Método para la evaluación de calidad de planta y estado micorrícico de plantas de *Quercus ilex* inoculadas con *Tuber melanosporum*. Informe para el Centro de Investigación Forestal de Valonsadero, Junta de Castilla y León, <https://repositori.udl.cat/items/01e5ed8b-62ae-49f1-8853-1bd70e7d88ba>. Pristupljeno 14. 3. 2024.

Kebert, M., S. Kostić, E. Čapelja, V. Vuksanović, S. Stojnić, A. Gavranović Markić, M. Zlatković, M. Milović, V. Galović, S. Orlović, 2022: Ectomycorrhizal fungi modulate pedunculate oak's heat stress responses through the alternation of polyamines, phenolics, and osmotica content. Plants, (23) 11: 1 – 28, <https://www.mdpi.com/1999-4907/13/9/1491>. Pristupljeno 14. 3. 2024.

Kentelky, E., L. Zalan, T. Lunka, K. Benedek, D. Erzsébet, B. Putnoky-Csicsó, Z. Szekely-Varga, 2022: Mycorrhization of *Corylus avellana* L. and *Quercus robur* L. seedlings with *Tuber aestivum* Vittad. Scientific papers, series B. Horticulture, 66 (1): 701 – 705, <https://www.researchgate.net/profile/EndreKentelky/publication/363743052_mycorrhization_of_corylus_avellana_l_and_quercus_robur_l_seedlings_with_tuber_aestivum_vittad/links/632c5e8e0a7085215013548e/mycorrhization-of-corylus-avellana-l-and-quercus-robur-l-seedlings-with-tuber-aestivum-vittad.pdf>. Pristupljeno 21. 2. 2024.

Ori, F., P. Leonardi, E. Stagnini, V. Balestrini, M. Iotti, A. Zambonelli, 2018: Is *Tuber brumale* a threat to *T. melanosporum* and *T. aestivum* plantations? iForest – Biogeosciences and Forestry, 11 (6): 775 – 780, <https://iforest.sisef.org/abstract/?id=ifor2785-011>. Pristupljeno 12. 2. 2024.

Otsing, E., L. Tedersoo, 2015: Temporal dynamics of ectomycorrhizal fungi and persistence of *Tuber melanosporum* in inoculated *Quercus robur* seedlings in North Europe. Mycorrhiza, 25 (1): 61 – 66, <https://link.springer.com/article/10.1007/s00572-014-0591-6>. Pristupljeno 15. 1. 2024.

Özderin, S., 2018: Determining mycorrhiza rate in some oak species inoculated with *Tuber aestivum* Vittad. (summer truffle). Turkish journal of forestry, 19 (3): 226 – 232, <https://dergipark.org.tr/en/pub/tjf/issue/39497/435372>. Pristupljeno 11. 1. 2024.

Pruett, G. E., J. N. Bruhn, J. D. Mihail, 2009: Greenhouse production of burgundy truffle mycorrhizae on oak roots. New forests, 37 (1): 43 – 52, <https://link.springer.com/article/10.1007/s11056-008-9108-5>. Pristupljeno 22. 2. 2024.

Samils, N., A. Olivera, E. Danell, S. J. Alexander, C. Fischer, C. Colinas, 2008: The socioeconomic impact of truffle cultivation in rural Spain. Economic botany, 62 (3): 331 – 340, <https://link.springer.com/article/10.1007/s12231-008-9030-y>. Pristupljeno 25. 1. 2024.

Smith, S. E., D. J. Read, 2008: Introduction. Mycorrhizal symbiosis (Third Edition), Academic

Press, SAD, 1 – 9, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123705266500027>. Pristupljeno 15. 1. 2024.

Soudzilovskaia, N. A., P. M. Van Bodegom, C. Terrer, M. Van'T Zelfde, I. McCallum, M. L. McCormack, J. B. Fisher, M. C. Brundrett, N. C. De Sá, L. Tedersoo, 2019: Global mycorrhizal plant distribution linked to terrestrial carbon stocks. Nature communications, 10 (1): 5077, <https://www.nature.com/articles/s41467-019-13019-2>. Pristupljeno 10. 11. 2023.

Tang, X., F. Mi, Y. Zhang, X. He, Y. Cao, P. Wang, C. Liu, D. Yang, J. Dong, K. Zhang, J. Xu, 2015: Diversity, population genetics, and evolution of macrofungi associated with animals. Mycology, 6 (2): 94 – 109, <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21501203.2015.1043968>. Pristupljeno 3. 1. 2024.

Trufficulture, 2024: Trufficulture nurseries, Growing truffles. <https://trufficulture.com.au/growing-truffles/>. Pristupljeno 14. 3. 2024.

Tyub S., A. N. Kamili, Z. A. Reshi, S. S. Mearaj, I. Khan, 2015: Ecological functions of ectomycorrhizal fungi. Journal of research & development, 15: 122 – 129, <https://www.researchgate.net/publication/317620847_Ecological_Functions_of_Ectomycorrhizal_Fungi>. Pristupljeno 15. 12. 2023.

Van Der Heijden, M. G. A., F. M. Martin, M. A. Selosse, I. R. Sanders, 2015: Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. New phytologist, 205 (4): 1406 – 1423, <https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/nph.13288>. Pristupljeno 1. 11. 2023.

Zambonelli, A., P. Leonardi, M. Iotti, I. Hall, 2017: Ecological and genetic advances in the cultivation of *Tuber* spp. Revista Fitotecnia Mexicana, 40 (4): 371 – 377, <https://revfitotecnia.mx/index.php/RFM/article/view/173>. Pristupljeno 2. 2. 2024.

Zgrablić, Ž., 2016: Mikorizne gljive kao biološki pokazatelj zdravstvenog stanja kultura crnog bora (*Pinus nigra* J. F. Arnold) u Istri. Disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet šumarstva i drvne tehnologije, Zagreb.