



Vilniaus universitetas
Gyvybės mokslų centras
Biomokslų institutas

Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedra

Mikrobiologijos ir biotechnologijos studijų programos

IV kurso studentė

Urtė JURJONAITĖ

Medieną kolonizuojančių ksilotrofinių grybų charakterizavimas

Bakalauro darbas

Darbo vadovas:

dokt. Karolis Sivickis

Vilnius, 2020

Medieną kolonizuojančių ksilotrofinių grybų charakterizavimas

Darbas atliktas Gamtos tyrimų centro Botanikos instituto Augalų patologijos laboratorijoje

Darbą atliko: Urtė Jurjonaitė

Darbo vadovas: dakt. Karolis Sivickis

TURINYS

SANTRUMPOS	4
IVADAS	5
1.LITERATŪROS APŽVALGA	7
1.1.Grybų karalystės bruožai	7
1.2.Miško biotopas	8
1.3.Grybų gyvenimo būdai	9
1.4.Ksilotrofiniai, saprotrofiniai ir parazitiniai grybai miškuose	10
1.5.Medieną kolonizuojančių ksilotrofinių grybų įvairovė.....	13
1.5.1.Ksilotrofinių grybų pritaikymas biotechnologijose	14
1.6.Grybų identifikavimas ir charakterizavimas	15
1.6.1.Lakazės ir jų kokybiniai testai.....	17
1.6.2.Peroksidazės ir jų kokybiniai testai	17
2.METODIKA.....	18
2.1.Įranga, naudotos terpės ir tirpalai	18
2.2.Ksilotrofinių grybų rinkimas.....	19
2.3.Grybų izoliavimas iš medienos	19
2.4.Grybų izoliavimas iš vaisiakūnių	19
2.5.Morfologinis grupavimas ir izoliatų lyginimas	20
2.6.DNR skyrimas	20
2.7.Polimerazinė grandininė reakcija (PGR) ir sekoskaita	20
2.8.Lakazės ir peroksidazės sintezės nustatymas	21
3.REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	23
3.1.Ksilotrofinių grybų rinkimas.....	23
3.2.Gryninimas ir morfologinis grupavimas	26
3.3.Lakazių ir peroksidazių nustatymas.....	27
3.4.Grybų identifikavimas panaudojant PGR ir sekoskaita	30
LITERATŪROS SĄRAŠAS:.....	33
SANTRAUKA	39
SUMMARY	40
PRIEDAI.....	41

SANTRUMPOS

bp – bazių poros

CTAB – heksadeciltrimetilamonio bromidas

DNR – deoksiribonukleorūgštis

ITS –transkriptų vidinis skirtukas (angl. internal transcribed spacer)

LiP – lignino peroksidazė

LSU – didysis rDNR subvienetas

MEA – salyklo ekstrakto agaras

MnP – mangano peroksidazė

PDA – bulvių dekstrozės agaras

PGR– polimerazės grandininė reakcija

rDNR – ribosominė deoksiribonukleorūgštis

RNR – ribonukleorūgštis

SB – natrio boratas

SSU – mažasis rDNR subvienetas

µm – mikrometras

IVADAS

Grybai yra eukariotiniai organizmai, turintys gyvybiškai svarbų vaidmenį ekosistemoje, veikiantys žmones ir jų veiklą. Grybai yra būtini medžiagų skaidymui apykaitai ir pernašai. Jie tarpusavyje skiriasi savo gyvenimo būdu: kai kurios rūšys yra patogeninės, veikiančios augalus ir gyvūnus; kitos palaiko simbiotinius ryšius su įvairiomis augalų, dumblių, melsvabakterių ir gyvūnų rūšimis. Grybai taip pat turi didelę ekonominę reikšmę: jie yra naudojami alaus gamyboje, kepimo ir fermentacijos pramonėje, farmacijoje ir biotechnologinėse srityse. Tuo pačiu, grybai gali nulemti ir didžiulius piniginius nuostolius: gadina maistą, ardo medieną, sukelia augalų ir gyvūnų ligas (Mueller et al. 2011). Dėl grybų įvairovės ir gausos bei gyvybiškai svarbių vaidmenų jie turi būti analizuojami.

Nepaisant grybų svarbos ekosistemų funkcionavimui, daug informacijos apie šią karalystę vis dar trūksta. Duomenų bazėse pateikiamas mažas skirtingų grybų rūšių skaičius – tik 29 % visų žinomų rūšių. Taip pat nėra žinoma, kokia šios karalystės įvairovės dalis jau prarasta dėl besikeičiančių aplinkos sąlygų (Hawksworth ir Lücking 2017).

Viena iš *Basidiomycetes* eilių, *Polyporales*, pasižymi didele rūšine įvairove, tačiau ji vis dar nėra gerai ištirta. Šie grybai išsiskiria gebėjimu skaidyti medieną (yra ksilotrofai) ir, lyginant su kitais *Eucarya* domeno organizmais, tai atlieka efektyviausiai. Šis bruožas padaro juos labai svarbiais ekologiniu požiūriu – mediena kaupia daug maisto medžiagų ir mineralų, tačiau natūraliai yra labai lėtai. Ksilotrofiniai grybai šį irimo procesą pagreitina. Gebėjimas ardyti svarbų medienos junginį, ligniną, yra aktualus ir biotechnologiniu požiūriu: šie grybai turi potencialą būti pritaikyti bioremeditacijos, organinių taršalų valymo pramonėje. Toks ksilotrofinių grybų aktualumas įvairioms ekologinėms ir biotechnologinėms sritims padaro juos svarbiu tyrimų objektu.

Darbo tikslas

Išskirti ir identifikuoti medieną kolonizuojančius ksilotrofinius grybus remiantis jų morfologiniais, biocheminiais ir genetiniais požymiais.

Uždaviniai

1. Surinkti Neries ir Verkių regioniniuose parkuose dažniausiai aptinkamų ksilotrofinių grybų kolekciją ir išskirti į grynas kultūras.
2. Ištirti išskirtų grybinių izoliatų morfologines savybes.
3. Nustatyti morfologinių grupių atstovų ligniną skaidančių fermentų aktyvumą.

4. Patvirtinti izoliatų rūšinę tapatybę naudojant molekulinis metodus.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Grybų karalystės bruožai

Grybai – tai heterotrofiniai eukariotiniai organizmai, priskiriami *Fungi* karalystei. Jų kūnas sudarytas iš grybienos (micelio), susidedančios iš šakotų, 5 µm –50 µm skersmens vamzdelių, vadinamų hifais. Jie pasižymi tvirta chitinine sienele, gali turėti skersines pertvarėles – septas. Grybai geba formuoti įvairias struktūras, pavyzdžiui, rizomorfus (Walker ir White 2017) – šaknis primenančius hifų darinius, kurie atlieka maisto medžiagų pernašos funkciją. Šios karalystės atstovai dauginasi sporomis – mikroskopinėmis dauginimosi struktūromis, pritaikytomis plačiam išsklaidymui ar išgyvenimui nepalankiomis sąlygomis (Lukošienė ir Kutorga 2014).

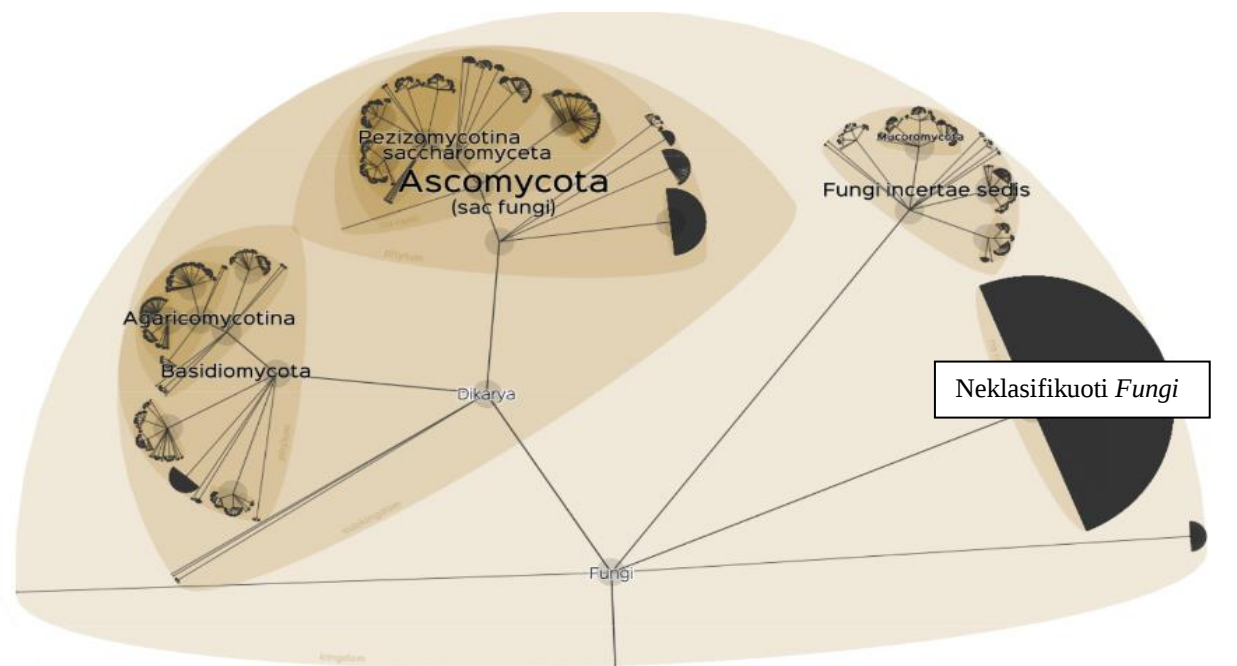
Grybų karalystė pasižymi išskirtine bioįvairove. Švedų botanikas ir mikologas Elisas Magnusas Frisas (angl. Elias Magnus Fries) 1825 m. spėjo, kad jie pasižymi viena didžiausia organizmų įvairove; 1960 m. mikologai iškėlė hipotezę, jog skirtingų grybų yra bent tiek pat, kiek skirtingų augalų rūšių, tačiau jokie skaičiavimai nebuvo atlikti. Tik 1992 m., susirūpinus bioįvairovės būkle, nuspręsta atlikti tikslią turimų duomenų analizę. Tada nuspėjamas grybų rūšių skaičius varijavo nuo 1,5 iki 5 milijonų. Dabar manoma, kad šis skaičius artimesnis 2,2–3,8 milijonams. Visgi šiuo metu atrasta ir pripažinta tik 120 tūkst. rūšių (Hawksworth and Lücking 2017). Likę unikalūs organizmai, tikėtina, auga sunkiai prieinamose teritorijose (pvz., tropinėse džiunglėse) arba yra klaidingai identifikuoti dėl morfologinio panašumo su kitais grybais. Šiuo metu GenBank duomenų bazėje patalpinta tik 29 % žinomų grybų rūšių. Toks didelis duomenų trūkumas yra viena iš priežasčių, skatinančių spačią mikologijos mokslo raidą.

Grybai yra itin plačiai paplitę organizmai. Yra rūšių, gyvuojančių dykumose, druskingose zonose, radiacija užterštose teritorijose. Dauguma auga ant žemės, ypač ten, kur gausu lengvai prieinamų maisto medžiagų. Dažnas grybų augimo biotopas¹ yra miškas, kuris pasižymi išskirtine maisto medžiagų ir organizmų įvairove.

Grybų karalystė pasižymi daugybe skirtingų morfologinių bruožų ir gyvenimo strategijų. Tai nulemia didžiulę jų taksonominę įvairovę (1.1.1 pav). Didžiausiam skyriui –

¹ Biotopas – gyvūnų ar augalų gyvenamosios aplinkos plotas, kuriam būdingos maždaug vienodos sąlygos

Ascomycota, priskiriama virš 64 tūkst. rūšių, *Basidiomycota* – 31 tūkst. ir *Deuteromycota* – 25 tūkst. (Lutzoni et al. 2004).



Paveikslėlis 1.1.1 Filogenetinis grybų medis (de Vienne 2016). Matomi du didžiausi skyriai: *Ascomycota* ir *Basidiomycota*. „*Fungi incertae sedis*“ – grybai, kurių vieta filogenetiniame medyje nėra aiški.

1.2. Miško biotopas

Mišakai yra dideli žemės plotai, apaugę medžiais. Jie reguliuoja atmosferos drėgmę, absorbuoja didelius CO₂ kiekius – tai slopina globalinio atšilimo vystymąsi. Šie biotopai taip pat pasižymi didžiule bioįvairove, kuri užtikrina ekosistemų funkcionalumą ir efektyvumą. Tačiau pasaulyje miškų padėtis blogėja. Nuo 1990-ųjų iki 2015-ųjų metų miškų teritorijos plotai sumažėjo 3 %, nuo 4128 mln. ha iki 3999 mln. ha (1.2.1 pav.) (Keenan et al. 2015). Toks greitas svarbių ekologinių vienetų nykimas daro didžiulę žalą pasauliui: organizmų įvairovės sumažėjimas ar išnykimas drastiškai keičia ekosistemas ir daro miškų apsaugą nuo natūralių pažeidimų bei žmonių daromos įtakos labai aktualia tema.

Viena iš miškų apsaugos sričių yra nuokritų kontrolė. Natūralūs miškai turi didelius kiekius negyvos medienos: nulūžusios šakos, kelmiai. Jie svarbūs ekosistemai, nes tokių augalinių liekanų irimas grąžina maisto medžiagas atgal į dirvą. Europoje didelė dalis miškų yra prižiūrimi, augalinės nuokritos išvežamos, todėl juose bendras žuvusios medienos kiekis yra iki 98 % mažesnis, nei laukiniuose (Siitonen 2001). Toks medienos pašalinimas sulėtina

miškų augimą, tačiau turi savo privalumų – per didelis negyvos medienos kiekis gali tapti ligų ir užkratų šaltiniu (van der Wal et al. 2017).

Regionas	1990	2000	2005	2010	2015
Centrinė Amerika	26,995	23,448	22,193	21,010	20,250
Karibai	5,017	5,913	6,341	6,745	7,195
Rytų Azija	09,198	226,815	241,841	250,504	257,047
Pietrėčių Afrika	319,785	300,273	291,712	282,519	274,886
Europa	994,271	1,002,302	1,004,147	1,013,572	1,015,482
Šiaurės Afrika	39,374	37,692	37,221	37,055	36,217
Šiaurės Amerika	720,487	719,197	719,419	722,523	723,207
Okeanija	176,825	177,641	176,485	172,002	173,524
Pietų Amerika	930,814	890,817	868,611	852,133	842,011
Pietų - Pietryčių Azija	319,615	298,645	296,600	295,958	292,804
Vakarų - Centrinė Afrika	346,581	332,407	325,746	318,708	313,000
Vakarų - Centrinė Azija	39,309	40,452	42,427	42,944	43,511
Iš viso	4,128,269	4,055,602	4,032,743	4,015,673	3,999,134

Paveikslėlis 1.2.1 Miškų plotų kitimas nuo 1990 iki 2015 pagal regionus (tūkst. ha) (Keenan et al. 2015). Matomas švelnus plotų didėjimas Karibų, Rytų Azijos, Šiaurės Amerikos, Okeanijos ir Vakarų – Centrinės Azijos regionuose, tačiau pasauliniu lygiu, bendras plotų dydis sparčiai mažėja.

Medžiai yra pagrindinė miškų sudedamoji dalis. Nuo kitų augalų jie išsiskiria aukšta lignino koncentracija ląstelių sienelėse, kuri gali siekti iki 40 % visos augalo masės. Ši medžiaga augalui suteikia tvirtumo ir apsaugo nuo įvairių biotinių ir abiotinių veiksnių (Tribot et al. 2019). Nepaisant to, yra organizmų, galinčių kolonizuoti gyvus ar negyvus medžius ir pasisavinti juose kaupiamas maisto medžiagas. Dažniausiai tai ksilotrofiniai grybai – jie geba ardyti ligniną pasitelkus įvairias fermentines ir chemines strategijas ir pasiekti augimui svarbius junginius.

1.3. Grybų gyvenimo būdai

Grybai yra plačiai paplitę ir tarpusavyje labai skiriasi morfologiniais, biocheminiais ir genetiniais bruožais. Jie gyvena įvairiuose biotopuose ir pasižymi skirtingais gyvenimo būdais: grybams būdingas mutualizmas, saprotrofizmas ir parazitizmas. Mutualistai, arba simbiotai, palaiko artimus ir abipusiškai naudingus santykius su kitomis rūšimis. Puikus pavyzdys, yra kerpės, sudarytos iš fotosintetinančių dumblių ir grybų, kurie visą sistemą aprūpina vandeniu ir

mineralinėmis medžiagomis. Kitos dvi grupės yra siejamos su medžiagų ardymu: saprotrofai yra atsakingi už nuokritų degradaciją, o parazitai tiesiogiai naudoja kito organizmo maisto medžiagas.

Didžioji dalis ksilotrofinių grybų yra saprotrofai – grybai, kurie kolonizuoja negyvą medieną ir ją ardo (Rodriguez-Moreno et al. 2018). Tai viena svarbiausių šių organizmų funkcijų, nes medienoje sukaupti mineralai ir organinės molekulės savaime degraduoja lėtai. Puikus ksilotrofinių saprotrofinių grybų pavyzdys yra *Daedalea quercina* – jis kolonizuoja negyvus *Quercus* sp. ir efektyviai suardo stovinčią ar nukritusią medieną (Ingold and Hudson 1993).

Ksilotrofiniai biotrofai² gyvena glaudžiai susiję su kitais organizmais, tačiau ši sąjunga naudinga tik grybui. Jie minta augalo sukauptomis organinėmis ir mineralinėmis medžiagomis, gyvena šeimininko viduje ir sukelia medžių ligas. Miškuose plačiai paplitęs parazitinis grybas *Fomitopsis betulina* dažniausiai užkrečia *Betula* sp., patekęs į šį augalą per medienos pažaidas. Normaliomis sąlygomis grybas nesugeba kolonizuoti sveiko medžio ir lieka neveiklus, tačiau, augalui nusilpus, micelis išplinta ir pradeda savintis maisto medžiagas. Tai nulemia *Betulus* sp. nusilpimą ir, galiausiai, žūtį (Gonthier and Nicolotti 2013).

Parazitiniai grybai skirstomi į obligatinius ir fakultatyvinius. Obligatiniai parazitai yra ganėtinai reti ir tiesiogiai nežudo augalo šeimininko. Fakultatyviniai grybai savo gyvenimo ciklą gali atlikti tiek ant gyvo, tiek ant negyvo augalo (Agrios 2005). Geras pastarųjų pavyzdys galėtų būti *Ganoderma* sp. grybai. Jie gali augti po vieną arba mažose grupėse, paprastai ant *Quercus* sp., *Acer* sp., *Ulmus* sp. ar *Salix* sp. kamienų, retkarčiais ant šių medžių šaknų. Tokie grybai laikomi parazitais ir saprotrofais, nes pradeda augti ant gyvų medžių, o jiems žuvus, toliau skaido negyvą medieną (Watkinson et al. 2016, Pinya et al. 2019).

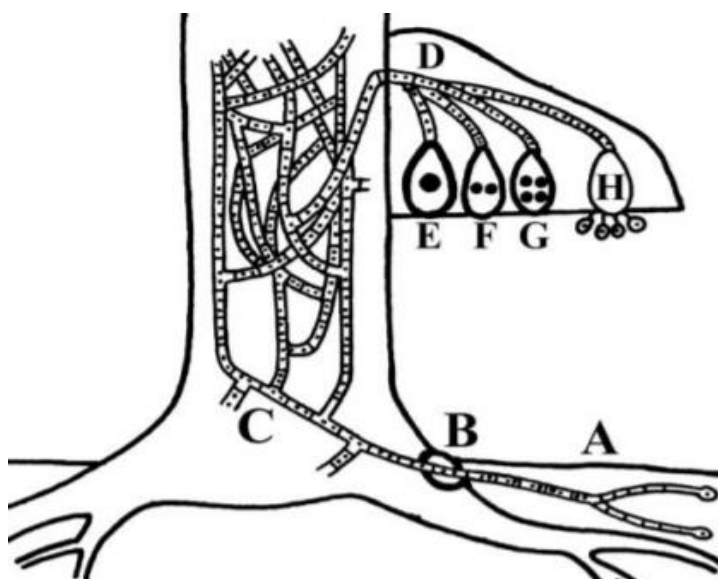
1.4. Ksilotrofiniai, saprotrofiniai ir parazitiniai grybai miškuose

Medieną ardantys grybai gyvą ar negyvą augalą infekuoja per žaizdas (1.4.1 pav.). Grybų hifai, augantys dirvožemyje ar kitame substrate, kontaktuoja su nauju šeimininku ir įsiskverbia į augalo audinius. Šioje stadijoje hifai įauga į medieną ir sintetina įvairius fermentus, palengvinančius maisto medžiagų įsisavinimą. To pasekmė yra įprastos medienos struktūros suardymas. Hifams išplitus, medžio paviršiuje pradedami formuoti vaisiakūniai – sporas gaminančios grybų kompleksinės struktūros. Sporakūnio³ formavimuisi įtakos taip pat turi temperatūra, drėgmė, maisto medžiagų ir šviesos kiekis (Schmidt ir Czeschlik 2006,

² Biotrofas – organizmas, mintantis gyvu substratu;

³ Sporakūnis – sporas gaminanti grybo kompleksinė struktūra; sinonimai: vaisiakūnis, sporokarpis;

Gordon and Leveau 2010). Subrendusios sporos plinta ir gali patekti į dirvožemį ar tiesiai į kitą augalą šeimininką, taip pakartoti savo gyvenimo ciklą.



Paveikslėlis 1.4.1 Medieną ardančio bazidiomiceto gyvenimo ciklas. A – haploidinės sporos ar hifai, suaugę dirvožemyje; B – patogeno patekimas į medį per žaizdą; C – medienos ardymas; E – kariogamija⁴; F,G – mejozė; H – subrendusi bazidija su bazidiosporomis (Schmidt ir Czeschlik 2006).

Augalas retai kolonizuojamas tik vieno grybo – nusilpę ir išvirtę medžiai greitai infekuojami įvairių ksilotrofinių rūšių atstovais. Pradinėse kolonizavimo stadijose grybai gali augti visiškai nekontaktuodami su kitomis rūšimis. Tik susidarius tankiai bendruomenei, atsiranda konkurencija. Tokie tarprūšiniai grybų santykiai skirstomi į tiesioginius (hifai neigiamai veikia vienas kitą, sintetindami ligninolitinius (t.y. ligniną ardančius) fermentus ir kitus antrinius metabolitus) ar netiesioginius (vienas iš organizmų suvartoja daugiau maisto medžiagų ir limituoja kito augimą) (Woodward ir Boddy 2008). Tiesioginė ir netiesioginė konkurencija gali nulemti dalinį ar visišką vienos rūšies išstūmimą arba abipusį susinaikinimą. Medieną kolonizuojančių organizmų grupėse pagrindiniai konkurenciją skatinantys veiksniai yra teritorija ir maisto medžiagų kiekis (Boddy 2000).

Ksilotrofinių grybų poveikis medienai bendrai vadinamas puvinium. Puvinių susidarymas yra ilgas, potencialiai dešimtis metų užtrunkantis procesas, kurio metu medieną formuojantys organiniai junginiai suardomi mikroorganizmų sintetinamais fermentais. Pradinėse puvinio stadijose medis neturi jokių akivaizdžių simptomų ir tik daug vėliau prarandamas medienos struktūrinis vientisumas, suformuojamos minkštos ir trapios zonos (Srivastava et al. 2013).

⁴ Kariogamija – susijungimas ir pasikeitimas branduolio medžiaga.

Išskiriami dvejų tipų puviniai – baltasis ir rudasis (1.4.2 pav.). Baltasis, arba korozinis puvinys, formuojasi, kai medienos organiniai polimerai ardomi nevienodais greičiais: ligninas greičiau nei celiuliozė. Šio proceso metu audinio sudedamųjų dalių santykis pakinta, tai nulemia baltos spalvos atsiradimą ir struktūrinius audinio pokyčius – mediena suyra į plaušus ir smulkias plokšteles. Rudasis, arba destruktcininis puvinys, pasireiškia, kai ardomi tik polisacharidai (celiuliozė ir hemiceliuliozė). Tokio ardymo metu augalo audiniai nusidažo rudai, o pati mediena suyra į mažus gabaliukus (Dabkevičius ir Brazauskienė 2007, Riley et al. 2014).



Rudasis puvinys

Baltasis puvinys

Paveikslėlis 1.4.2 Struktūriniai ir vizualiniai skirtumai tarp rudojo ir baltojo puvinio. Adaptuota pagal (Krah et al. 2018).

Baltojo ir rudojo puvinio pradžioje sukeliama vizualiai nepastebimi pokyčiai – mažėja maisto medžiagų, didėja drėgmė ir azoto kiekis, kinta medienos struktūra (Laiho ir Prescott 2004). Jei pūvantis augalas yra stovintis, tai gali palengvinti jo nuvirtimą. Šis medžio vidaus sąlygų pokytis gali būti naudingas vieniems grybams, ir žalingas kitiems – taip inicijuojamas kolonizuojančių rūšių kitimas.

Baltojo puvinio metu ligninas visiškai mineralizuojamas, o polisacharidai lėtai degraduojami hidrolazių pagalba. Lignino biopolimero ardyme dalyvauja stipriai oksiduojančios peroksidazės, kurios klasifikuojamos į lignino peroksidazes (LiP), mangano peroksidazes (MnP) ir universalias peroksidazes (VP) (Kirk ir Farrell 1987, Martínez 2002, Hammel ir Cullen 2008, Riley et al. 2014). Kitas baltajam puvinui aktualus fermentas yra vadinamas lakaze. Jis mažiau aktyvus nei peroksidazės, tačiau taip pat prisideda prie lignino depolimerizacijos (Yang et al. 2017).

Phellinus robustus yra vienas dažniausių *Quercus* sp. patogenų, atsakingas už baltąjį puvinį. Užkrato pradžioje grybas plinta horizontaliai link šerdies, paveikta mediena tampa balta, minkšta ir trapi. Vėlesnėse stadijose hifų augimas tampa vertikalus – formuojamos kolonos, kurių aukštis gali siekti net 6 metrus. Grybų vaisiakūniai formuojami aukštai, ant

kamienų bei šakų. *P. robustus* parazito paveiktas medis žūva – dėl suardytos medienos struktūros jis nėra tinkamas naudoti pramonėje ir, jei nėra nukertamas, toliau platina sporas bei nulemia kitų medžių užkratą (Sunhede ir Vasiliauskas 2002).

Rudojo puvinio susidarymo metu celiuliozė greitai depolimerizuojama, o ligninas modifikuojamas – tai leidžia grybo hifams įsiskverbi į augalinius audinius (Hatakka 2005, Sista Kameshwar ir Qin 2018). Celiuliozės ardymas paprastai vyksta ne fermentiniu keliu, o pasitelkus geležies jonus ir vandenilio peroksidą (Mäkelä et al. 2015). Šie grybai išsivystė iš baltąjį puvinį sukeliančių organizmų, pastariesiems praradus lignoceliulazinius fermentus, todėl nebaltyminis ardymo kelias rudąjį puvinį sukeliantiems grybams tapo pagrindiniu maisto medžiagų gavimo būdu (Pitman 2017). Rudojo puvinio grybai laikomi pagrindiniais medienos bei medienos gaminių ardytojais.

Fomitopsis pinicola yra saprotrofinis parazitinis grybas ir yra vienas dažniausių rudąjį puvinį keliančių organizmų Europoje – jis užkrečia įvairius spygliuočius ir lapuočius medžius. Šio grybo sporos į augalą patenka per mechanškai sukeltas žaizdas. Kolonizavimo pradžioje, grybas vystosi periferinėje stiebo dalyje, tik vėliau išplinta į centrinę dalį ir pradeda augti vertikaliai (Dabkevičius et al. 2006). Paveikta mediena palaipsniui įgyja rudesnę atspalvį ir galiausiai suyra į mažus gabalėlius.

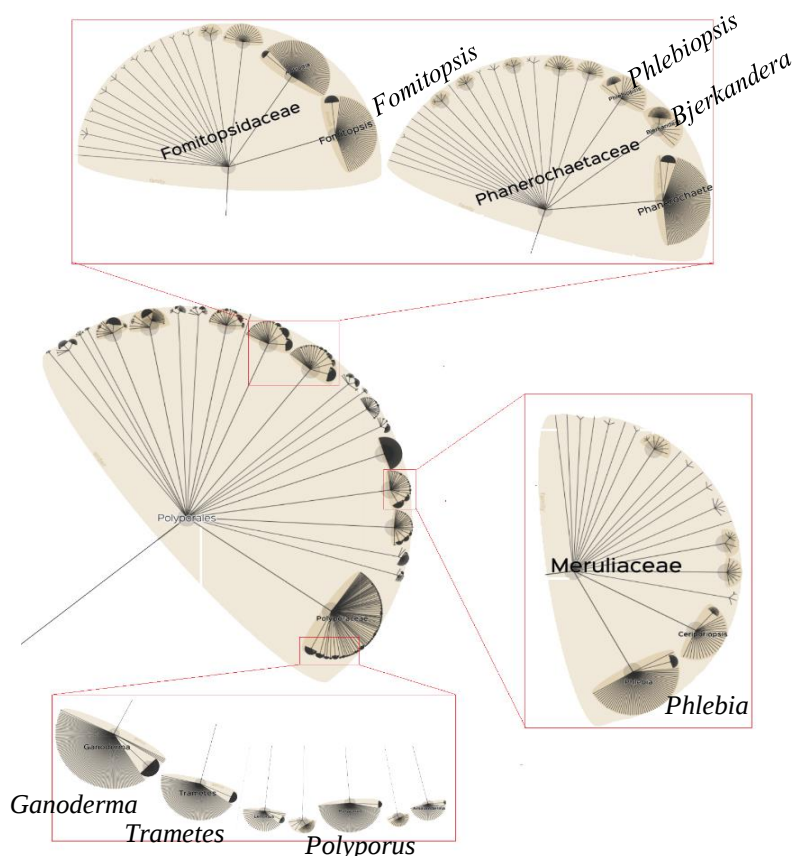
1.5. Medieną kolonizuojančių ksilotrofinių grybų įvairovė

Medieną kolonizuojantys grybai yra priskiriami keletui skyrių, tačiau dauguma priklauso *Basidiomycota* ir *Ascomycota*. *Ascomycota* yra didžiausias grybų skyrius, tačiau tik maža dalis jų gali degraduoti medieną (*Chlorociboria* sp.; *Hypoxylon* sp.). *Basidiomycota* sudaro apie 32 % visų apibūdintų grybų ir turi daugiausia medieną ardyti gebančių rūšių, patogenų ir mutualistinių simbiotų (pvz., *Daedalea* sp.; *Fomes* sp.; *Fomitopsis* sp. ir t.t.) (Riley et al. 2014).

Dauguma *Ascomycota* skyriui priklausančių ksilotrofinių grybų atakuoja medžius, kurių mediena jau yra struktūriškai pakitusi. Pavyzdžiui, *Chlorociboria* sp. kolonizuoja tik drėgną medieną. Grybo micelis yra baltas, tačiau pakitus aplinkos sąlygoms pradedamas sintetinti melsvas pigmentas – ksilidelinas, – kuris nudažo hifus ir medieną atitinkamu atspalviu (Weber 2016).

Polyporales, arba kempiniečiai, yra labai plati ir įvairi *Basidiomycetes* skyriui priklausanti eilė, turinti didžiausią ksilotrofinių grybų rūšių skaičių. Jai priklauso virš 1800 skirtingų rūšių, 216 genčių ir 22 šeimos grybų (1.5.1 paveikslėlis) (Ainsworth et al. 2008, Hussein et al. 2018). Šie grybai formuoja kempines – kanopos, gumbo ar vėduoklės formos,

kietas, dažniausiai bekotes struktūras, kurių apačioje esantis himenoforas formuoja sporas (Ginns 2017). Maža dalis *Polyporales* eilės grybų formuoja vaisiakūnius, kurie yra ploni ir auga prisiploję prie žievės (Watkinson et al. 2016, Ginns 2017). Vegetatyvinio dauginimosi metu formuojamos chlamidosporos – storas sienelės turinčios struktūros, kurios susiformuoja iš suapvalėjusių hifų ląstelių. Dauginantis lytiniu būdu formuojamos bazidijos⁵, o ant jų – bazidiosporos⁶ (Ginns ir Stalpers 1979).



Paveikslėlis 1.5.1 Filogenetinis *Polyporales* medis (de Vienne 2016). Raudonai apibrauktos ir paryškintos Lietuvoje dažnai randamos šeimos ir gentys.

1.5.1. Ksilotrofinių grybų pritaikymas biotechnologijose

Lignino skaidymas yra platų pritaikymą turinti grybų savybė, palengvinanti daugelį pramoninių procesų.

Įvairūs plačiai pramonėje naudojami organiniai junginiai, tokie kaip fenoliai, naftoliai, bisfenoliai, veikia kaip kancerogenai ar mutagenai, todėl tokių medžiagų patekimas į aplinką

⁵ Bazidijos – specializuotos ląstelės, ant kurių susidaro sporas.

⁶ Bazidiospora – lytinė spora, susiformavusi ant bazidijos.

yra labai žalingas. Būtent kempiniečių sintetinami lignolitiniai fermentai gali šias medžiagas suskaidyti ir pašalinti iš vandens ir dirvožiamio (Martínková et al. 2016).

Ksilotrofiniai grybai taip pat gali būti pritaikomi popieriaus pramonėje. Didžiulė dalis popieriaus gamybai naudojamų medžiagų prarandama, kai iš augalinės medžiagos šalinamas ligninas. Paprastai tai atliekama pasitelkiant cheminius ir mechaninius metodus. Šioje srityje pritaikius grybų fermentus būtų sutaupomi didžiuliai kiekiai energijos, pagerinama popieriaus kokybė ir sumažinamas pavojingų organinių junginių išskyrimas (López et al. 2017).

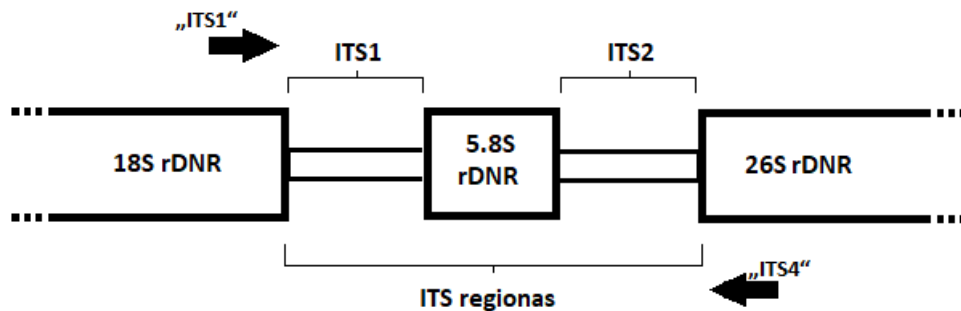
1.6. Grybų identifikavimas ir charakterizavimas

Identifikuojant ir charakterizuojant grybus, būtina naudoti kelis skirtingus metodus - kiekvienas organizmų analizės metodas turi savo trūkumus, todėl tik juos derinant galima gauti tiksliausių rezultatus. Morfologinis organizmo aprašymas buvo pirmasis identifikacijos metodas, tačiau dabar populiariausi ir dažniausiai naudojami yra molekuliniai tyrimai – sekoskaita. Nepaisant to, genų analizė nėra tinkama visiems grybams – kai kurie neturi identifikacijoje dažniausiai naudojamų sekų, todėl morfologinėmis ir biocheminėmis grybų savybėmis paremti metodai išlieka labai svarbūs jų identifikacijai.

Morfologinis grybų charakterizavimas yra ilgas ir sudėtingas, bet ganėtinai tikslus identifikavimo metodas (Raja et al. 2017). Jo metu, dėmesys kreipiamas į formuojamos kolonijos augimo greitį, formą, spalvą bei mikroskopines struktūras – sporas, hifus. Organizmai paprastai yra auginami ant kelių skirtingų terpių – nevienoda substratų sudėtis veikia izoliatų augimą, nulemia skirtingų struktūrų susidarymą. Turint dideles grybų grupes paprastai atliekamas morfologinis grupavimas: jie suskirstomi pagal būdinus požymius, kol vieną grupę sudaro morfologiškai identiškai individai. Toks suskirstymas sumažina analizuojamų organizmų mastą – tolimesniems eksperimentams naudojami tik grupių atstovai (Ginns ir Stalpers 1979). Siekiant tiksliai identifikuoti grybo rūšį reikalingas detalus pastarojo aprašymas. Jis taip pat būtinas norint atlinkti bet kokius kokybiškus tyrimus su specifiniu izoliatu.

Molekuliniai testai, dėl savo tikslumo ir greitumo, šiuo metu yra standartiniai identifikacijos metodai. Dažniausiai naudojama sekoskaita – nukleotidų išdėstymo tvarkos nustatymas. Grybų identifikacijai rūšių lygyje naudojamas rDNR transkriptų vidinio skirtuko (ITS) regionas, esantis tarp rDNR 18S SSU (mažojo subvieneto) ir 28S LSU (didžiojo subvieneto) (1.6.1 pav.). Šis regionas yra gana didelis (~ 550-700 bp), pasižymi dideliu variabilumu ir yra lengvai pagausinamas, todėl plačiai naudojamas identifikacijos tikslu. LSU ir SSU yra labiau konservatyvūs nei ITS, todėl tinka nustatant aukštesnę klasifikaciją (LSU - šeimą ar gentį, SSU – šeimą, eilę, klasę) (Raja et al. 2017). Nors ITS regionas plačiausiai

naudojamas grybų identifikacijoje, jis nėra tinkamas visiems grybams – kai kurios gentys visiškai neturi arba turi labai siauras transkriptų vidinio skirtuko zonas (Schoch et al. 2012). Tokiems organizmams naudojama papildoma, baltymą koduojanti, seka – dažniausiai RNR polimerazės genas. Nustatytos genų sekos toliau analizuojamos GenBank duomenų bazėje, tačiau joje, dėl klaidingai apdorotų sekų, yra nemažai netikslumų (Nilsson et al. 2006). Dėl šios priežasties identifikuoti organizmus vien sekoskaitos būdu neužtenka – būtina ir morfologinė analizė.



Paveikslėlis 1.6.1 Identifikacijai naudojamas rDNR regionas. „ITS1“ ir „ITS4“ – universalūs pradmenys; „ITS“ – transkriptų vidinis skirtukas; Adaptuota pagal (Baraket et al. 2009).

Tik cheminiai testai nėra tinkami metodai grybų identifikacijai, tačiau gali suteikti naudingos informacijos apie jų sintetinamas medžiagas. Identifikaciniai cheminiai testai yra kokybiniai – jie padeda nustatyti medžiagų buvimą, o ne jų kiekį. Paprastai tokie testai asocijuojami su spalvinėmis reakcijomis – medžiaga reaguoja su tiksliniais fermentais, toksinais ar metalais, tokios sąveikos produktas yra spalvą turintis junginys – indikatorius. Specifinių, grybams būdingų medžiagų ar jų kombinacijų nustatymas gali susiaurinti potencialių rūšių ratą, taip pagreitinoti identifikaciją ir patikslinti charakterizavimą. Kokybiniai cheminiai testai skirstomi į momentinius ir inkubuojamus, priklausomai nuo identifikuojamos medžiagos savybių (Taylor 1974). Nustatinėjant greitai sintetinamas ar grybuose kaupiamas medžiagas reagentai tiesiogiai kontaktuoja su hifais, o rezultatas gaunamas vos už kelių valandų. Inkubuojami testai paprastai reikalauja specifinių substratų bei auginimo sąlygų ir padeda nustatyti rečiau sinterinamų medžiagų buvimą. Kokybiniai cheminiai testai gali būti naudojami grybų grupavimui, charakterizavimui ar ieškant organizmų, sintetinančių specifines medžiagas (Ginns ir Stalpers 1979).

Charakterizuojant medieną ardančius grybus, naudinga atlikti lignino skaidyme dalyvaujančių fermentų kokybinius testus. Šių fermentų nustatymas leidžia analizuojamus grybus suskirstyti pagal puvinio tipą: rudojo puvinio grybai neturėtų sintetinti ekstraląstelių lakazių ir peroksidazių.

1.6.1. Lakazės ir jų kokybiniai testai

Lakazė – tai varį turinti polifenol-oksidadzė, kuri katalizuoja orto- ir para-diftenolių bei aromatinių aminių oksidaciją, pašalindama elektroną ir protoną nuo hidroksil-grupės ir suformuodama laisvą radikalą (Cohen et al. 2002). Šis fermentas yra paplitęs grybų karalystėje – randamas tarp *Ascomycetes*, *Deuteromycetes*, ir *Basidiomycetes*, ypač gausiai sintetinamas baltąjį puvinį sukeliančiuose grybuose (Conesa et al. 2002).

Išskiriamos trys pagrindinės fermento funkcijos: pigmento formavimas, lignino degradacija ir toksinų pašalinimas (Solomon et al. 1996). Ksilotrofiniuose grybuose lakazės pagrindinė funkcija yra depolimerizuoti lignino molekules. Fermentas negeba skaidyti mažos molekulinės masės junginių, juos gali tik polimerizuoti. Dėl šios priežasties jis niekada neveikia vienas – fermento reakcijose dalyvauja daugybė skirtingų baltymų ir metalų jonų. Taip pat yra baltąjį puvinį keliančių grybų, kurie lakazių visiškai nesintetina, bet geba skaidyti ligniną – taigi, fermentas pagreitina reakcijas, tačiau nėra būtinas joms įvykdyti (Cohen et al. 2002).

Lakazės aktyvumas tiesiogiai priklauso nuo aplinkos pH ir aromatinių junginių kiekio: didesnė pastarųjų koncentracija nulemia spartesnę fermento sintezę ir padidėjusį fermento aktyvumą (Fahraeus 1962, Cohen et al. 2002).

1.6.2. Peroksidazės ir jų kokybiniai testai

Peroksidazės yra fermentai, katalizuojantys oksidacijos reakcijas, naudojant vandenilio peroksidą. Šie baltymai yra labai plačiai paplitę, randami gyvūnų, augalų, grybų karalystėse.

Baltojo puvinio grybai lignino skaidymui pasitelkia kelias ekstraląstelinės peroksidazės. Lignino peroksidazės (LiP) oksiduoja įvairius aromatinius nefenolinius lignino junginius: benzilo alkoholių oksidacijos, šoninių grandinių kirtimai, žiedų skėlimai (Gold ir Alic 1993). Mangano peroksidazės (MnP) katalizuoja nuo mangano jonų priklausančias oksidacijos reakcijas (Glenn et al. 1986).

2. METODIKA

2.1. Įranga, naudotos terpės ir tirpalai

Atliekant grybų charakterizavimą, buvo naudojama skirtinga įranga (2.1.1 lentelė), terpės ir tirpalai (2.1.2 lentelė). Regentų ir prietaisų gamintojai bei terpių sudėtis aprašyta lentelėse.

Lentelė 2.1.1 Tyrimų metu naudoti prietaisai

Prietaisas	Gamintojas
Autoklavas Multicontrol 12l/18l	CertoClav, Austrija
II-os klasės laminariniai boksai CellGard	NUAIRE, JAV
Mikroskopas 102M	Motic, Jungtinė Karalystė
Mikroskopas Eclipse Ci	Nikon, Japonija
Nanospektrofotometras P330	Implen, Vokietija
Termocikleris Veriti 96 well thermal cycler	Applied Biosystems, JAV
Elektroforezės aparatas Sub-Cell® GT	Bio-Rad, JAV
Auginimo kamera Fitotron® SGC 120	Loughborough Technology Centre, Jungtinė Karalystė

Lentelė 2.1.2 Tyrimo metu naudotos terpės ir tirpalai, jų sudėtis.

Terpės pavadinimas	Sudėtis	Medžiagų konc.
MEA (Salyklo ekstrakto agaras)	Salyklo ekstraktas (Oxoid, UK)	20 g/l
	Agaras	20 g/l
	Distiliuotas vanduo	Iki litro
PDA (Bulvių ekstrakto agaras)	Bulvės	500 g/l
	Dekstrozė (Roth, Vokietija)	20 g/l
	Agaras	20 g/l
	Distiliuotas vanduo	Iki litro

CTAB tirpalas (Rosling et al., 2003)	CTAB milteliai (Acros Organics, JAV)	0,03 g/ml
	Tris-HCl (1 M) (Roth, Vokietija)	150 µl/ml
	EDTA (0,5 M) (Roth, Vokietija)	4 µl/ml
	NaCl (5 M) (Lachema, Čekija)	520 µl/ml
	Distiliuotas vanduo	330 µl/ml

2.2. Ksilotrofinių grybų rinkimas

Charakterizuoti grybai surinkti Verkių ir Neries regioniniuose parkuose 2019 metų gegužės mėnesį. Mėginiai buvo atsargiai nuimami nuo substratų ir perkeliama į maišelį. Buvo surinkti duomenys apie grybo augalą šeimininką: jo rūšis, būklė, vaisiakūnio augimo vieta, koordinatės.

2.3. Grybų izoliavimas iš medienos

Medienos zona, kurioje buvo pastebėta infekcijos simptomatika, buvo atsipjaunama taip, kad pažeista vieta patektų į mėginį. Atpjautas mėginys sterilizuojamas 1 % natrio hipochlorito (Emplura, Vokietija) tirpale 30 s ir plaunamas du kartus steriliame vandenyje (po 30 s) (Meenakshisundaram and Bharathiraja 2013). Mediena džiovinama ant filtrinio popieriaus ir smulkinama skalpeliu. Atpjaunamos mažos zonos tarp užkrėstos ir sveikos vietos, kur mediena dar gyva. Jos perkeliama į Petri lėkšteles su MEA ir PDA terpėmis ir auginamos tamsoje, 20 °C temperatūroje. Po kelių dienų grybai pradeda formuoti naujus hifus: skirtingai atrodančios dalys perkeliama į naujas lėkšteles ir toliau auginamos. Atliekami mikroskopavimai, siekiant nustatyti kultūros grynumą – kartojamas persodinimas ir mikroskopavimas iki tol, kol gaunama gryna kultūra. Izoliatams užaugus, jie sudedami saugojimui į 10 % glicerolį (Chempur, Lenkija) ir laikomi +4 °C.

2.4. Grybų izoliavimas iš vaisiakūnių

Vaisiakūnis laužiamas per pusę, iš vietų, kurios nekontaktuoja su aplinka išpjaunami maži gabalėliai. Jie sterilizuojami 96 % etanolio tirpale 30 s ir plaunami du kartus steriliame vandenyje (po 30 s) (Agrios 2005). Tada džiovinami ant filtrinio popieriaus ir perkeliama į Petri lėkštelę su MEA ir PDA terpėmis. Grybams pradėjus augti atliekamas gryninimas ir

mikroskopavimas tol, kol turima gryna kultūra. Izoliatams užaugus, jie sudedami saugojimui į 10 % glicerolį ir laikomi +4 °C.

2.5. Morfologinis grupavimas ir izoliatų lyginimas

Atliekamas morfologinis grupavimas. Grybai sodinami į MEA ir PDA terpes – skirtinga mitybinių terpių sudėtis veikia organizmų augimą, skatina įvairių struktūrų formavimąsi. Atliekant morfologinį grupavimą, pirma charakterizuojama pagal izoliato makro savybes – spalvą, formą, hifų tankį. Atliekamas mikroskopavimas, analizuojamas hifų storis, formuojamos septos, šakotumas, sporos bei jų bruožai. Skirtingose terpėse augančių izoliatų makroskopinės ir mikroskopinės struktūros skiriasi. Grupavimas vykdomas iki tol, kol vieną grupę sudaro morfologiškai identiškai izoliatai.

2.6. DNR skyrimas

Atlikus morfologinį grupavimą, kiekvienos grupės atstovų DNR buvo išskiriama remiantis CTAB protokolu (Rosling et al. 2003). Grybiena nuo MEA terpės perkelta į 1,5 ml mėgintuvėlį, kuriame yra 5 stiklo rutuliukai. Įpilama 600 µl CTAB tirpalo (G-Biosciences, JAV), purtoma 30 s 5500 aps/min. ir centrifuguojama 1 min 8000 aps./min greičiu, purtymas ir centrifugavimas pakartojami antrą kartą. Mėginiai 1 val. inkubuojami termocikleryje (Applied Biosystems, JAV), 65 °C temperatūroje. Į mėgintuvėlius įpilama 600 µl chloroformo (Fisher Chemical, JAV), supurtoma ir centrifuguojama 15 min. 10000 aps./min. Vandens fazė perkelta į naują, 1,5 ml mėgintuvėlį, į jį įpilama tiek chloroformo, kad vandens fazės ir jo santykis būtų 1:1. Vėl purtoma ir centrifuguojama 13000 aps./min. greičiu. Vandeninė fazė perkeliama į švarų, 1,5 ml mėgintuvėlį. Įpilama -20 °C izopropanolio (Fisher Chemical, JAV), pavartoma ir inkubuojama -20 °C temperatūroje, 30 min. Mėginiai centrifuguojami 13000 aps/min greičiu 30 min, palaikant 4° C temperatūrą. Supernatantas nupilamas, ant dugno prikibusios nuosėdos tirpinamos 200 µl, -20 °C etanolyje (70%). Centrifuguojama 13000 aps/min greičiu, skystis nupilamas ir išgarinamas. Prikibusis DNR tirpinama 30 µl vandens.

DNR koncentracija ir švarumas nustatytas naudojant spektrofotometrą (Nanodrop (Implen P330), Vokietija), mėginiai praskiedžiami iki 15 ng/µl.

2.7. Polimerazinė grandininė reakcija (PGR) ir sekoskaita

Su išskirta DNR atlikta PGR siekiant padauginti rDNR ITS zoną, reikalingą sekoskaitai. Naudoti universalūs pradmenys ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') ir ITS4 (5'-TCCTCCGCTTAT TGATATGC-3'). PGR tirpalo galutinis tūris buvo 15 µl mėginiui. Reakcijos tirpalo sudėtis: 9,375 µl vandens, 10x Green Buffer (ThermoFisher, Lietuva), 0,2 mM dNTP mišinio (ThermoFisher, Lietuva), 0,2 pM ITS1 pradmens, 0,2 pM ITS4 pradmens, 0,45 mM MgCl₂, 2,5 U/µl DreamTaq polimerazės (ThermoFisher, Lietuva) ir 15 ng/µl amplifikuojamos DNR. DNR padauginimo sąlygos: denatūracija 95 °C temperatūroje 2 min, tuomet 35 ciklai denatūracija 95 °C 30 s, prisijungimas 58 °C 30 s ir ilginimas 72 °C 30 s, o galutinė ilginimo stadija 72 °C 10 min.

PGR produktų kokybę vertinta elektroforezės pagalba. Naudotas 1,5 % SB gelis (2,25 g agarozės) (ThermoFisher, Lietuva), 150 ml SB (1x) buferio, 2 % „GelGreen“ dažo (Biotium, JAV). PGR produktai skirstyti gelyje prie 50 V įtampos 1 val. ir fotografuoti naudojant Fire Reader (UVitec Cambridge, Jungtinė Karalystė).

PGR produktai paruošti sekoskaitai: 12 µl PGR produkto kiekiui buvo gaminamas tirpalas, kurio sudėtis – 76,9 U/µl egzozonukleazės I (ThermoFisher, Lietuva) ir 3,1 U/µl „FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase“ (ThermoFisher, Lietuva). Sumaišius inkubuota 37 °C temperatūroje 15 min ir inaktyvuota 85 °C 15 min (Werle et al. 1994).

Gauti sekoskaitos duomenys apdoroti MEGA-X programoje, analizuoti GenBank duomenų bazėje.

2.8. Lakazės ir peroksidazės sintezės nustatymas

Cheminiai testai pradedami atgaivinant dominančius grybus: izoliatai sodinami į MEA terpę, lėkštelės centre. Kultūros augintos 7 dienas 25 °C temperatūroje auginimo kameroje Fitotron® SGC 120 (Loughborough Technology Centre, Jungtinė Karalystė). Atlikti cheminiai testai, siekiant nustatyti medieną ardančių grybų fermentų sintezę. 0,5 cm dydžio filtriniai lapeliai merkami į reakcijos medžiagas (lentelė 2.8.1), uždedami ant aktyviai augančių kultūrų kraštinių hifų ir stebimas spalvos pokytis. Duomenys fiksuojami po 3 val., 24 val., ir 48 val.

Lentelė 2.8.1. Naudoti reagentai, dominantis fermentas ir spalvinės reakcijos teorinis rezultatas.

Nr.	Reagentas	Fermentas	Spalvinė reakcija
1.	0,1 M α-naftolis ištirpintas 96 % etanolyje	Lakazė	Švelniai violetinė

2.	0,4% vandenilio peroksido ir 1% pirogalolio vandeninio tirpalas, santykiu 1:1	Peroksidazė	Geltonai ruda
----	---	-------------	---------------

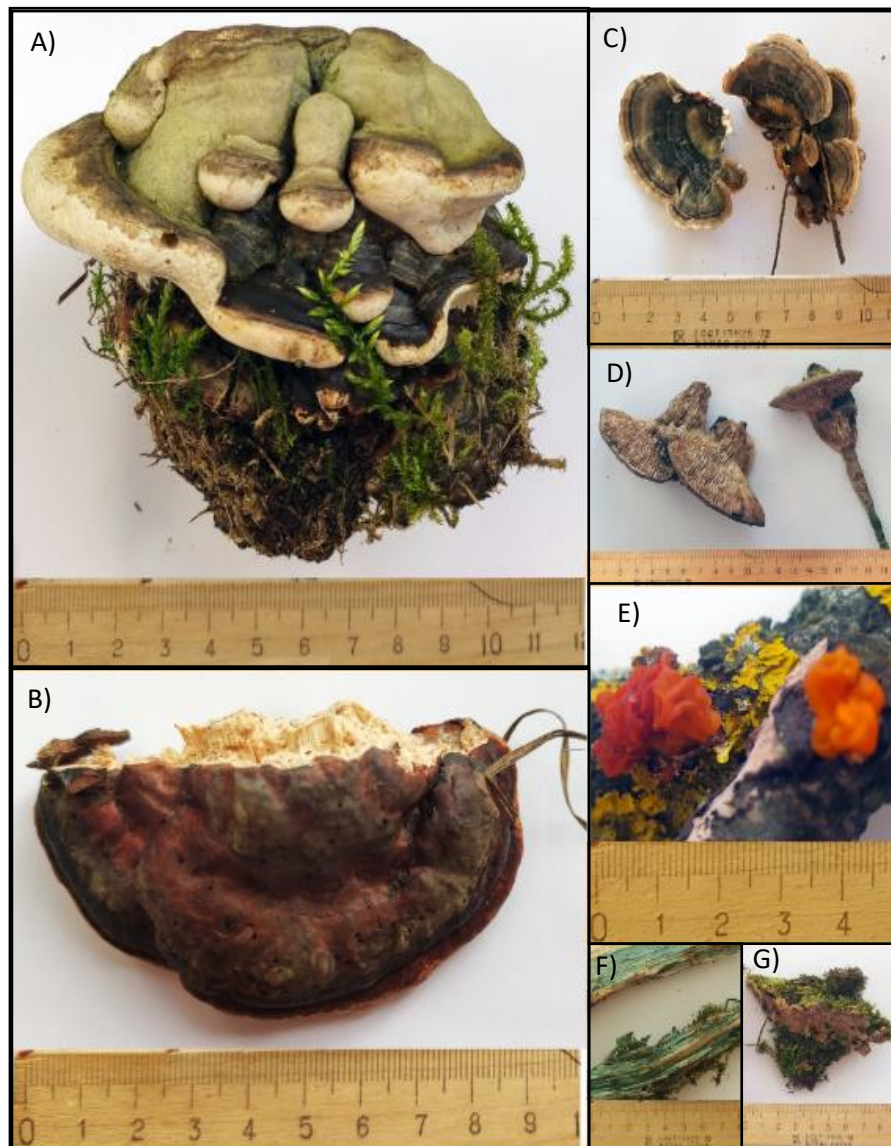
Lakazės kokybiniuose testuose pasitelkiamas fermento polimerizacinis aktyvumas. Šios reakcijos substratas, α -naftolis, yra baltos spalvos, vandenyje netirpus organinis junginys. Testo metu, medžiaga ištirpinama aukštos koncentracijos alkoholyje ir juo suvilgdyti filtrinio polieraus lapeliai dedami ant micelio. Ekstraląstelinės lakazės α -naftolį polimerizuoja į violetinės spalvos junginį, spalvos pokytis matomas plika akimi (Sjoblad et al. 1976).

Kokybiniam peroksidazės testui naudojamas pirogalolio ir vandenilio peroksido tirpalas. Juo suvilgdyti filtrinio popieriaus lapeliai dedami tiesiai ant hifų, kur gali kontaktuoti su ekstraląsteliniais fermentais. Tirpale esantis vandenilio peroksidas veikia kaip elektronų akceptorius, o pirogalolis verčiamas gelsvai rudu purpurgaliniu (Tauber 1953).

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Ksilotrofinių grybų rinkimas

Verkių ir Neries regioniniuose parkuose surinkti 25-ių skirtingų grybų vaisiakūniai (3.1.1 pav). Atliekant identifikaciją pagal vaisiakūnių morfologiją, jie priskirti 16 skirtingų genčių (3.1.1 lentelė). Gryninimo metu išskirti 106 izoliatai patalpinti į Gamtos tyrimų centro Augalų patologijos laboratorijos kolekciją.



Paveikslėlis 3.1.1. Neries ir Verkių regioniniuose parkuose surinktų medieną kolonizuojančių ksilotrofinių grybų pavyzdžiai A) *Ganoderma* sp.; B) *Fomitopsis* sp.; C) *Trametes versicolor* L.; D) *Daedalea quercina*; E) *Tremella* sp.; F) *Chlorociboria* sp.; G) *Phellinus* sp.;

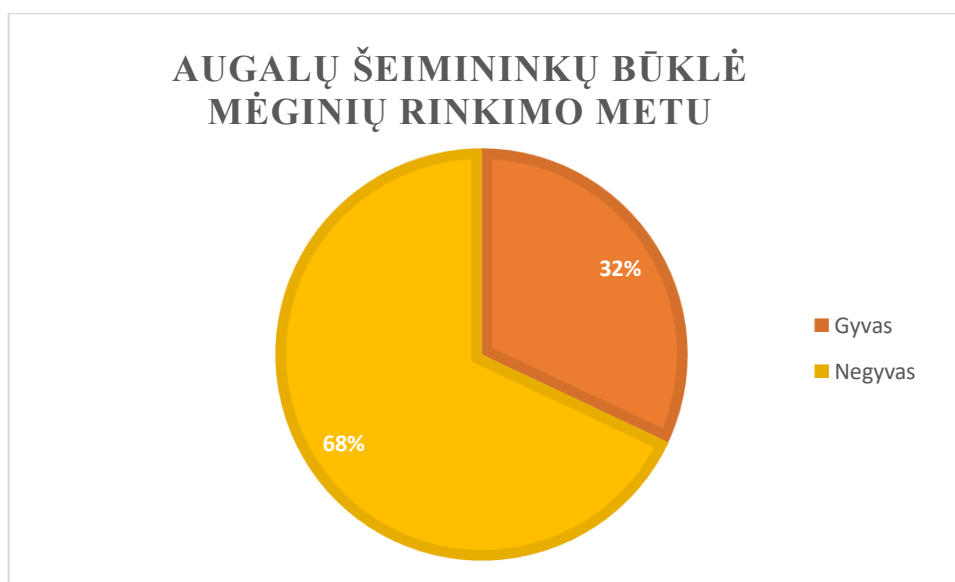
Lentelė 3.1.1 Analizuoti grybai, jų šeimininkai, šeimininko būklė ir vaisiakūnio augimo vietos; „n“ – neidentifikuota.

Nr.	Gentis / rūšis	Šeimininkas	Substratas	Augimo vieta	Parkas
1.	<i>Bjerkandera</i> sp.	n	Negyva	Kamienas	Verkių
2.	<i>Chlorociboria</i> sp.	<i>Betula</i> sp.	Negyva	Kamienas	Neries
3.	<i>Daedalea quercina</i>	<i>Quercus</i> sp.	Gyva	Kamienas	Verkių
4.	<i>Fomes</i> spp.	<i>Betula</i> sp.	Negyva	Kamienas	Neries
5.	<i>Fomes</i> spp.	<i>Betula</i> sp.	Gyva	Kamienas	Neries
6.	<i>Fomitopsis betulina</i>	<i>Betula</i> sp.	Gyva	Kamienas	Neries
7.	<i>Fomitopsis</i> spp.	<i>Tilia</i> sp.	Gyva	Šaka	Verkių
8.	<i>Fomitopsis</i> spp.	<i>Quercus</i> sp.	Negyva	Kamienas	Verkių
9.	<i>Ganoderma</i> spp.	<i>Quercus</i> sp.	Negyva	Kamienas	Verkių
10.	<i>Ganoderma</i> spp.	<i>Acer</i> sp.	Negyva	Kamienas	Verkių
11.	<i>Ganoderma</i> spp.	<i>Quercus</i> sp.	Negyva	Kelmas	Neries
12.	<i>Hymenochaete</i> sp.	<i>Acer</i>	Negyva	Šaka	Verkių
13.	<i>Hypoxylon</i> sp.	<i>Quercus</i> sp.	Negyva	Kamienas	Verkių
14.	<i>Phellinus igniarius</i>	<i>Acer</i> sp.	Gyva	Kamienas	Neries
15.	<i>Phellinus igniarius</i>	n	Negyva	n	Neries
16.	<i>Phellinus igniarius</i>	<i>Populus</i> sp.	Gyva	Kamienas	Neries
17.	<i>Phellinus</i> spp.	<i>Quercus</i> sp.	Gyva	Kamienas	Neries
18.	<i>Phellinus</i> spp.	<i>Quercus</i> sp.	Negyva	Kamienas	Neries
19.	<i>Phellinus</i> spp.	<i>Quercus</i> sp.	Negyva	Kamienas	Verkių
20.	<i>Phlebia radiata</i>	n	Negyva	Šaka	Verkių
21.	<i>Tremella</i> sp.	<i>Quercus</i> sp.	Gyva	Kamienas	Verkių
22.	<i>Trametes hirsuta</i>	n	Negyva	Kamienas	Verkių
23.	<i>Trametes pubescens</i>	<i>Quercus</i> sp.	Negyva	Šaka	Verkių
24.	<i>Trametes pubescens</i>	<i>Quercus</i> sp.	Negyva	Kamienas	Verkių
25.	<i>Trametes versicolor</i>	<i>Corylus</i> sp.	Negyva	Šaka	Verkių

Pastebėta, kad Verkių ir Neries regioniniuose parkuose randami ksilotrofiniai organizmai auga ant lapuočių medžių, dauguma ant *Quercus* sp. (42 %), *Betula* sp. (16 %) ir *Acer* sp. (15 %). Rementis Schmidt ir Czeschlik (2006), grybų polinkis augti ant lapuočių medžių atsiranda dėl mažesnio vandens kiekio jų medienoje lyginant su spygliuočiais.

Tarp surinktų grybų išsiskiria *Phellinus igniarius*, kuris buvo rastas ant *Populus* sp. genties medžio – šie organizmai linkę kolonizuoti *Quercus* sp. ir *Acer* sp. (CABI 2020), bei *Trametes versicolor*, kuris daug rečiau randamas ant *Corylus* sp., įprastai infekuoja *Fagus* sp. genties medžius (Schmidt ir Czeschlik 2006). Didžioji dalis ant nežinomų augalų rastų grybų pasižymi plačiu potencialių šeimininkų ratu (Dabkevičius et al. 2006). Tarp jų išimtis yra *P. igniarius*, kuris tradiciškai auga ant *Salix* sp. ir *Acer* sp. medžių – potencialūs grybo šeimininkai ir šioje situacijoje.

Didžioji dalis (68 %) surinktų grybų rasti ant negyvos medienos (3.1.2 pav). *Daedalea quercina*, *Phlebia radiata* ir *Chlorociboria* sp. yra laikomi saprotrofais, dažniausiai kolonizuojančiais jau negyvą medį (Ginns ir Stalpers 1979). Nepaisant to, *D. quercina* buvo rastas ant gyvo augalo. Remiantis Sunhede ir Vasiliauskas (2002), toks grybo išplitimas galimas, jei medis yra stipriai pažeistas ar užkrėstame audinyje yra prasidėjusi nekrozė. Visi kiti analizuojami grybai yra fakultatyviniai parazitai ir gali plisti tiek gyvame, tiek negyvame augale-šeimininke (Dabkevičius et al. 2006).



Paveikslėlis 3.1.2 Neries ir Verkių regioniniuose parkuose rinktų grybų pasiskirstymas pagal augalo šeimininko būklę.

Analizuojant vaisiakūnių augimo vietas, buvo nustatyta, kad 73 % visų grybų surinkti nuo medžių kamienų, 19 % – nuo šakų. Dauguma šakų buvo nulūžusios, saprotrofiniai grybai į jas pateko per žaizdas (Dabkevičius et al. 2006). Išimtis yra *Fomitopsis* sp., rastas ant gyvo medžio šakos. Yra žinoma, kad jo kolonijos medyje gali siekti net 8 m aukštį (Dabkevičius et al. 2006), o tai galėtų paaiškinti neįprastą vaisiakūnio augimo vietą.

3.2. Gryninimas ir morfologinis grupavimas

Iš 25-ių skirtingų grybų vaisiakūnių išskirti 106 izoliatai (3.2.1 lentelė). Pirmiausia grybai charakterizuojami mikroskopuojant, tarpusavyje lygintos izoliatų mikrostruktūros – hifų spalva, storis, septų išsidėstymas, šakojimosi ypatybės, formuojamos struktūros, sporos ar jų bruožai (dydis, spalva, forma). Tokiu būdu grybai priskirti 23 skirtingoms morfologinėms grupėms. Morfologinių savybių analizės metu, 60 % surinktų grybų identifikuoti iki genties, 40 % – iki rūšies.

Lentelė 3.2.1 Mikroskopavimo metu atliktas grupavimas. „Morfologinių gr. sk.“ – morfologinių grupių skaičius, išgautas gryninant atitinkamos genties/rūšies vaisiakūnius; „Izoliatų sk.“ – izoliatų skaičius, išskirtas iš atitinkamos genties/rūšies vaisiakūnių.

Nr.	Gentis / rūšis	Morfologinių gr. sk.	Izoliatų sk.
1.	<i>Bjerkandera</i> sp.	1	3
2.	<i>Chlorociboria</i> sp.	1	4
3.	<i>Daedalea quercina</i>	1	9
4.	<i>Fomes</i> spp.	2	14
5.	<i>Fomitopsis betulina</i>	1	3
6.	<i>Fomitopsis</i> spp.	4	14
7.	<i>Ganoderma</i> spp.	2	10
8.	<i>Hymenochaete</i> sp.	1	6
9.	<i>Hypoxylon</i> sp.	1	3
10.	<i>Phellinus igniarius</i>	1	9
11.	<i>Phellinus</i> spp.	3	12
12.	<i>Phlebia radiata</i>	1	2
13.	<i>Tremella</i> sp.	1	3
14.	<i>Trametes hirsuta</i>	1	3
15.	<i>Trametes pubescens</i>	1	9
16.	<i>Trametes versicolor</i>	1	2

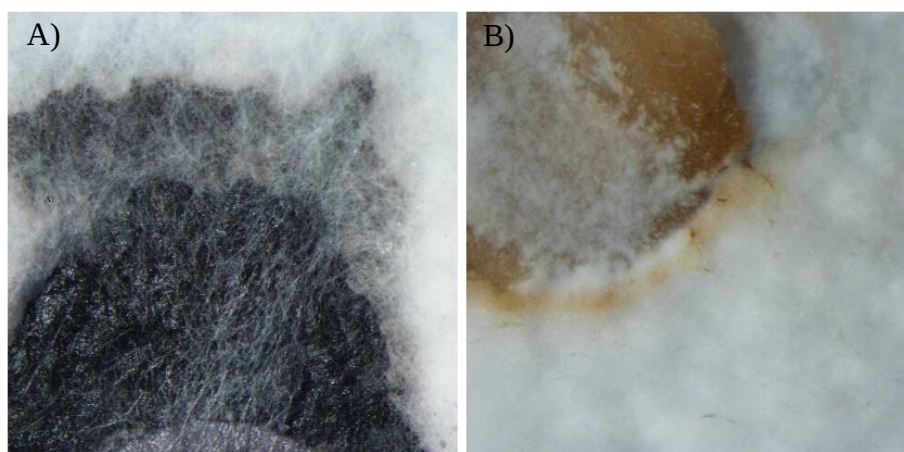
Tarp iki genties identifikuotų grybų, *Fomes* spp., ir *Fomitopsis* spp. gentims priskirti grybai, tikėtina, yra *Fomes fomentarius* ir *Fomitopsis pinicola* atitinkamai – abu šie organizmai yra randami Lietuvoje. Taip pat *Phellinus* spp., rastas ant *Quercus* sp. medžio: dažnas Lietuvos grybas, kuris auga ant *Quercus* sp. yra *Phellinus robustus*.

Mikroskopavimo metu pastebėta, jog 56 % grybų neformavo sporų – MEA ir PDA terpės tinka sparčiam augimui, bet ne visada sudaro sąlygas sporogenezei. Kartojant mikroskopavimus, turėtų būti pasirinktas didesnis kiekis skirtingų terpių.

Tarp sporas turinčių izoliatų, dažniausiai aptiktos chlamidosporos (nelytinės, vienalastės, storasienės, turinčios vidinę antrinę sienelę, ilgalaikės (ramybės) sporas), kurios susidaro prasidėjus maisto medžiagų trūkumui. Visų analizuotų grybų hifai buvo septuoti (turintys skersines hifų pertvarėles), 96 % pasižymėjo dichotominiu⁷ šakojimusi (1 priedas).

3.3. Lakazių ir peroksidazių nustatymas

Morfologinių grupių atstovai analizuojami atliekant cheminius testus, siekiant nustatyti lignolitinį aktyvumą (3.3.1 pav.).



Paveikslėlis 3.3.1 Spalvinės reakcijos metu susidarančių atspalvių pavyzdžiai. Nuotraukose *Trametes versicolor*, A) lakazės testas; B) peroksidazės testas. Padidinimas: 10 kartų.

Testai atlikti ant 7 dienų amžiaus kultūrų, rezultatai žymimi lentelėje „+“ ir „-“ ženklais (3.3.1 lentelė). Remiantis teoriniais ir praktiniais rezultatais, grybai, suformavę labai silpną atspalvį mažiau nei 50 %, buvo laikomi kaip fermento nesintetinantys.

Lentelė 3.3.1 Cheminių testų metu gauti rezultatai. „Mf. gr.“ – morfologinė grupė; „L“ – lakazės testas; „P“ – peroksidazės testas; rezultatų žymėjimas: „+“ – teigiama reakcija, „-“ – neigiama reakcija;

Mf. gr.	Gentis/rūšis	L	L	L	P	P	P
		3 val.	24 val.	48 val.	3 val.	24 val.	48 val.
1.	<i>Bjerkandera</i> sp.	-	-	-	+	+	+
2.	<i>Chlorociboria</i> sp.	+	+	+	+	+	+

⁷ Dichotominis šakojimasis – dvišakis šakojimasis

3.	<i>Daedalea quercina</i>	-	-	-	-	-	-
4.	<i>Fomes</i> spp.	-	+	+	+	+	+
5.	<i>Fomes</i> spp.	-	-	+	-	+	+
4.	<i>Fomes</i> spp.	+	+	+	+	+	+
19.	<i>Fomitopsis betulina</i>	-	-	-	-	-	+
6.	<i>Fomitopsis</i> spp.	-	-	-	-	+	+
7.	<i>Fomitopsis</i> spp.	-	-	-	-	-	-
8.	<i>Fomitopsis</i> spp.	-	-	-	-	+	+
9.	<i>Fomitopsis</i> spp.	-	-	-	+	+	+
10.	<i>Ganoderma</i> spp.	+	+	+	+	+	+
11.	<i>Ganoderma</i> spp.	-	-	+	+	+	+
12.	<i>Hymenochaete</i> sp.	-	-	+	-	+	+
13.	<i>Hypoxylon</i> sp.	-	-	+	+	+	+
14.	<i>Phellinus igniarius</i>	-	-	-	+	+	+
15.	<i>Phellinus</i> spp.	-	+	+	-	+	+
16.	<i>Phellinus</i> spp.	-	-	+	-	+	+
17.	<i>Phellinus</i> spp.	-	+	+	-	+	+
18.	<i>Phlebia radiata</i>	-	+	+	-	+	+
20.	<i>Tramella</i> sp.	-	-	+	-	+	+
21.	<i>Trametes hirsuta</i>	-	-	+	-	+	+
22.	<i>Trametes pubescens</i>	+	+	+	+	+	+
23.	<i>Trametes versicolor</i>	+	+	+	+	+	+

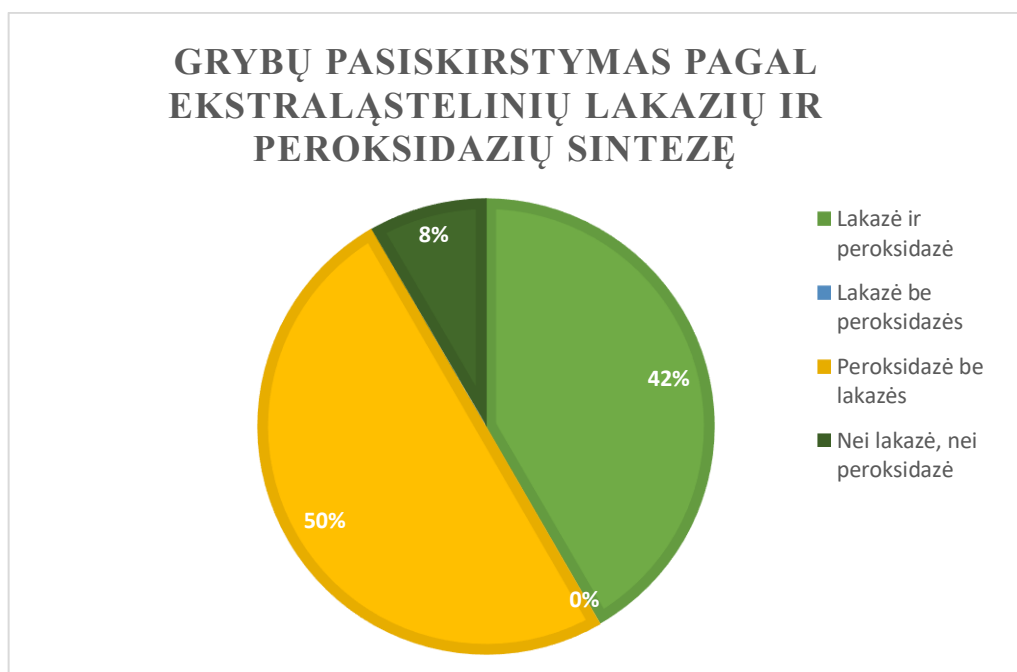
Atliekant duomenų analizę, pastebėta, kad 58 % tiriamų grybų izoliatų nepasižymi lakaziniu aktyvumu – fermentas nėra būtinas lignino skaidyme, tačiau gali reakciją pagreitinti. Iš imties pašalinus tuos grybus, kurie priskiriami rudiesiems puviniams ir neturi jokių lignolitinių fermentų (*D. quercina*, *Fomitopsis* spp.), matoma, kad lakazę sintetina 59 % baltąjį puvinį keliančių grybų. Išsiskiria *Bjerkandera* sp. ir *P. igniarius*, kurie nepasižymi jokia lakaziniu aktyvumu. Remiantis įvairiais literatūros šaltiniais, abu grybai turi potencialą sintetinti šį fermentą, tačiau jis gali nepasireikšti, pavyzdžiui, dėl per aukšto MEA terpės pH ar per mažo aromatinių junginių kiekio terpėje (Heinfling et al. 1998, Sun et al. 2014).

Siekiant pagerinti ir patikslinti gautus rezultatus, testai turėtų būti atlikti ant skirtingą pH turinčių terpių – žinoma, jog ši aplinkos sąlyga turi didelę įtaką lakazių aktyvumui. Tai pat būtų

naudinga varijuoti ir aromatinių junginių kiekiu: didesnė pastarųjų koncentracija nulemia spartesnę fermento sintezę ir padidėjusį fermento aktyvumą (Fahraeus 1962, Cohen et al. 2002).

Nustatyta, kad 86 % grybų sintetina peroksidazes. Iš imties pašalinus rudąjį puvinį sukeliančius grybus, šis skaičius pakyla iki 100 %. Tai atitinka teorinius rezultatus – baltojo puvinio grybai turi gebėti skaidyti ligniną, o tam būtinas peroksidazinis aktyvumas (Ginns ir Stalpers 1979). *Fomitopsis* spp. genties atstovai sukelia rudąjį puvinį, tačiau vis tiek pasižymėjo peroksidaziniu aktyvumu – toks aktyvumas atsiranda dėl silpnu peroksidaziniu aktyvumu pasižymičių fermentų sintezės (Horwitz et al. 2013).

Atliekant bendrą surinktų, medieną kolonizuojančių grybų lakazių ir peroksidazių sintetinio analizę, nustatyta, kad 50 % izoliatų sintetina tik peroksidazes, o 42 % sintetina abu fermentus (3.3.2 pav.). Nei lakazių, nei peroksidazių nesintetino tik 8 % visų analizuotų organizmų. Nė vienas iš analizuojamų grybų sintetino tik lakazę be peroksidazės.



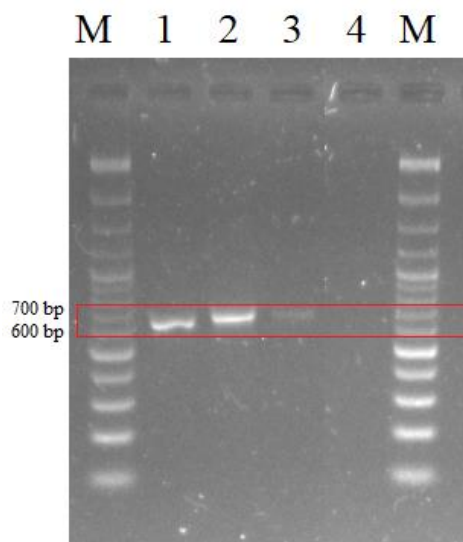
Paveikslėlis 3.3.2 Bendras rudąjį ir baltąjį puvinį keliančių grybų pasiskirstymas pagal lakazių ir peroksidazių sintezę.

Remiantis Kaarik (1965) atliktais lakazių testais, matomas gautų rezultatų sutapimas: analizuoti grybai atitinka duomenis, aptartus minėtame straipsnyje. Išsiskiria jau ankščiau aptarti *Bjerkandera* sp. ir *P. igniarius*, kurie, pagal straipsnį, turėtų sintetinti lakazes. Rementis peroksidazių testais, atliktais Ginns ir Stalpers (1979), duomenys taip pat kartojasi. Išimtis – *Fomitopsis* sp., kurių genties atstovai nesintetina peroksidazių. Anot (Horwitz et al. 2013) šie grybai gali sintetinti silpnas, lignino skaidyme nedalyvaujančias, peroksidazes. Analizuojant *Ascomycota* skyriui priklausančius grybus (*Chlorociboria* sp., *Hypoxylon* sp.), taip pat motomas

gautų duomenų sutapimas su teoriniais – abu izoliatai sintetina tiek lakazes, tiek peroksidazes (Jeon et al. 2018, Büttner et al. 2019, Idris et al. 2019).

3.4. Grybų identifikavimas panaudojant PGR ir sekoskaita

Tiramųjų izoliatų genties ir rūšies patikslinimui buvo panaudota polimerazės grandininė reakcija (PGR). ITS regiono padauginimui panaudojus universalius pradmenis buvo gauti ~650 bp ilgio fragmentai (3.4.1 pav.).



Paveikslėlis 3.4.1 Sekoskaitai skirtų ITS fragmentų elektroforezė. M – „GeneRuler™ 100bp DNA ladder plus“ DNR dydžio žymuo; 1 – teigiama kontrolė; 2 – *Fomes* spp. (izoliatas DM2.1, Mf: 5); 3 – *Hypoxylon* spp. (izoliatas NR5.4, Mf: 12); 4 – neigiama kontrolė;

Atlikta 2 grupių atstovų sekoskaita (3.4.2 pav.). Identifikuoti iki rūšies pavyko tik 5-os morfologinės grupės atstovą *Fomes fomentarius*. *Hypoxylon* sp. genties atstovas buvo identifikuotas iki genties lygmens. Genetiškai artimiausias organizmas buvo *Hypoxylon trugodes*, tačiau seka nustatyta keliuose kituose *Xylariales* eilės atstovuose.

Įvertinus morfologinių grupių atstovų sekoskaitos rezultatus gauta, kad identifikavimo patvirtinimui panaudojus universalius ITS1 ir ITS4 pradmenis grybų izoliatų sisteminė padėtis gali būti patikslinta ne iki rūšies, bet tik iki genties. Todėl morfologinis apibūdinimas ypač reikalingas interpretuojant gautus duomenis.

Sekoskaita turėjo būti atlikta visiems 23 morfologinių grupių atstovams, tačiau, dėl Lietuvos Respublikoje paskelbto karantino, ši darbo dalis nebuvo įvykdyta.

A)

Sequences producing significant alignments								Download	Manage Columns	Show	100
								GenBank	Graphics	Distance tree of results	
select all 100 sequences selected											
	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession				
☒	Fomes fomentarius isolate 9_A2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal	1144	1144	70%	0.0	99.83%	gi1356588027MF563980.1				
☒	Fomes fomentarius isolate 4_B2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal	1144	1144	70%	0.0	99.83%	gi1356588026MF563979.1				
☒	Fomes fomentarius isolate 3_A1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal	1144	1144	70%	0.0	99.83%	gi1356588025MF563978.1				
☒	Fomes fomentarius isolate 21_A3 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal	1144	1144	70%	0.0	99.83%	gi1356588023MF563976.1				
☒	Fomes fomentarius isolate 2_B1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal	1144	1144	70%	0.0	99.83%	gi1356588022MF563975.1				
☒	Fomes fomentarius isolate 19_SU3 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal	1144	1144	70%	0.0	99.83%	gi1356588021MF563974.1				

B)

Sequences producing significant alignments								Download	Manage Columns	Show	100
								GenBank	Graphics	Distance tree of results	
select all 100 sequences selected											
	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession				
☒	Hypoxylon frugosides MUCL 54794 ITS region, from TYPE material	396	396	27%	3e-110	96.67%	NR_155160.1				
☒	Asterocystis bambusicola MFLUCC 17-0127 ITS region, from TYPE material	438	438	44%	4e-123	88.00%	NR_158350.1				
☒	Barrmaelia moravica CBS 142769 ITS region, from TYPE material	520	520	52%	2e-147	87.96%	NR_153495.1				
☒	Anthostomellodes proteae CBS 110127 ITS region, from TYPE material	496	496	50%	3e-140	87.96%	NR_153511.1				
☒	Barrmaelia rapazii CBS 142771 ITS region, from TYPE material	507	507	51%	1e-143	87.92%	NR_153496.1				
☒	Hypoxylon calloense LIL STMA14059 ITS region, from TYPE material	390	390	39%	1e-108	87.72%	NR_167964.1				

Paveikslėlis 3.4.2 *Fomes fomentarius* (DM2.1; Mf: 5) (A) ir *Hypoxylon* spp. (NR5.4; Mf: 12) (B) sekoskaitos rezultatai.

IŠVADOS

1. Darbo metu iš viso išskirti 106 izoliatai, kurie suskirstyti į 23 morfologines grupes. Nustatyta, kad grybai priklauso 16 skirtingų genčių.
2. 62 % Verkių ir Neries regioniniuose parkuose surinktų grybų augo ant negyvos medienos, 38 % – ant gyvos. Visi ksilotrofiniai grybai augo ant lapuočių medžių.
3. Atlikus cheminius testus, skirtus nustatyti lignino ardyme dalyvaujančių ekstraląstelių fermentų sintezę, nustatyta, jog 42 % analizuotų izoliatų sintetina lakazes ir peroksidazes, 50 % – tik peroksidazes ir 8 % – nei vienos iš jų.
4. Atlikus dvejų morfologinių grupių atstovų sekoskaitą, patikslinta tiriamų grybų sisteminė padėtis: vienas grupės atstovas buvo identifikuotas iki rūšies kaip *Fomes fomentarius*, antrasis – tik iki genties ir priskirtas *Hypoxylon* sp.

LITERATŪROS SĄRAŠAS:

1. Agrios GN. 2005. Plant pathology. Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press.
2. Ainsworth GC, Bisby GR, Kirk PM. 2008. Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi / by P.M. Kirk ... [et al.] ; with the assistance of T.V. Andrianova ... [et al.]. Wallingford, Oxon, UK: CABI.
3. Baraket G, Saddoud O, Chatti K, Mars M, Marrakchi M, Trifi M, Salhi-Hannachi A. 2009. Sequence analysis of the internal transcribed spacers (ITSs) region of the nuclear ribosomal DNA (nrDNA) in fig cultivars (*Ficus carica* L.). *Scientia Horticulturae* 120: 34–40.
4. Boddy L. 2000. Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes. *FEMS Microbiology Ecology* 31: 185–194.
5. Büttner E, Liers C, Gebauer A, Collemare J, Navarro-Muñoz J, Hofrichter M, Kellner H. 2019. Draft Genome Sequence of the Wood-Staining Ascomycete *Chlorociboria aeruginascens* DSM 107184. *Microbiology Resource Announcements* 8: MRA.00249-19, e00249-19.
6. CABI. 2020. [Internetinė svetainė]. Sukurta 1990 [žiūrėta 2020-05-15]. Adresas: www.cabi.org/cpc.
7. Cohen L, Persky Y, Hadar R. 2002. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58: 582–594.
8. Conesa A, Punt PJ, van den Hondel C. 2002. Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. *Journal of Biotechnology* 93: 143–158.
9. Dabkevičius Z, Brazauskienė I. 2007. Augalų Patologija.
10. Dabkevičius Z, Vasiliauskas A, Žiogas A. 2006. Miško fitopatologija. Kaunas: Lututė.
11. Fahraeus G. 1962. Aromatic Compounds as Growth Substances for Laccase-producing Rot Fungi. *Physiologia Plantarum* 15: 572–580.
12. Ginns J, Stalpers JA. 1979. Identification of Wood-Inhabiting *Aphylllophorales* in Pure Culture. *Mycologia* 71: 224.
13. Ginns JH. 2017. Polypores of British Columbia: (Fungi: *Basidiomycota*).
14. Glenn JK, Akileswaran L, Gold MH. 1986. Mn(II) oxidation is the principal function of the extracellular Mn-peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 251: 688–696.
15. Gold MH, Alic M. 1993. Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiological Reviews* 57: 605–622.

16. Gonthier P, Nicolotti G. 2013. Infectious forest diseases. Boston, MA: CABI.
17. Gordon TR, Leveau J. 2010. Plant Pathology: A Story About Biology. Annual Review of Phytopathology 48: 293–309.
18. Hammel K, Cullen D. 2008. Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. Current Opinion in Plant Biology 11: 349–355.
19. Hatakka A. 2005. Biodegradation of Lignin. In: A Steinbüchel, editor. Biopolymers Online Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. bpol1005.
20. Hawksworth DL, Lücking R. 2017. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. Microbiology Spectrum 5: .
21. Heinfling A, Martinez MJ, Martinez AT, Bergbauer M, Szewzyk U. 1998. Purification and characterization of peroxidases from the dye-decolorizing fungus *Bjerkandera adusta*. FEMS Microbiology Letters 165: 43–50.
22. Horwitz B, Mukherjee PK, Mukherjee M, Kubicek CP. 2013. Genomics of Soil- and Plant-Associated Fungi. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
23. Hussein JM, Tibuhwa DD, Tibell S. 2018. Phylogenetic position and taxonomy of *Kusaghiporia usambarensis* gen. et sp. nov. (*Polyporales*). Mycology 9: 136–144.
24. Idris, Ramadhani I, Kanti A, Sudiana IM. 2019. Screening of potential lignin-degrading fungi from the tropical forest for lignocellulose biotreatment. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science 308: 012014.
25. Ingold CT, Hudson HJ. 1993. Ecology of saprotrophic fungi. The Biology of Fungi Dordrecht: Springer Netherlands. p. 145–157.
26. Jeon S, Ka K, Wang E, Ryoo R, Jang Y. 2018. Fundamental cultural characteristics of *Chlorociboria* spp. native to Korea. 한국균학회지 46: 145–160.
27. Kaarik A. 1965. The identification of the mycelia of wood-decay fungi by their oxydation reaction with phenolic compounds. 79.
28. Keenan RJ, Reams GA, Achard F, de Freitas JV, Grainger A, Lindquist E. 2015. Dynamics of global forest area: Results from the FAO Global Forest Resources Assessment 2015. Forest Ecology and Management 352: 9–20.
29. Kirk TK, Farrell RT. 1987. Enzymatic “Combustion”: The Microbial Degradation of Lignin. Annual Review of Microbiology 41: 465–501.
30. Krah F, Bässler C, Heibl C, Soghigian J, Schaefer H, Hibbett DS. 2018. Evolutionary dynamics of host specialization in wood-decay fungi. BMC Evolutionary Biology 18: 119.

31. Laiho R, Prescott CE. 2004. Decay and nutrient dynamics of coarse woody debris in northern coniferous forests: a synthesis. *Canadian Journal of Forest Research* 34: 763–777.
32. López AMQ, Silva ALS, Santos ECL. 2017. The fungal ability for biobleaching/biopulping/bioremediation of lignin-like compounds of agro-industrial raw material. *Química Nova* .
33. Lukošienė IP, Kutorga E. 2014. Mikologijos laboratoriniai darbai. Vilnius: Vilniaus universitetas: Vilniaus universiteto leidykla.
34. Lutzoni F, Kauff F, Cox CJ, McLaughlin D, Celio G, Dentinger B, Padamsee M, Hibbett D, James TY, Baloch E, Grube M, Reeb V, Hofstetter V, Schoch C, Arnold AE, Miadlikowska J, Spatafora J, Johnson D, Hambleton S, Crockett M, Shoemaker R, Sung G, Lücking R, Lumbsch T, O'Donnell K, Binder M, Diederich P, Ertz D, Gueidan C, Hansen K, Harris RC, Hosaka K, Lim Y, Matheny B, Nishida H, Pfister D, Rogers J, Rossman A, Schmitt I, Sipman H, Stone J, Sugiyama J, Yahr R, Vilgalys R. 2004. Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. *American Journal of Botany* 91: 1446–1480.
35. Mäkelä M, Marinović M, Nousiainen P, Liwanag A, Benoit I, Sipilä J, Hatakka A, de Vries RP, Hildén KS. 2015. Aromatic Metabolism of Filamentous Fungi in Relation to the Presence of Aromatic Compounds in Plant Biomass. *Advances in Applied Microbiology Elsevier*. p. 63–137.
36. Martínková L, Kotik M, Marková E, Homolka L. 2016. Biodegradation of phenolic compounds by Basidiomycota and its phenol oxidases: A review. *Chemosphere* 149: 373–382.
37. Martínez AT. 2002. Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme and Microbial Technology* 30: 425–444.
38. Meenakshisundaram M, Bharathiraja C. 2013. Isolation of wood rot fungi from Maruthamalai hills Western Ghats area of south India. 4.
39. Mueller GM, Bills GF, Foster MS. 2011. Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods.
40. Nilsson RH, Ryberg M, Kristiansson E, Abarenkov K, Larsson K, Kõljalg U. 2006. Taxonomic Reliability of DNA Sequences in Public Sequence Databases: A Fungal Perspective. *PLoS ONE* 1: e59.
41. Pinya S, Ferriol P, Tejada S, Sureda A. 2019. Mushrooms reishi (*Ganoderma lucidum*), shiitake (*Lentinula edodes*), maitake (*Grifola frondosa*). *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements Elsevier*. p. 517–526.

42. Pitman A. 2017. Deterioration and protection of sustainable biomaterials. *International Wood Products Journal* 8: 56–56.
43. Raja HA, Miller AN, Pearce CJ, Oberlies NH. 2017. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *Journal of Natural Products* 80: 756–770.
44. Riley R, Salamov AA, Brown DW, Nagy LG, Floudas D, Held BW, Levasseur A, Lombard V, Morin E, Otilar R, Lindquist EA, Sun H, LaButti KM, Schmutz J, Jabbour D, Luo H, Baker SE, Pisabarro AG, Walton JD, Blanchette RA, Henrissat B, Martin F, Cullen D, Hibbett DS, Grigoriev IV. 2014. Extensive sampling of *basidiomycete* genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111: 9923–9928.
45. Rodriguez-Moreno L, Ebert MK, Bolton MD, Thomma BPHJ. 2018. Tools of the crook- infection strategies of fungal plant pathogens. *The Plant Journal* 93: 664–674.
46. Rosling A, Landeweert R, Lindahl BD, Larsson K-H, Kuyper TW, Taylor AFS, Finlay RD. 2003. Vertical distribution of ectomycorrhizal fungal taxa in a podzol soil profile. *New Phytologist* 159: 775–783.
47. Schmidt O, Czeschlik D. 2006. *Wood and tree fungi: biology, damage, protection, and use*. Berlin: Springer.
48. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, Fungal Barcoding Consortium, Fungal Barcoding Consortium Author List, Bolchacova E, Voigt K, Crous PW, Miller AN, Wingfield MJ, Aime MC, An K-D, Bai F-Y, Barreto RW, Begerow D, Bergeron M-J, Blackwell M, Boekhout T, Bogale M, Boonyuen N, Burgaz AR, Buyck B, Cai L, Cai Q, Cardinali G, Chaverri P, Coppins BJ, Crespo A, Cubas P, Cummings C, Damm U, de Beer ZW, de Hoog GS, Del-Prado R, Dentinger B, Dieguez-Uribeondo J, Divakar PK, Douglas B, Duenas M, Duong TA, Eberhardt U, Edwards JE, Elshahed MS, Fliegerova K, Furtado M, Garcia MA, Ge Z-W, Griffith GW, Griffiths K, ... [et al.]. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 6241–6246.
49. Siitonen J. 2001. Forest Management, Coarse Woody Debris and Saproxylic Organisms: Fennoscandian Boreal Forests as an Example. *Ecological Bulletins* 11–41.
50. Sista Kameshwar AK, Qin W. 2018. Comparative study of genome-wide plant biomass-degrading CAZymes in white rot, brown rot and soft rot fungi. *Mycology* 9: 93–105.

51. Sjoblad RD, Minard RD, Bollag J. 1976. Polymerization of 1-naphthol and related phenolic compounds by an extracellular fungal enzyme. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 6: 457–463.
52. Solomon EI, Sundaram UM, Machonkin TE. 1996. Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chemical Reviews* 96: 2563–2606.
53. Srivastava S, Kumar R, Pratap V. 2013. Wood decaying fungi. USA: LAP LAMBERT ACADEMIC PUBL.
54. Sun J, Chen Q-J, Zhu M-J, Wang H-X, Zhang G-Q. 2014. An extracellular laccase with antiproliferative activity from the sanghuang mushroom *Inonotus baumii*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 99: 20–25.
55. Sunhede S, Vasiliauskas R. 2002. Ecology and decay pattern of *Phellinus robustus* in old-growth *Quercus robur*. *Karstenia* 42: 1–11.
56. Tauber H. 1953. Oxidation of pyrogallol to purpurogallin by crystallin catalase. *The Journal of Biological Chemistry* 205: 395–400.
57. Taylor JB. 1974. Biochemical tests for identification of mycelial cultures of basidiomycetes. *Annals of Applied Biology* 78: 113–123.
58. Tribot A, Amer G, Abdou Alio M, de Baynast H, Delattre C, Pons A, Mathias J, Callois J, Vial C, Michaud P, Dussap C. 2019. Wood-lignin: Supply, extraction processes and use as bio-based material. *European Polymer Journal* 112: 228–240.
59. de Vienne DM. 2016. Lifemap: Exploring the Entire Tree of Life. *PLOS Biology* 14: e2001624.
60. van der Wal A, Klein Gunnewiek P, de Hollander M, de Boer W. 2017. Fungal diversity and potential tree pathogens in decaying logs and stumps. *Forest Ecology and Management* 406: 266–273.
61. Walker GM, White NA. 2017. Introduction to Fungal Physiology. In: K Kavanagh, editor. *Fungi* Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. p. 1–35.
62. Watkinson SC, Boddy L, Money N. 2016. *The fungi*. Amsterdam: Academic Press.
63. Weber GI. 2016. A method to stimulate production of extracellular pigments from wooddegrading fungi using a water carrier. *Current Research in Environmental & Applied Mycology* 6: 218–230.
64. Werle E, Schneider C, Renner M, Völker M, Fiehn W. 1994. Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing. *Nucleic Acids Research* 22: 4354–4355.
65. Woodward S, Boddy L. 2008. Chapter 7 Interactions between saprotrophic fungi. *British Mycological Society Symposia Series Elsevier*. p. 125–141.

66. Yang J, Li W, Ng T, Deng X, Lin J, Ye X. 2017. Laccases: Production, Expression Regulation, and Applications in Pharmaceutical Biodegradation. *Frontiers in Microbiology* 8: 832.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS
BIOMOKSLŲ INSTITUTAS

Urtė JURJONAITĖ
Bakalauro baigiamasis darbas

Medieną kolonizuojančių ksilotrofinių grybų charakterizavimas

SANTRAUKA

Darbo metu siekiama išskirti ir apibūdinti Neries ir Verkių regioniniuose parkuose rastus, medieną kolonizuojančius ksilotrofinius grybus remiantis jų morfologiniais, biocheminiais ir genetiniais požymiais. Analizuojant augalus šeimininkus pastebėta, jog visi vaisiakūniai augo ant lapuočių medžių, o daugiausia aptikta ir išskirta – iš *Quercus* sp. Iš viso surinkti 25 pavyzdžiai, iš jų išskirti 106 izoliatai, iš kurių 62 % surinktų ksilotrofinių grybų augo ant negyvos medienos, 38 % – ant gyvos. Tyrimų metu įvertinta išskirtų grybų įvairovė: pagal morfologinius požymius izoliatai suskirstyti į 23 grupes ir priskirti 16 skirtingų genčių. Darbo metu, siekiant įvertinti lignino ardyme dalyvaujančių ekstraląstelių fermentų aktyvumą, tirtos ksilotrofinių grybų savybės. Nustatyta, kad 42 % analizuotų izoliatų sintetina lakazės ir peroksidazės, 50 % – tik peroksidazės ir 8 % – nei vieno iš jų.

VILNIAUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCES CENTER
INSTITUTE OF BIOSCIENCE

Urtė JURJONAITĖ
Bachelor thesis

Characterization of Wood-inhabiting Xylotrophic Fungi

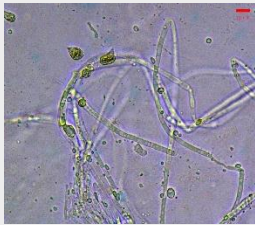
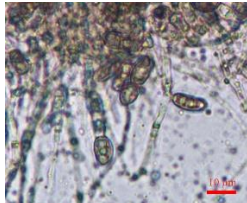
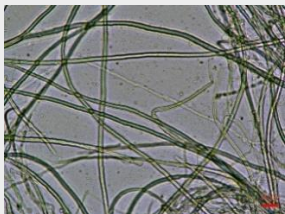
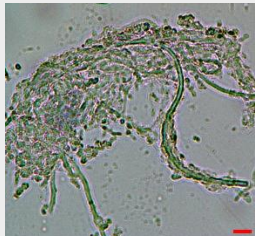
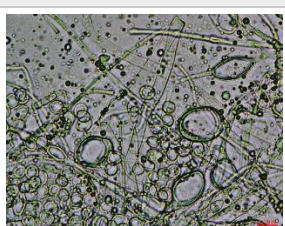
SUMMARY

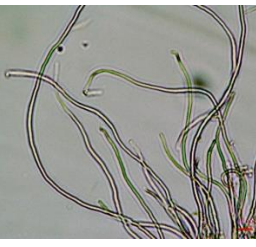
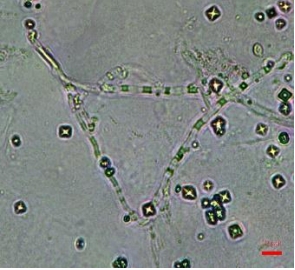
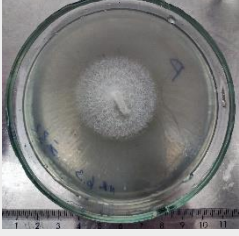
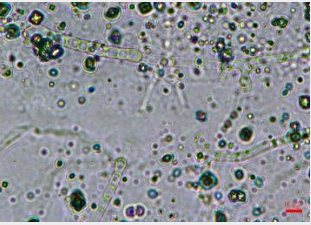
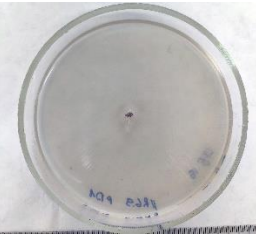
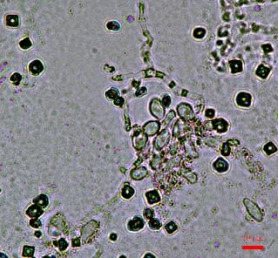
The main aim of this work is to isolate and characterise wood-inhabiting xylotrophic fungi found in Neris and Verkiai regional parks based on their morphological, biochemical and genetic traits. Upon conducting the analysis of host plants, it was determined that all of the collected individuals were found on deciduous trees, most commonly on *Quercus* sp. 106 isolates were procured from 25 different specimens, of which 62 % were found on dead plant matter, 38 % – on live matter. Isolates were analysed based on their morphological traits and identified as 16 different genus, then separated into 23 morphogroups. Xylotrophic fungi were analysed in an attempt to evaluate their lignin depolymerisation capabilities. It was determined that 42 % of fungi synthesize peroxidase and laccase together, 50 % – only peroxidase and 8 % do not produce either.

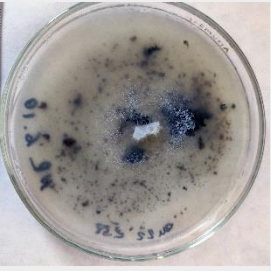
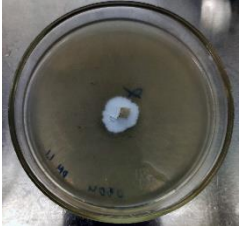
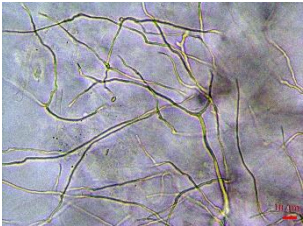
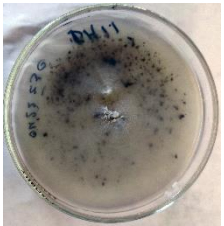
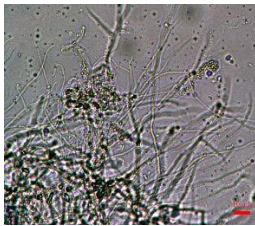
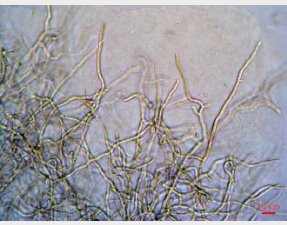
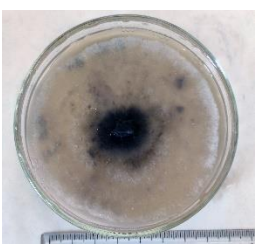
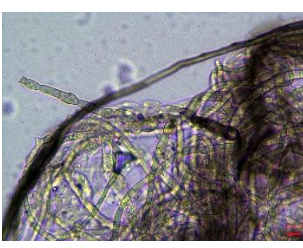
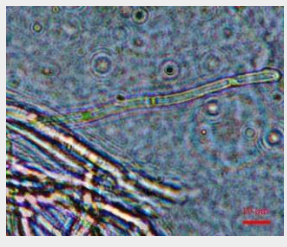
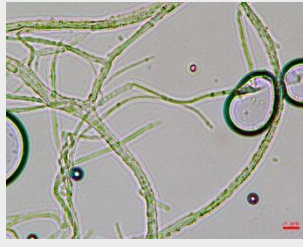
PRIEDAI

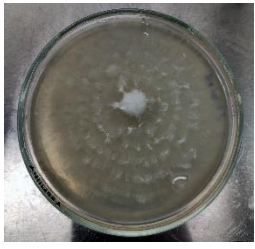
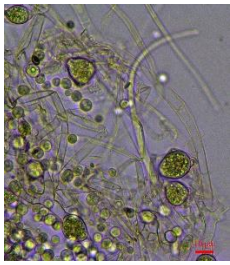
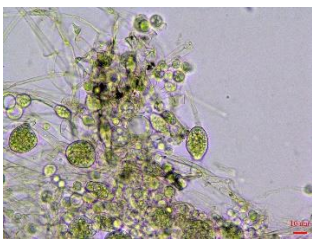
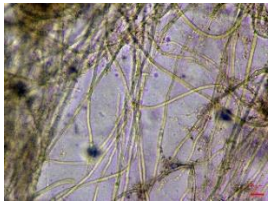
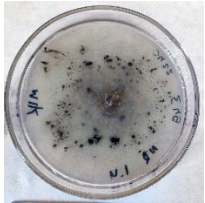
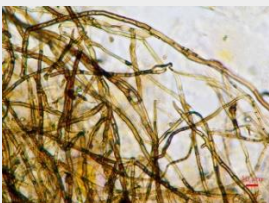
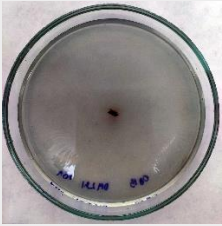
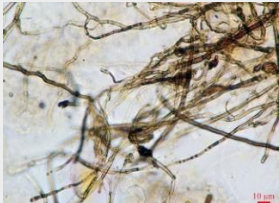
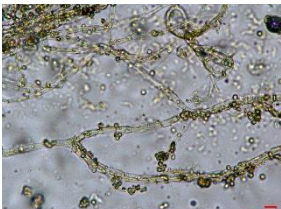
1 priedas

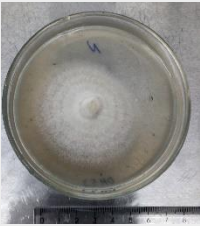
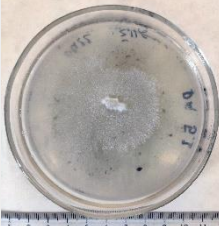
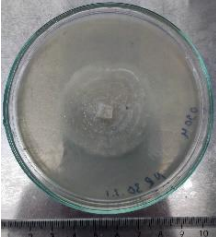
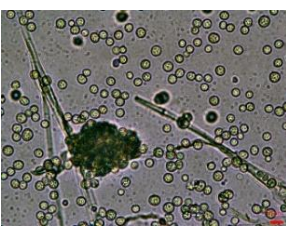
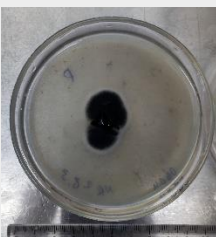
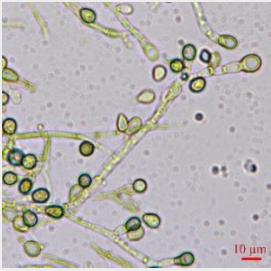
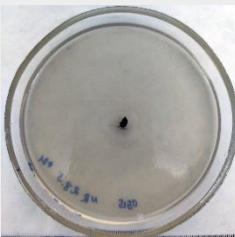
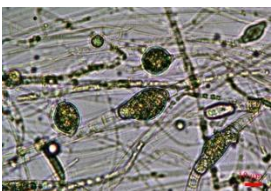
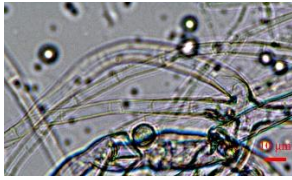
Morfologinio grupavimo rezultatai. Pirmame ir trečiame stulpeliuose kolonijos nuotraukos ant MEA ir PDA, antrame ir ketvirtame – mikroskopavimo nuotraukos ant MEA ir PDA. Grybo gentis ar rūšis, priskirta morfologinė grupė (trumpinta „Mf“), augimo greitis (matavimai atlikti po 7 dienų augimo), hifų ir sporų dydžiai aprašyti kiekvienoje eilutėje.

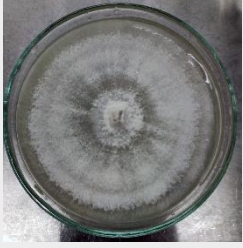
Makro vaizdas (MEA)	Mikro vaizdas (MEA) (400 x)	Makro vaizdas (PDA)	Mikro vaizdas (PDA) (400 x)	Aprašymas
				<i>Bjerkandera</i> sp.; Mf: 1, Augimas: 50 mm; hifai – 1 μ m, chlamidosporos (10–12) μ m $\times$ (5–7) μ m;
				<i>Chlorociobora</i> sp.; Mf: 2; Augimas: 10 mm; hifai – 2 μ m, Sporos – 10 μ m $\times$ 5 μ m;
				<i>Deadalea</i> <i>quercina</i> , Mf: 3; Augimas: 15 mm; hifai – (2–3) μ m; Sporų nėra;
				<i>Fomes</i> sp.; Mf: 4; Augimas: 27 mm, hifai – (15–20) μ m;

				Sporos $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$; $12\ \mu\text{m} \times 15\ \mu\text{m}$;
				<i>Fomes</i> sp.; Mf: 5; Augimas: 10 mm, hifai – $(2-7)\ \mu\text{m}$, chlamidiosporos $(9-12)\ \mu\text{m} \times (11-15)\ \mu\text{m}$;
				<i>Fomitopsis</i> sp.; Mf: 6; Augimas: 5 mm, hifai – $2\ \mu\text{m}$, sporų nėra;
				<i>Fomitopsis</i> sp.; Mf: 7; Augimas: 30 mm, hifai – $(5-6)\ \mu\text{m}$, sporos $3\ \mu\text{m} \times 3\ \mu\text{m}$;
				<i>Fomitopsis</i> sp.; Mf: 8; Augimas: 18 mm, hifai $(4-5)\ \mu\text{m}$, sporos – $4 \times 9\ \mu\text{m}$;

				<i>Fomitopsis</i> sp.; Mf: 9; Augimas: 5 mm, hifai – 4 μ m, sporų nėra;
				<i>Ganoderma</i> sp.; Mf: 10; Augimas: 0,6 mm, hifai – (1–2) μ m, sporų nėra;
				<i>Ganoderma</i> sp.; Mf: 11; Augimas: 10 mm, hifai (1–2) μ m, sporų nėra;
				<i>Hymenochaete</i> sp.; Mf: 12; Augimas: 31 mm, hifai (4–6) μ m; sporų nėra;
				<i>Hypoxyylon</i> sp.; Mf: 13; Augimas: 15 mm, hifai (3–5) μ m, sporų nėra;

				<i>Phellinus ignarius</i> ; Mf: 14; Augimas: 23 mm; hifai – (2–3) μ m, chlamidosporos (10–13) μ m $\times$ (10–15) μ m;
				<i>Phellinus</i> sp.; Mf: 15; Augimas: 50 mm, hifai – (2–4) μ m; sporų nėra;
				<i>Phellinus</i> sp.; Mf: 16; Augimas: 1 mm, hifai – (2–3) μ m; sporų nėra;
				<i>Phellinus</i> sp.; Mf: 17; Augimas: 2 mm, hifai – 2 μ m; sporų nėra;
				<i>Phlebia radiata</i> ; Mf: 18; Augimas: 15 mm, hifai – 3 μ m; sporų nėra;

				<i>Fomitopsis betulina</i> ; Mf: 19; Augimas: 10 mm; hifai – (2–4) μm , sporos – 1 $\mu\text{m} \times$ 1 μm
				<i>Tramella</i> sp.; Mf: 20; Augimas: 20 mm; hifai – (1–2) μm , sporos – 5 $\mu\text{m} \times$ 5 μm ; (8–10) $\mu\text{m} \times$ (10–12) μm ;
				<i>Trametes hirsuta</i> ; Mf: 21; Augimas: 8 mm, hifai – (2–3) μm , arthrokonidijos (5 $\times$ 5) μm ;
				<i>Trametes pubescens</i> ; Mf: 22; Augimas: 25 mm, hifai – (2–7) μm , sporos (10–12) $\mu\text{m} \times$ (10–12) μm ;



*Trametes
versicolor*; Mf:
23; Augimas:
31 mm, hifai –
(3–7) μm , sporų
nėra;