

**VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS**

SAULĖ MATIJOŠIŪTĖ

**ASCOMYCOTA ŠAKNŲ ENDOFITŲ IŠSKIRIAMŲ
LAKIŲJŲ ORGANINIŲ JUNGINIŲ (LOJ) IR SPORŲ
INOKULIACIJOS SKATINAMASIS POVEIKIS AUGALŲ
AUGIMUI**

Magistro baigiamasis darbas

Mikrobiologijos studijų programa

Darbo vadovė

Prof. habil. dr. Izolda Pašakinskienė

Darbas atliktas

Vilniaus universiteto Botanikos sodo mokslų programų skyriaus laboratorijoje

Vilnius, 2025

TURINYS

SANTRUMPOS	4
IVADAS	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA	7
1.1 Grybų filogenezė ir evoliucija	7
1.2 Endofitinių grybų klasifikacija	9
1.3 Endofitinių grybų tyrimo istorija	12
1.4 Endofitinių grybų biologinis vaidmuo	13
1.5 Endofitinių grybų lakieji organiniai junginiai (LOJ) ir jų funkcijos.....	16
1.6 Endofitų ir augalų molekulinė sąveika.....	17
1.7 Endofitų molekulinis indentifikavimas	18
1.8. Endofitiniai grybai	20
1.8.1 <i>Plectosphaerella cucumerina</i>	20
1.8.2. <i>Cadophora fastigiata</i>	21
1.8.3 <i>Epicoccum nigrum</i>	22
1.8.4 <i>Microdochium bolleyi</i>	24
1.8.5. <i>Paraphoma fimeti</i>	26
1.8.6. <i>Cordyceps fumosorosea</i>	28
1.8.7. <i>Chaetomium funicola</i>	28
1.9 Vasariniai miežiai (<i>Hordeum vulgare</i> L.).....	29
1.10 Raudonieji dobilai (<i>Trifolium pratense</i>).....	31
1.11 Paprastosios alyvos (<i>Syringa vulgaris</i>)	31
2. TYRIMŲ MEDŽIAGOS IR METODAI	32
2.1. Tyrimų objektas	32
2.2. Tyrimų metodai.....	32
2.2.1. Vasarinių miežių ‘Gunda DS’ daiginimas <i>in vitro</i> endofitinių grybų LOJ poveikyje.	33
2.2.2. Raudonųjų dobilų ‘Arimaičiai’ daiginimas <i>in vitro</i> endofitinių grybų LOJ poveikyje.	33
2.2.3. Endofitinių grybų išskiriamų LOJ analizė.....	34
2.2.4. Vasarinių miežių ‘Gunda DS’ inokuliacija endofitiniais grybais	35
2.2.5. Paprastųjų alyvų 'Mme Lemoine' veikimas endofitinių grybų sporų suspensija	36
2.3. Grybų izoliatai	37
2.4. Statistinė analizė	37
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	39

3.1 Endofitinių grybų izoliatų išskyrimas iš <i>Festuca</i> ir <i>Lolium</i> augalų šaknų	39
3.2. Endofitinių grybų LOJ poveikis vasariniams miežiams ‘Gunda DS’	42
3.3. Endofitinių grybų LOJ poveikis raudoniesiems dobilams ‘Arimaičiai’	47
3.4. Endofitinių grybų išskiriamų LOJ pasiskirstymas (GC-MS analizė)	51
3.5. Endofitinių grybų inokuliacijos poveikis vasariniams miežiams ‘Gunda DS’	53
3.6. Endofitinių grybų inokuliacijos poveikis paprastosioms alyvoms ‘Mme Lemoine’	56
IŠVADOS	59
ASMENINIO INDELIO APRAŠYMAS	60
PADĖKA	61
SANTRAUKA	62
SUMMARY	64
LITERATŪROS ŠALTINIAI	66
PRIEDAI	84
1 priedas	84

SANTRUMPOS

ACT (angl. *actin*) – aktinas

CaM (angl. *calmodulin*) – kalmodulinas

DG18 (angl. *Dichloran Glycerol 18% Agar*) – dichlorano-glicerolio agarų terpė

GC-MS (angl. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) – dujų chromatografija / masių spektrometrija

ITS (angl. *internal transcribed spacer*) – vidinio transkribuojamo tarpiklio sritis

LOJ (angl. VOC, *Volatile Organic Compounds*) – lakieji organiniai junginiai

MEA (angl. *Malt Extract Agar*) – salyklo ekstrakto agarų terpė

OA (angl. *Oat Agar*) – avižų agarų terpė

PCA (angl. *Plate Count Agar*) – ląstelių skaičiavimo agarų terpė

PDA (angl. *Potato dextrose agar*) – bulvių dekstrozės agarų terpė

RPB2 (angl. *RNA polymerase II subunit B2*) – RNR polimerazės II subvienetas B2

SDAY (angl. *Sabouraud dextrose agar plus 1% yeast extract*) – sabouraud dekstrozės agarų ir mielių ekstrakto terpė

TEF1- α (angl. *translation elongation factor 1 alpha*) – translacijos elongacijos faktorius 1 alfa

TSE (angl. DSE, *Dark septate endophyte*) – tamsiaspalviai septuoti endofitiniai grybai

IVADAS

Simbiontinė endofitinių grybų ir augalų – šeiminkų sąveika per pastaruosius metus susilaukė didelio susidomėjimo. Įvairūs tyrimai atskleidžia, jog šis tarpusavio ryšys gali teigiamai veikti augalų – šeiminkų augimą, keisti šaknų architektūrą, apsaugoti nuo biotinio ir abiotinio streso (Sun et al., 2020b; Tang et al., 2022; Wang et al., 2024). Nepaisant skaitlingų tarptautinių konvencijų, susijusių su cheminių trąšų naudojimo mažinimu, gamtai žalingų trąšų vartojimas, remiantis FAO 2024 m. statistikos metraščiu, vis dar išlieka aukštas. Norint sumažinti globalinį atšilimą, vandens užterštumą bei ekosistemų sutrikdymą, sukliamą sintetinių trąšų, didėja susidomėjimas alternatyvomis – aplinkai nekensmingomis biotrášomis. Būtent dėl savo savybių teigiamai veikti augalus, endofitiniai grybai bei jų išskiriami antriniai metabolitai yra laikomi vieni iš aktualiausių bei perversmą žemės ūkio srityje galinčių sukelti alternatyvų (Gateta et al., 2023).

Endofitinių grybų biotrášos vis daugiau aptinkamos rinkoje ir yra taikomos tokiose augalų šeimose kaip Poaceae, Solanaceae ir Fabaceae (Khan et al., 2015; Airin et al., 2023; Saini et al., 2025). Taip pat daugėja tyrimų, susijusių su grybais, stimuliuojančiais ekonomiškai svarbių augalų augimą, sąrašas, kuris šiuo metu apima *Aspergillus*, *Penicillium*, *Chaetomium*, *Rhizoctonia* ir *Fusarium* gentis (Adedayo & Babalola, 2023). Svarbu paminėti, jog endofitiniai grybai išskiria platų lakiųjų organinių junginių (LOJ) spektrą, kuris apima alkoholius, terpenus, alkanus ir kitas, biologiškai aktyvias medžiagas, pasižyminčias augalų augimą skatinančiu poveikiu (Farh & Jeon, 2020). Tačiau norint geriau suprasti, kokios grybų rūšys bei jų išskiriami lakieji organiniai junginiai (LOJ), specifiškai veikia skirtingus augalus, reikalingi išsamesni tyrimai, galintys padėti vystyti endofitinių grybų, kaip biotrášų kūrimą.

Šiame darbe siekiama ištirti *Epicoccum*, *Microdochium*, *Plectosphaerella*, *Cadophora*, *Cordyceps* ir *Chaetomium* gentims priklausančių endofitinių grybų LOJ poveikį ūkiniu požiūriu svarbių augalų – vasarinių miežių (*Hordeum vulgare* L.) bei raudonųjų dobilų (*Trifolium pratense* L.) – ūglių, šaknų, ir šakniaplaukių augimui. Siekiant geriau suprasti jų sąveika bei LOJ spektrą, analizei taikomas dujų chromatografijos ir masių spektrometrijos (GC-MS) metodas. Taip pat, siekiama išsiaiškinti kokį poveikį endofitinių grybų inokuliacija sporų suspensija daro vasarinių miežių ir paprastųjų alyvų (*Syringa vulgaris*) augimui.

Darbo tikslas:

Pasitelkiant vasarinius miežius (Poaceae) ir raudonuosius dobilus (Fabaceae) kaip modelinius augalus, įvertinti endofitinių grybų išskiriamų lakiųjų organinių junginių (LOJ) poveikį augalų augimui bei galimas sąsajas su jų produkuojamais antriniais metabolitais. Ištirti endofitinių grybų įtaką vasarinių miežių ir paprastųjų alyvų augimui, atlikus inokuliaciją grybų izoliatų sporų suspensijomis.

Darbo uždaviniai:

1. Įvertinti endofitinių grybų LOJ poveikį vasarinių miežių ir raudonųjų dobilų šaknų, šakniaplaukių bei ūglių augimui, taikant *in vitro* lėkštelė–lėkštelėje metodą.
2. Atlikti endofitinių grybų LOJ analizę, taikant dujų chromatografijos ir masių spektrometrijos (GC-MS) metodą, siekiant nustatyti jų išskiriamų LOJ spektrą.
3. Išbandyti endofitų sporų inokuliaciją ir įvertinti grybų poveikį vasarinių miežių bei paprastųjų alyvų augimui.

LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Grybų filogenezė ir evoliucija

Grybai yra didžiulė ir įvairi organizmų karalystė, užimanti daugelį ekologinių nišų ir apimanti saprotrofinių skaidytojų ir simbiونتų vaidmenis, tokiu būdu reikšmingai prisidedant prie svarbių ekosistemos funkcijų (Blackwell, 2011; Hawksworth & Lücking, 2017). Grybų karalystė yra antra pagal dydį po gyvūnų, ją sudaro daugiau nei 5 milijonai rūšių (Raja et al., 2017). Remiantis morfologiniais, fiziologiniais, biocheminiais ir standartinėmis brūkšinio kodo DNR sekomis, grybai skirstomi į kelis pagrindinius skyrius: Chytridiomycota, Mucoromycota, Ascomycota, Basidiomycota ir Glomeromycota (James et al., 2006; Spatafora et al., 2016; Naranjo-Ortiz & Gabaldón, 2019).

Chytridiomikotai (Chytridiomycota), arba chytridai yra vieninteliai grybai, kurie tam tikru savo gyvenimo ciklo etapu gamina judrias sporas (zoosporas). Chytridai randami ir dirvožemyje, ir gėlame vandenyje, daugelis jų veikia kaip saprotrofai, o kai kurie – kaip patogenai (James et al., 2006).

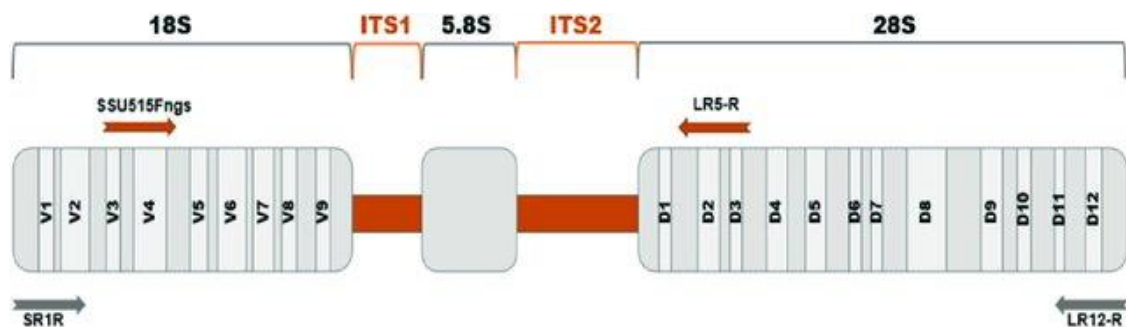
Mukoromicetai (Mucoromycota) skyriaus grybai yra aptinkami tik sausumoje. Nelytinio dauginimosi metu susidaro nejudrios sporos, vadinamos sporangiosporomis. Lytinės sporos susidaro, kai susijungia du morfologiškai panašūs priešingų poravimosi tipų gametangijai. Šie grybai yra saprofitai arba silpni patogenai, sukeliantys pelėsius po derliaus nuėmimo ir minkštuosius puvinius. Pavyzdžiui, kai kurios *Mucor* rūšys yra dirvožemio mikroorganizmai, kurie įsiskverbia į vaisius, nukritusius ant sodo žemės (Gould, 2009).

Aukšliagrybių (Ascomycota) skyrius yra pats įvairiausias ir turtingiausias grybų karalystėje, kurį sudaro apie 110 000 grybų rūšių, o paplitimas apima tiek sausumos, tiek jūrų ekosistemas (Wijayawardene et al., 2021). Kai kurie aukšliagrybūnai žinomi kaip gyvūnų ir žmogaus patogenai, o kiti pasižymi simbiونتiniu gyvenimo būdu. Šie grybai turi hifus, kurie perskiria ląsteles skersinėmis sienelėmis, vadinamomis pertvaromis. Lytinio dauginimosi metu gamina lytines sporas, vadinamas aksosporomis, susiformavusias į maišelius panašiose struktūrose, vadinamose aukšliu (asku), ir mažas nelytines sporas, vadinamas konidijomis. Taip pat aukšliagrybiai geba suformuoti struktūras, reikalingas parazituoti augalus ir gyvūnus, kurios vadinamos haustorijomis ir apresorijomis (McConnaughey, 2014).

Papėdgrybūnai (Basidiomycota) yra antras pagal dydį po aukšliagrybūnų skyrius, šiai dienai aprašyta daugiau nei 31 000 rūšių, paplitę po visą pasaulį. Lytinis dauginimasis vyksta per mejosporas. Basidiomycota skyrius grybai pasižymi įvairiu gyvenimo būdais, nuo gerai žinomų medieną pūdančių grybų, augalų augimą skatinančių ir mutualistinių mikorizinių, pasėlius naikinančių puvinis ir rūdis sukeliančių grybų iki į mieles panašių žmogaus ligų sukėlėjų (Coelho et al., 2017).

Glomeromicetai (Glomeromycota) sudaro simbiozės tipą, kai grybų hifai įsiskverbia į augalų šaknų ląsteles ir abi rūšys gauna naudos iš didesnio maisto medžiagų kiekio. Grybų simbiontas gauna angliavandenių iš augalo mainais už tai, kad jis veikia kaip išplėstinė šaknų sistema, taip smarkiai pagerindamas mineralinių medžiagų įsisavinimą augalų šaknyse. Glomeromycota dauginasi nelytiniu būdu, blastiškai vystantis hifų viršūnėlėmis, kad susidarytų palyginti didelės sporos su sluoksniuotomis sienelėmis, turinčios nuo kelių šimtų iki tūkstančių branduolių (McConnaughey, 2014).

Norint nustatyti endofitinių grybų rūšis reikia derinti tiek morfologinius, tiek molekulinis tyrimų metodus. Molekuliniai metodai, tokie kaip filogenetinė analizė bei DNR sekos nustatymas, yra svarbūs norint tiksliai identifikuoti grybus. Per pastaruosius 15 metų branduolinės rDNR vidinis transkribuojamas tarpiklis (ITS) buvo naudojamas kaip taikinytis analizuojant grybų įvairovę aplinkos mėginiuose ir buvo pasirinktas kaip standartinis grybų DNR brūkšninio kodavimo žymeklis (Bellemain et al., 2010). Vienas iš standartizuotų taksonomijos žymenų yra grybų ribosominis operonas (rDNR), kurio ilgis siekia apie 6000 bp. Jį sudaro trys konservatyvūs komponentai: 18S rRNR genas (mažojo subvieneto, SSU), 5.8S rRNR genas ir 28S rRNR genas (didžiojo subvieneto, LSU), taip pat du hiperkintamieji regionai – vidinės transkribuojamos tarpinės sritys (ITS1 ir ITS2) (1.1 pav.) (Schoch et al., 2012). Tačiau, kadangi ITS regionas daugelyje grybų grupių nevienodai skiriasi, rekomenduojama naudoti ir baltymus tokius kaip aktinas (ACT), transliacijos pailgėjimo faktorius 1 α (TEF-1 α), β -tubulinas ir kalmodulinas, koduojančių genus sekas. Pagal šias baltymus koduojančių genų sekas galima atskirti artimai giminingas rūšis, genetiškai skirtingas, bet labai panašias morfologiškai rūšis, taip pat nustatyti skirtingų tos pačios genties grybų rūšių filogenetinius ryšius (Martin & Rygielwicz, 2005).



1.1 pav. Grybų ribosominis operonas: dvi vidinių ITS1 ir ITS2 transkribuojamų tarpiklių sritys pažymėtos oranžine spalva ir trys konservatyvios 18S, 5.8S ir 28S rRNR genų sritys pažymėtos pilka spalva, jose išskirti kintamieji domenai, devyni (V1-V9) 18S genas ir dvylika (D1-D12) 28S genas. Viršutinėje operono dalyje pradmenų, naudojamų ITS srities amplifikacijai, vietos (3,5 Kb) rodomos oranžine spalva, o apatinėje dalyje – pilka spalva. Pagal Tedersoo et al., 2015.

Tobulėjant technologijoms, pvz. naujos kartos sekos nustatymo (NGS) technologijomis, tokiomis kaip „Illumina“ ir „Ion Torrent“, o vėliau ir trečios kartos platformos, tokios kaip „PacBio“ ir „Oxford Nanopore Technologies“ (ONT) galima pagerinti taksonominę klasifikaciją. Oksford Nanopore sekvenavimu, dabar galima nustatyti ilgesnių, iki 6 Kb ilgio, grybų ribosomų operono fragmentų (18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S) seką. Sparti molekulinės biologijos pažanga ir gebėjimas sekti viso ilgio 18S rRNR geną atskleidžia naujus filogenetinius ryšius grybų sistematikoje (Antil et al., 2023).

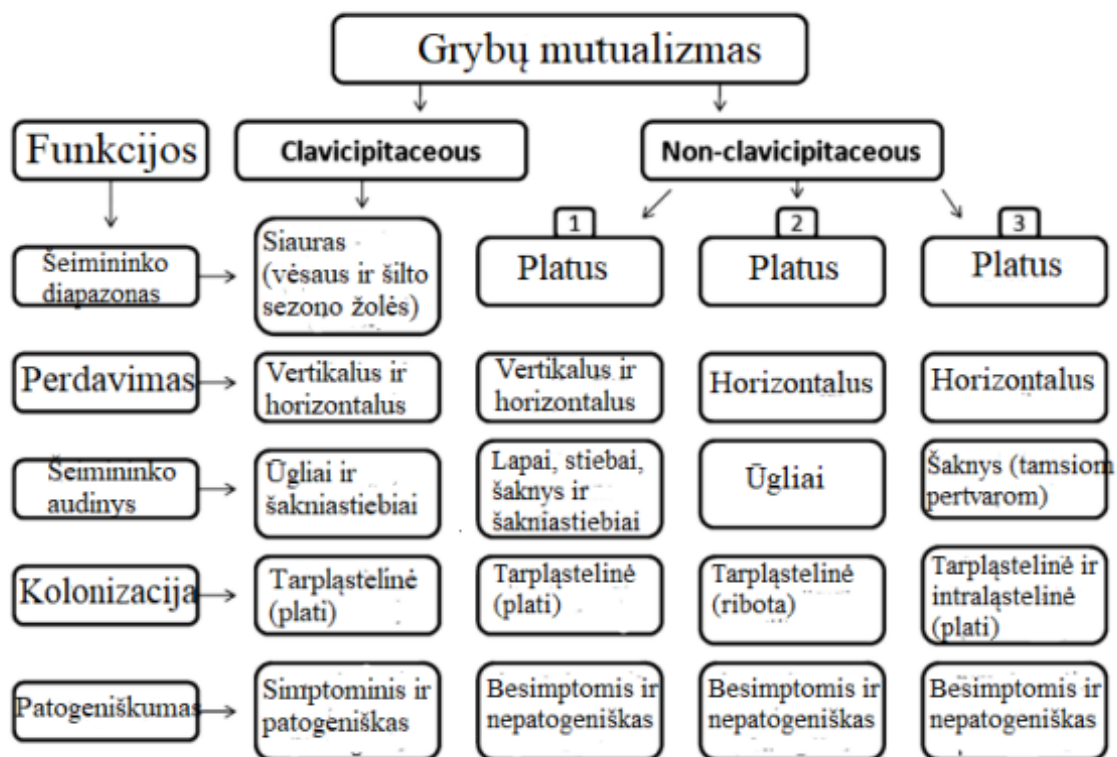
1.2 Endofitinių grybų klasifikacija

Endofitinių grybų klasifikavimas yra svarbus, norint suprasti jų unikalią ne tik ekologinę, bet ir simbiotinę endofitinių grybų funkciją bei pagrindinius biologinius veikimo principus. Endofito sėkmė kolonizuoti augalus priklauso nuo tokių kintamųjų kaip augalo genotipas, mikroorganizmo taksonas ir padermės tipas bei biotinių ir abiotinių aplinkos sąlygų (Carroll, 1988; Mueller et al., 2004).

Anksčiau endofitiniai grybai buvo skirstomi į dvi grupes pagal evoliuciją, taksoniją, ekologinę funkciją ir šeimininko specifiškumą (1.2 pav.):

1. Clavicipitaceae grybų endofitai (C– endofitai) dažniausiai paplitę žoliniuose augaluose.

2. Nonclavicipitaceae grybai (NC– endofitai) vyrauja sumedėjusiuose augaluose (Clay & Schardl, 2002).



1.2 pav. Endofitinių grybų klasifikacija sietina su šeimininkų rūšių tarpusavio sąveika skirtingose ekosistemose. Pagal Rodriguez et al., 2009.

Remiantis kolonizacijos charakteristikomis, Rodriguez ir kt. nuo 2009 m. pradėjo endofitinius grybus skirstyti į keturias grupes, kurios išskiriamos pagal šeimininko diapazoną, šeimininko audinius, augalų kolonizaciją, augalų biologinę įvairovę, perdavimo būdą bei tinkamumo šeimininkui naudą (1.1 lentelė) (Rodriguez et al., 2009).

1.1 lentelė. Endofitinių grybų klasifikacija. Pagal Rodriguez et al., 2009.

Kriterijai	Clavicipitaceae	Nonclavicipitaceae		
	Klasė 1	Klasė 2	Klasė 3	Klasė 4
Šeimininko diapazonas	siauras	platus	platus	platus
Kolonizuoti šeimininko audiniai	ūgliai ir šakniastiebiai	ūgliai, šaknys, šakniastiebiai	ūgliai	šaknys
Augalų kolonizacija	plati	plati	ribota	plati
Augalų biologinė įvairovė	žema	žema	aukšta	nežinoma
Perdavimo būdas	vertikalus ir horizontalus	vertikalus ir horizontalus	horizontalus	horizontalus
Tinkamumo nauda*	NHA	NHA ir HA	NHA	NHA

* Nepritaikytos buveinės (NHA- nonhabitat-adapted) pranašumai, tokie kaip atsparumas sausrui ir augimo skatinimas, yra dažnai sietini su endofitais, neatsižvelgiant į jų kilmės buveinę. Buveinei pritaikyta (HA-Habitat-adapted) nauda atsiranda dėl buveinei būdingų selektyvių veiksnių, tokių kaip pH, temperatūra ir druskingumas.

Clavicipitaceae endofitai yra filogenetiškai giminingi ir daugiausiai dauginasi vidutinio ir šiltojo klimato žoliniuose augaluose. Įprastai šios klasės endofitai aptinkami ūgliuose, kuriuose sukelia sistemine tarpląstelinę infekciją (Clay & Schardl, 2002). Patogenai, kurie išskiria efektorinius baltymus, susilpnina augalo imuninį atsaką ir tokiu būdu gali kolonizuoti augalą – šeimininką. Šios klasės endofitai dažniausiai yra perduodami vertikaliu būdu, kuomet motininiai augalai perduoda endofitinius grybus savo palikuonims per sėklas. C klasės endofitai pasižymi savo gebėjimu padidinti augalų biomasę, apsaugo nuo biotinio ir abiotinio streso, tačiau ši nauda priklauso nuo šeimininko rūšies, genotipo ir aplinkos sąlygų (Clay, 1988; Faeth & Sullivan, 2003; Faeth et al., 2006). Clay ir Schardl (2002) suskirstė Clavicipitaceae į dar tris tipus. Šie trys tipai skiriasi savo sąveika su augalais – šeimininkais, kuri svyruoja nuo patogeninės iki simbiotinės bei nuo simptominės ir besimptomės. Daugiausiai dėmesio sulaukė III tipas Clavicipitaceae endofitai, nes jie kolonizuoja vidinius augalo audinius, nesukeldami jokių neigiamų simptomų.

Nonclavicipitaceae endofitai yra labai įvairi, polifiletinė organizmų grupė, kuri atsirado dėl supanašėjimo iš dviejų ar daugiau skirtingų protėvinių grupių. Šios klasės endofitai įprastai yra aukšliagybiai, o jų vaidmuo labai įvairus ir dar nėra gerai ištirtas. Žinoma, kad jie kolonizuoja beveik visus sausumos augalus ir įvairias ekosistemas, nuo atogrąžų iki tundros. NC endofitai buvo

susikirstyti į tris pagrindines klases pagal kolonizacijos, perdavimo būdus bei ekologines funkcijas. 2 klasės endofitai, kurie yra plačiausiai ištirti, gali augti tiek antžeminėje, tiek požeminėje augalo dalyje. Dėl stresinių sąlygų, tokių kaip temperatūra, druskingumas ir pH, 2 klasės endofitai geba pagerinti augalų prisitaikomumą prie nepalankios aplinkos. Šios klasės endofitai yra perduodami vertikaliu būdu per sėklas, sėklų luobelias ar šakniastiebius, o taip pat ir horizontaliu būdu iš aplinkos. 3 klasės endofitai apsiriboja tik antžeminiais audiniais, o augalų – šeimininkų bei audinių įvairovė gali būti labai didelė. Pavyzdžiui, tropinio tikrojo kakavmedžio (*Theobroma cacao*, Malvaceae) lapuose galima aptikti virš 20 tokių endofitų rūšių (Arnold et al., 2003). 4 klasės endofitai aptinkami požeminėse augalo dalyse, o jų įvairovė atskiruose augaluose nėra pakankamai įvertinta (Arnold, 2007a; Vasiliauskas et al., 2007; Selosse et al., 2008; Rodriguez et al., 2008).

1.3 Endofitinių grybų tyrimo istorija

Apie grybų ir augalų sąveiką buvo žinoma jau nuo pat 19 a. pabaigos, o žvelgiant į evoliucinę skalę, augalų ir endofitinių grybų tarpusavio ryšiai egzistuoja jau maždaug 450 milijonų metų. Nors endofitinių grybų fosiliniai duomenys nėra gausūs, dėl jų mikroskopinio dydžio, tačiau tokie įrodymai kaip sausumos augaluose paplitusios mutualistinės simbiozės, byloja apie endofitinių ryšių egzistavimą. Pastarojo šimtmeščio tyrimai atskleidė, kad dauguma natūraliose ekosistemose esančių augalų yra simbiozėje su mikorizininiais ir (arba) grybų endofitais. Ilgainiui endofitiniai grybai prisitaikė ir sukūrė biosintezės kelius, medžiagų apykaitos mechanizmus, kurie yra naudingi tiek endofitams, tiek augalams – šeimininkams (Petrini, 1991; M. A. Selosse & Le Tacon, 1998; Field et al., 2015).

Terminas „endofitas“ buvo pasiūlytas žymaus to meto vokiečių chirurgo, mikrobiologo, mikologo, botaniko, Johann Heinrich de Bary 1866 m. Jis aptiko nepatogeninius mikroorganizmus mikroskopiškai tiriant nelabą svidrę (*Lolium temulentum*). De Bary apibūdino endofitus kaip bet kokius mikroorganizmus (iš graikų kalbos „endon“ – viduje, „fiton“ – augalas), kurie kolonizuoja vidinius augalo audinius. Iki šių dienų De Bary yra laikomas augalų fitopatologijos pradininku, padėjusiu pagrindus augalų ir mikroorganizmų tyrimų svarbai (Petrini, 1991; Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006).

Pirmieji įrašai apie grybus Lietuvoje buvo pateikti 1781 m. viename iš reikšmingiausių botanikos veikalų „Flora lithuanica inchoata“, kurį parašė Žanas Emanuelis Žiliberas (Gilibert, 1782). Vėliau tyrimus mikologijos srityje tęsė Lietuvos gamtininkas S.B. Jundzilas ir botanikas floristas J. Jundzilas

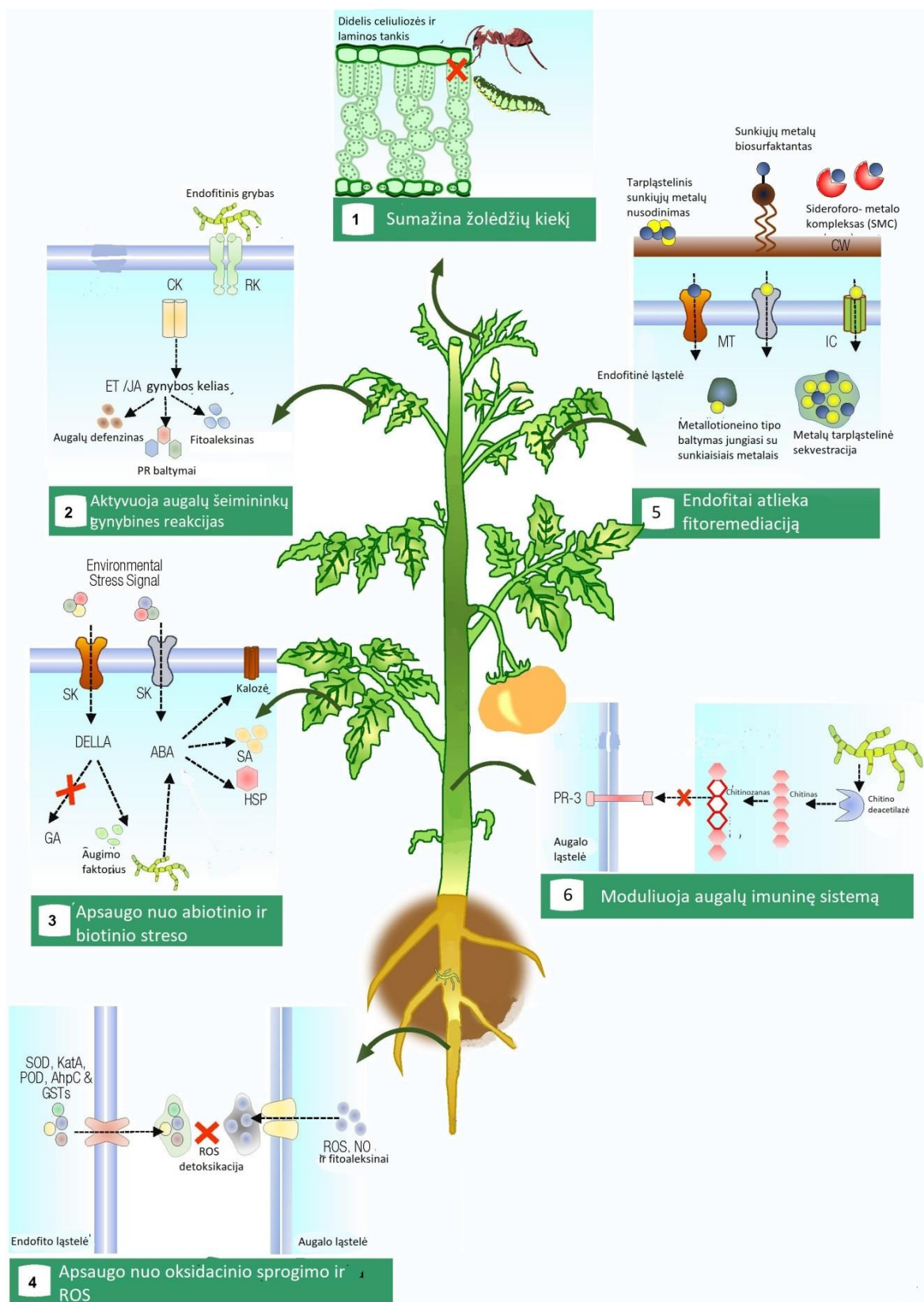
(Jundziū, 1830). Fitopatologijos pradininkas Lietuvoje A. Minkevičius aprašė parazitinius grybus, aptiktus Kauno apskrityje. Publikacijoje pateiktos trys grybų rūšys, priskiriamos *Capnodiales*, *Hypocreales* ir *Phyllachorales* eilėms (Minkevičius, 1927). Iškylus XX a. mokslininkas K. Brundza 1930 m. išleido aprašomojo pobūdžio publikaciją, kurioje nurodė Kauno Žemės ūkio akademijos teritorijos grybų morfologiją, biologiją ir substratą, tarp kurių buvo minimi žolinių augalų lapai ir stiebai, sumedėję augalų lapai, pūvančios bei nudžiūvusios šakos. Pastaraisiais metais endofitinių grybų tyrimai Lietuvoje yra aliekami: Gamtos tyrimų centre, Vilniaus universitete, Vytauto Didžiojo universitete, Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centre.

Pastarųjų dviejų dešimtmečių tyrimai atskleidė, kad endofitiniai grybai, turi didžiulį potencialą įvairiose srityse, ypač žemės ūkyje, dėl savo gebėjimo produkuoti antrinius metabolitus, kurie pasižymi specifiniu biologiniu aktyvumu (Chagas et al., 2017).

1.4 Endofitų grybų biologinis vaidmuo

Endofitiniai grybai kolonizuoja vidinius augalo audinius arba tarpląstelines erdves, ypač lapus bei šaknis. Tyrimai su įvairiais žemės ūkio augalais rodo platų endofitinių grybų paplitimą ir jų svarbą augalams – šeimininkams. Endofitiniai grybai, turi didžiulį potencialą produkuojant biologiškai aktyvius lakiuosius organinius junginius (LOJ) (Kaddes et al., 2019). Taip pat endofitiniai grybai yra plačiai tiriama dėl savo gebėjimo pakeisti lapų chemines ir fizikines savybes tokias, kaip celiuliozės kiekį ir laminos tankį. Tai suteikia lapams tvirtumo, tokiu būdu augalas tampa sunkiau prieinamas žolėdžiams, ypač lapus pažeidžiančioms skruzdėlėms (1.3 pav.) (Van Bael et al., 2012; Estrada et al., 2013). Endofitai skatina augalo – šeimininko gynybinį atsaką prieš ligų sukėlėjus – fitopatogenus. Paviršiaus bei citoplazminėmis receptorių kinazėmis atpažinus fitopatogenus, paleidžiami etileno ir jazmono rūgšties signaliniai keliai. Šie augalų hormonai atlieka svarbų vaidmenį reguliuojant augalo augimą ir su stresu susijusias reakcijas (Wasternack & Hause, 2013; Campos et al., 2014). Endofitiniai grybai suteikia atsparumą nuo abiotinio ir biotinio streso, keičiant genų raišką. Yra tyrimų, kurie rodo, jog endofitiniai grybai skatina su sausra susijusių genų raišką, todėl augalas gali geriau toleruoti sausrą (Li et al., 2019; Koza et al., 2022). Endofitiniai grybai mažina abscizo rūgšties (ABA), kuri slopina sisteminį įgytą atsparumą, kiekį (Abdelaziz et al., 2019). Augalų arba endofitų sintetinamas hormonas – giberelinas skatina augimą, neutralizuojant DELLA baltymus, kurie slopina augimo signalus (Waqas et al., 2012). Taip pat, endofitiniai grybai geba neutralizuoti reaktyvias deguonies formas (ROS), susidaranti augale, gaminant tokius fermentus kaip superoksido dismutazės (SOD), katalazės

(CatA), peroksidazės (POD), alkilo hidroperoksidų reduktazės (AhpC) ir glutationo-S-transferazės (GST) (Nogueira-Lopez et al., 2018). Grybų endofitai geba keisti augalų imuninę sistemą gamindami chitino deacetilazes, kuomet deacetilinami chitozano oligomerai, todėl augalų receptoriai (PR-3), atpažįstantys chitino oligomeras, negeba jų atpažinti (Sánchez-Vallet et al., 2015). Endofitai mažina metalų fitotoksiškumą kaupdami juos savo ląstelėse, surišdami juos metalo kompleksonais, paverčiant mažiau kenksmingomis formomis bei paverčiant toksiškus metalus į netirpias formas, šie mechanizmai leidžia augalams geriau toleruoti metalų toksines savybes (Aly et al., 2011).



1.3 pav. Endofitinių grybų sąveika su augalais – šeiminkais. Pagal Khare et al., 2018.

1.5 Endofitinių grybų lakieji organiniai junginiai (LOJ) ir jų funkcijos

Endofitiniai grybai gali gaminti įvairius lakiuosius organinius junginius (LOJ), pasižyminčius įvairiu biologiniu aktyvumu, pavyzdžiui, skatinančius augalo – šeimininko augimą, pasižyminčius priešgrybeliniu, antioksidaciniu ir priešvėžiniu poveikiu. LOJ yra plačiai naudojami žemės ūkyje ir pramonėje (Kanchiswamy et al., 2015). Taip pat endofitinių grybų išskiriami LOJ pasižymi stipriu fungicidiniu ir antimikrobinu poveikiu, kuris yra pagrindinis kovojant su patogenais (Mari et al., 2016).

Endofitiniai grybai katabolizmo ir anabolizmo medžiagų apykaitos procesų metu pasisavina įvairias maistines medžiagas, o kaip šalutinis produktas yra išskiriamos lakiosios organinės medžiagos (Lemfack et al., 2018). LOJ yra hidrofobiniai organiniai molekuliniai junginiai, kurie esant įprastai temperatūrai (20–25 °C) ir slėgiui (101,3 kPa) išgaruoja į dujinę fazę. Jų molekulinė masė yra maža (< 300 Da), o garų slėgis didelis ($\geq 0,01$ kPa esant 20 °C temperatūrai). LOJ dėl savo fizikinių savybių yra lengvai pernešami ore, vandenyje, dirvožemyje, augaluose, gyvūnuose. Daugėja tyrimų, rodančių, kad grybeliniai LOJ tarpininkauja ir turi įtakos organizmų sąveikoms kaip signalinės molekulės skirtingose ekologinėse nišose (Effmert et al., 2012; Hung et al., 2015). Endofitinių grybų LOJ gali sąveikauti su augalais – šeiminkais, sukuriant LOJ molekulinį mišinį. Šis mišinys sudaro „sakinius“, leidžiančius augalams perduoti sudėtingus signalus ir taip sąveikauti su aplinka. Pagrindinės funkcijos, kurias gali atlikti augalų ar grybų išskiriami LOJ, yra gynyba nuo žolėdžių ir patogenų, ryšys tarp skirtingų augalo organų arba su kitais augalais ir naudingų organizmų (pavyzdžiui, apdulkintojų, sėklų platintojų ir mikroorganizmų) pritraukimas (Delory et al., 2016; Farré-Armengol et al., 2016; Kaddes et al., 2016).

Šiuo metu LOJ atskiriami ir identifikuojami pasitelkiant dujų chromatografiją (GC) kartu su masių spektrometrija (GC-MS) (Inamdar et al., 2020). Pavyzdžiui, naudojant kietosios fazės mikroekstrakciją – dujų chromatografijos/masių spektrometrija (SPME – GC/MS) nustatyta, kad daugiametis žolinis augalas *Chrysocephalum apiculatum* gamina 15 lakiųjų organinių junginių (LOJ), daugiausia priskiriamų terpenams, benzenui ir benzeno dariniams ir alkoholiams (Song et al., 2019). Šiuo metu jau yra žinoma maždaug 250 skirtingų grybų išskiriamų lakiųjų organinių junginių, tarp kurių vyrauja rūgštys, alkoholiai, aldehidai, aromatinės medžiagos, esteriai, heterocikliniai junginiai, ketonai ir tioliai. Šiuos LOJ galima suskirstyti į penkias rūšis: terpenoidus, riebalų rūgščių darinius, benzeno junginius, acetoną ir aminorūgščių darinius. Jų biosintezė labai priklauso nuo anglies, azoto,

sieros ir pirminio metabolizmo gaunamos energijos. Yra žinoma, kad šiuose biosintezės keliuose dalyvauja keturi pirmtakai –fosfoenolpiruvatas (PEP), eritrozo-4-fosfatas (E4P), piruvato rūgštis ir acetil kofermentas A (acetil-coA). LOJ susidaro skirtingais anaboliniais keliais, daugiausia manganato/fenilalanino, mevalonato (MVA), metileritolio fosfato (MEP) ir lipoksigenazės (LOX) keliais, kuriuose vyksta skirtingos fermentinės reakcijos, kurių metu susidaro skirtingų tipų LOJ. Nustatyta daugiau kaip 500 LOJ gaminančių mikroorganizmų, o kiekvienos grybų rūšies LOJ skiriasi priklausomai nuo nuo augimo sąlygų (temperatūros, deguonies prieinamumo, pH), anglies šaltinio prieinamumo ir kultūros amžiaus. Galiausiai LOJ sudėtis yra konkretaus mikroorganizmo specifinės metabolinės veiklos pasekmė (Kai et al., 2007; Lemfack et al., 2018).

1.6 Endofitų ir augalų molekulinė sąveika

Tam, kad endofitas sėkmingai kolonizuotų augalą, reikalinga suderinta jų sąveika. Endofitui patekus į augalą – šeiminką, augalas jį atpažįsta, prasideda signalinių molekulių tarpusavio ryšys. Įvairūs tyrimai atskleidžia, kad endofitų chemotaksinis atsakas vyksta per augalo – šeiminko šaknų eksudatus, kuriuose gausu maistinių medžiagų bei biomolekulių, kurios padeda pritraukti ir atpažinti mikroorganizmus, įskaitant endofitus (Brader et al., 2014). Flavonoidai yra vienas iš tokių metabolitų, kuriuos išskiria augalai ir kurie priskiriami chemoatraktantams, atliekantiems svarbų vaidmenį endofitams sąveikaujant su šakniaplaukiais (Arora & Mishra, 2016). Lipochitooligosacharidai (LCO), dar vadinami Nod faktoriais, yra gerai žinomos signalinės molekulės, aktyvuojančios bendrąjį simbiozės kelią (BSP) rizobijų ir ankštinių augalų bei arbuskulinių mikorizų asociacijose (Gough & Cullimore, 2011). Nustatyta, kad baltažiedžio vairenio (*Arabidopsis thaliana*) šaknų išskiriamas strigolaktonas taip pat veikia kaip signalinė molekulė, pritraukiant endofitinius *Mucor* sp. grybus. Strigolaktonas taip pat gali suaktyvinti trumposios grandinės chitino oligomerų sintezę ir išsiskyrimą, o tai gali stimuliuoti simbiotinį signalinį kelią augale (López-Ráez et al., 2017; Rozpądek et al., 2018). Tyrimai taip pat rodo arabinogalaktano baltymų (AGP), kurie yra labai glikozilinti augalų ląstelės sienelės baltymų hidroksiprolino turtingų glikoproteinų (HRGP) superšeimos nariai, vaidmenį nustatant augalo sąveiką su mikroorganizmu (įskaitant endofitus) keliuose etapuose. Šie baltymai atlieka neabejotiną vaidmenį šaknų kolonizacijoje, veikdami kaip repelentai arba atraktantai mikroorganizmams (Nguema-Ona et al., 2013). Šiuo metu žinoma, kad augalų šaknys išskiria keletą kitų šaknų eksudatų, įskaitant įvairius cukrus, aminorūgštis, organines rūgštis, fenolinius junginius ir kitus antrinius metabolitus, kurie selektyviai pritraukia mutualistinius mikroorganizmus, įskaitant endofitus (Chagas et al., 2017).

1.7 Endofitų molekulinis indentifikavimas

Mikologai tradiciškai naudojo morfologiją (fenotipinius požymius), pvz., sporas gaminančias struktūras, susidariusias dėl nelytinio (mitozės) arba lytinio (mejozės) dauginimosi, kaip vienintelę priemonę grybų rūšims identifikuoti, kuri iki šių dienų vis dar naudojama kaip papildoma grybų rūšių identifikavimo priemonė. Morfologijos naudojimas grybų rūšių identifikavimui yra labai svarbus norint suprasti morfologinių požymių raidą, tačiau morfologiniai grybų sistematikos metodai, nors ir reguliariai naudojami grybų taksonomijos tyrimuose, siekiant klasifikuoti grybus eilės ar šeimos lygmeniu, ne visada gali būti tinkami žemesnio lygio (rūšių) klasifikacijai (Hyde et al., 2011; Tedersoo et al., 2015; Raja et al., 2017).

Norint tiksliai identifikuoti ir klasifikuoti endofitius grybus įvairiais hierarchiniais ir taksonominiais lygmenimis, rekomenduojama atlikti molekulinį identifikavimą. Šis identifikavimo būdas priklauso nuo analizuojamos mikroorganizmo DNR sekos, kuri amplifikuojama naudojant specifinius genetinius žymenis (Azuddin et al., 2023). rDNR regionuos esančių vidinių transkribuojamų genų tarpiklių (ITS) sekų analizė yra dažniausiai naudojama nuo tada, kai buvo sukurti pirmieji universalūs pradmenys, atskiriant grybų gentis ir rūšis, dėl tokių pranašumų kaip lengva amplifikacija taikant PGR, plataus naudojimo. (Schoch et al., 2012). Tačiau norint atlikti tikslesnį nustatymą, esant mažesnei tarprūšinei variacijai, naudojami ir kiti papildomi genetiniai žymenys, tokie kaip ištisinės 18S ir 28S genų sekos (Dizkirici & Kalmer İpek, 2019).

Dauguma filogenetinių tyrimų, kuriuose siekiama identifikuoti endofitinius grybus, remiasi branduolio rRNR genų vidiniu transkribuojamu tarpikliu (ITS) (Schoch et al., 2012). ITS brūkšninio kodo sekos yra standartizuotos ir trumpos DNR sekos, grybų karalystėje nuo 450 iki 800 bp. ITS sudaro du kintamieji tarpikliai - ITS1 ir ITS2 - ir tarpinis, labai konservatyvus 5,8S ribosominis genas (Tedersoo et al., 2015). Grybų sekos skiriasi rūšies lygiu, todėl juos galima identifikuoti greitai ir tiksliai. Tačiau, kadangi ITS regionas rodo nevienodą kintamumą daugelyje grybų grupių, rekomenduojama papildomai naudoti baltymus koduojančius genus. Nors ITS regionas yra laikomas standartiniu, naudojami ir kiti rRNR regionai tokie, kaip LSU (28S branduolinio ribosominio didžiojo subvieneto rRNR) genas. Tuo tarpu SSU (18S branduolio ribosomų mažojo subvieneto rRNR) regionas vystosi lėtai, palyginti su ITS ir LSU, todėl tiriamų taksonų skirtumai yra mažesni (Schoch et al., 2012).

Genai koduojantys aktiną (*ACT*), pasižymi lėtu evoliuciniu greičiu, todėl dažnai naudojami identifikavimui bei taksonominiams tyrimams. Beta-tubulino genai koduoja polipeptidinius baltymus ir yra naudojami grybų filogenetinei analizei atlikti nuo karalystės iki rūšies lygmens. Keturi beta tubulino genai randami visuose grybuose: du α -tubulino (*tubA*) ir du β -tubulino (*tubB*) genai. *TubA* yra atsakingas už dviejų alfa tubulino polipeptidų (alfa 1 ir alfa 2) gamybą, o *tubB* gamina vieną alfa polipeptidą (alfa 2). Beta tubulino genų sekos turi 3,5 karto daugiau filogenetinės informacijos nei mažojo subvieneto (SSU) rRNR genas (Das et al., 2014; Visagie et al., 2014; Raja et al., 2017). Kalmodulinas (CaM) yra mažas, rūgštinis, labai konservatyvus tiek funkciniu, tiek struktūriniu požiūriu baltymas, esantis visose eukariotinėse ląstelėse (Simão & Gomes, 2001; de Carvalho et al., 2003). Pagrindinė jo funkcija yra veikti kaip tarpląstelinis Ca^{2+} receptorių, kuris skatina proliferaciją, judrumą ir ląstelių ciklo eigą. Ca^{2+} -CaM kompleksai veikia kontroliuodami daugelio viduląstelių baltymų, tokių kaip fosfodiesterazė, Ca^{2+} -ATPazė, serino baltymų kinazės ir baltymų fosfatazės, aktyvumą. Jis taip pat veikia keletą medžiagų apykaitos kelių ir genų raiškos reguliavimą daugelyje eukariotinių organizmų, įskaitant grybus (de Carvalho et al., 2003). RNR polimerazės II genas (*RPB2*) koduoja antrą pagal dydį eukariotų baltymo subvienetą ir yra atsakingas už baltymus koduojančių genų transkripciją į pre-mRNR transkriptus. Todėl *RPB1* (koduojantis didžiausią RNR polimerazės II subvienetą) ir kintamoji sritis tarp konservatyvių 6 ir 7 *RPB2* domenų (koduojančių antrą pagal dydį RNR polimerazės II subvienetą) gali būti naudingos filogenetiniams tyrimams, nagrinėjant grybus žemesniuose taksoniniuose lygmenyse (Malkus et al., 2006; Větrovský et al., 2016; Gerber et al., 2020). Pastaruoju metu mini chromosomų palaikymo baltymas (MCM7) pasirodė esąs perspektyvus kaip naujas žymuo, leidžiantis nustatyti tiek aukštesnio, tiek žemesnio lygmens filogenetinius ryšius. Įrodyta, kad *MCM7* regionas yra pranašesnis genas filogenetikai, palyginti su daugeliu įprastai naudojamų baltymus koduojančių žymenų. Jis taip pat gerai veikia, kai naudojamas kartu su *LSU* genu, ypač aukšliagybių skyriaus grybams (Gillot et al., 2015; Hustad & Miller, 2015).

Naudojant DNR sekos nustatymo metodą, atliekama tiriamos sekos bioinformatinė analizė – palyginimas su sekomis, esančiomis duomenų bazėse (pvz., Tarptautiniu nukleotidų sekų duomenų bazių konsorciūmas - NCBI), taip pagal sekų atitikimą nustatoma rūšis. Filogenetinės analizės būdas remiasi sekų palyginimu su homologiškoms sekoms ir tiriamos sekos įtraukimu į filogenetinį medį.

Oligonukleotidiniai pradmenys, skirti pirminių brūkšninio kodo sričių PGR amplifikacijai, turėtų pasižymėti specifiškumu ir gebėti amplifikuoti reikiamą sekos ilgį tolimesniai analizei. Sekos turi pasižymėti unikalumu bei būti stabilios rūšyse (Schoch et al., 2012). Pirmieji PGR pradmenys, plačiai

pripažinti dirbant su grybų vidinėmis transkripcijos sekomis (ITS), buvo „ITS1“ ir „ITS4“, kurie amplifikuoja labai kintamas ITS1 ir ITS2 sekas, supančias 5.8S koduojančią seką ir esančias tarp ribosominio operono mažojo subvieneto koduojančios sekos (SSU) ir didžiojo subvieneto koduojančios sekos (LSU). ITS1, ITS2 ir ITS4 amplifikavimas gamina 400–800 bp amplikonus, kurie yra tinkami tolimesnei analizei (Gardes & Bruns, 1993; Martin & Rygiewicz, 2005). Tam, kad būtų išvengta gyvūnų ir (arba) augalų DNR koamplifikacijos buvo sukurti kiti pradmenys SR6R ir LR1 (Vilgalys & Hester, 1990), V9D, V9G ir LS266 (Gerrits van den Ende & Hoog, 1999) bei ITS1F (Gardes & Bruns, 1993), kuriuos galima naudoti amplifikacijai. Antriniai brūkšninio kodo sričių pradmenys turėtų gebėti ne tik amplifikuoti patikimą regioną, bet ir būti universalūs tam, kad esant nepakankamai tiksliais pirminio brūkšninio kodo regiono skirtumams pavyktų nustatyti tikslią grybų rūšį (Tedersoo et al., 2015, 2022)

1.8. Endofitiniai grybai

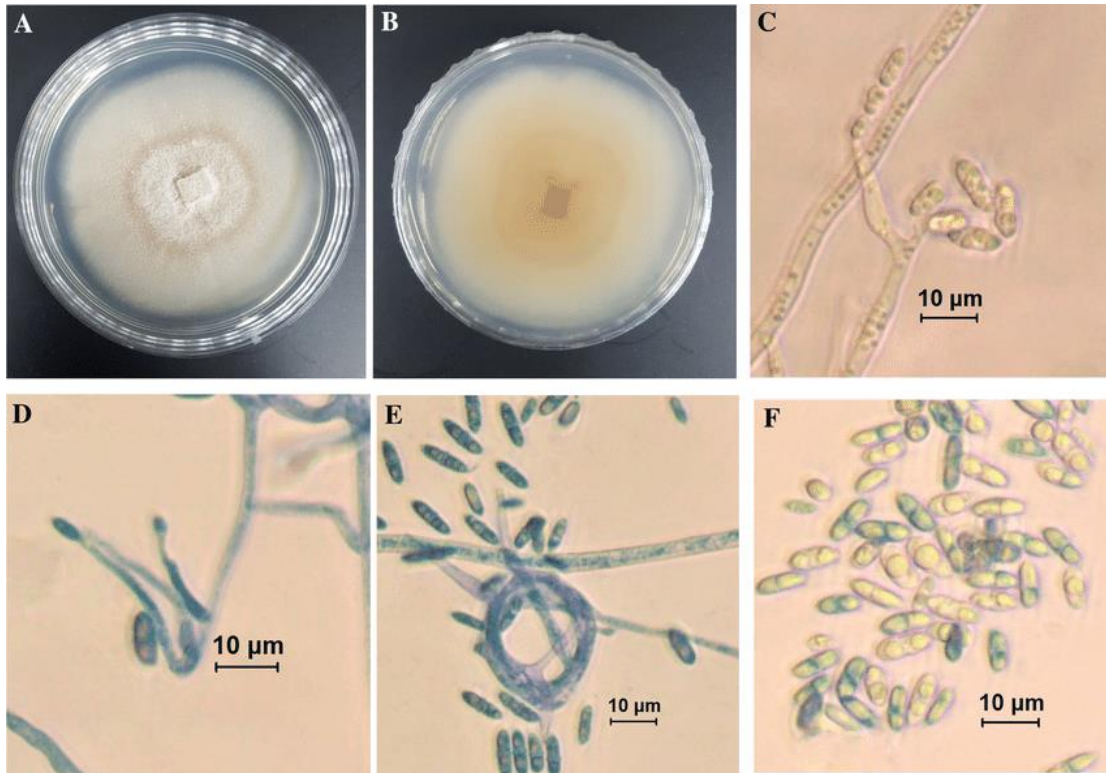
Šioje dalyje detaliau apibūdinsiu mūsų naudojamas endofitinių grybų rūšis, kurios mūsų tyrimuose buvo aptiktos žolinių augalų šaknyse.

1.8.1 *Plectosphaerella cucumerina*

Plectosphaerella cucumerina priklauso Hypocreales eilei, Ascomycota skyriui. Šis endofitas yra gerai žinomas kaip nekrotrofinis patogenas, sukeliantis vaisių, ypač melionų (*Cucumis melo*) ir šaknų puvinius ir pasėlių ligas visame pasaulyje (Carlucci et al., 2012). *Plectosphaerella* pirmą kartą aprašė Klebahn (1929), *Plectosphaerella cucumerina* endofitas buvo išskirtas iš ankstyvųjų agurkų Vokietijoje (Klebahn, 1929). Vėliau buvo išskirtas daugiausiai iš melionų ir arbūzų, taip pat iš kitų augalų tokių, kaip pomidorų, paprikų, šparagų ir petražolių (Carlucci et al., 2012).

Endofitas ant PDA terpės formuoja šviesiai rožinės spalvos, gleivingas, plokščias kolonijas. Hifai šakoti, pertvariniai, jų plotis siekia 3–4 µm, su daugybe anastomozių (susijungimų), formuojančių hifų spiralę. Konidioforai pavieniai, nešakoti arba retai netaisiklingai išsišakoję, plonasieniai, skaidrūs, lygūs. Konidiogeninė ląstelė determinuota, atskira, su viena bazine pertvara, lygi, pavienė, susidariusi ant hifinių spiralių, palaipsniui smailėjanti iki viršūnės, kartais kreiva, plačiausia prie pagrindo, pastebimas sustorėjimas, cilindro formos 1,5–2 µm. Hialininės, plonasienės, lygios konidijos, susitelkusios gleivingose arba kartais glutuliuotose (medžiaga iš aminorūgščių glicino, cisteino ir

glutamo rūgšties) galvutėse (slimy heads) yra elipsoido formos, siaurėjančios į galus. Chlamidosporų – storasienių hifinių ląstelių – *P. cucumerina* neturi (1.4 pav.) (Carlucci et al., 2012).



1.4 pav. *Plectosphaerella cucumerina* kolonijos vaizdas ant ant bulvių dekstrozės agaro (PDA) terpės (**A-B**) ir kolonijų micelio citomorfologija (**C-F**). **A.** kolonijos viršutinė pusė; **B.** kolonijos apatinė pusė; **C., D.** konidijakotis ir fialidė; **E.** hifinė spiralė ir konidijos; **F.** konidijos, skalė 10 µm. Pagal Hassan & Chang, 2022.

P. cucumerina yra pūvinio sukelėjas, sukeliantis didelius moliūgų ir cukinijų derliaus nuostolius. Ši rūšis yra plačiai paplitusi ir priskiriamas polifaginiams (gali maitintis įvairių rūšių maistu) grybams, dažnai išskiriamas iš kelių skirtingų augalų – šeimininkų (Palm et al., 1995; Carlucci et al., 2012). *P. cucumerina* geba kolonizuoti ir baltažiedžio vairo (Arabidopsis thaliana) lapus (Muñoz-Barrios et al., 2020).

1.8.2. *Cadophora fastigiata*

Cadophora gentis pirmą kartą buvo aprašyta 1927 m., o *Cadophora fastigiata* pateikta ir aprašyta kaip pagrindinė rūšis, priskiriama TSE, tamsiaspalviams septuotiems endofitiniams grybams (angl. DSE, Dark septate endophyte) (Lagerberg et al., 1928). *Cadophora* priklauso, Helotiales eilei, Ascomycota skyriui (Jumpponen & Trappe, 1998; Arnold, 2007a). *Cadophora* rūšims būdingi keli

maistinių medžiagų įsisavinimo būdai. Įprastai *Cadophora* genčiai priklausančios rūšys yra priskiriamos augalų patogenams, kurie kolonizuoja augalų šaknis, medieną arba dirvožemį. Pasaulinis dominuojančių įvairių biomų dirvožemio grybų bendrijų tyrimas parodė, kad *Cadophora* yra vienas iš labiausiai paplitusių dirvožemio grybų, turinčių didelį skaičių genų, susijusių su atsparumu stresui ir maistinių medžiagų įsisavinimu (Egidi et al., 2019). Atšiauriuose Arkties ir Antarktidos vietovėse *Cadophora* rūšys buvo dažnai išskiriamos iš dirvožemio, jūros nuosėdų ir organizmų, gėlo vandens ežerų, ypač istorinių medinių namelių ir kai kurių mumifikuotų ar panardintų dreifuojančių medžių (Gonçalves et al., 2012; Furbino et al., 2014; Nagano et al., 2017; Walsh et al., 2018). Manoma, kad jie yra vieni iš pagrindinių mikroorganizmų, galinčių inicijuoti maistinių medžiagų ciklus ir energijos srautus iš negyvų organinių medžiagų (Blanchette et al., 2016). Tuo tarpu saprotrofinės rūšys, daugiausia *Cadophora malorum*, *Cadophora luteo-olivacea* ir *Cadophora fastigiata*, kurios buvo išskirtos poliariniuose regionuose, taip pat aptinkamos kaip įvairių augalų patogenai ar endofitai visame pasaulyje (Gramaje et al., 2011; Travadon et al., 2015; Navarrete et al., 2011). *Cadophora* sp. būdingi melanizuoti hifai ir mikroskleročių formavimas bei rudo atspalvio micelis (Knapp et al., 2018).

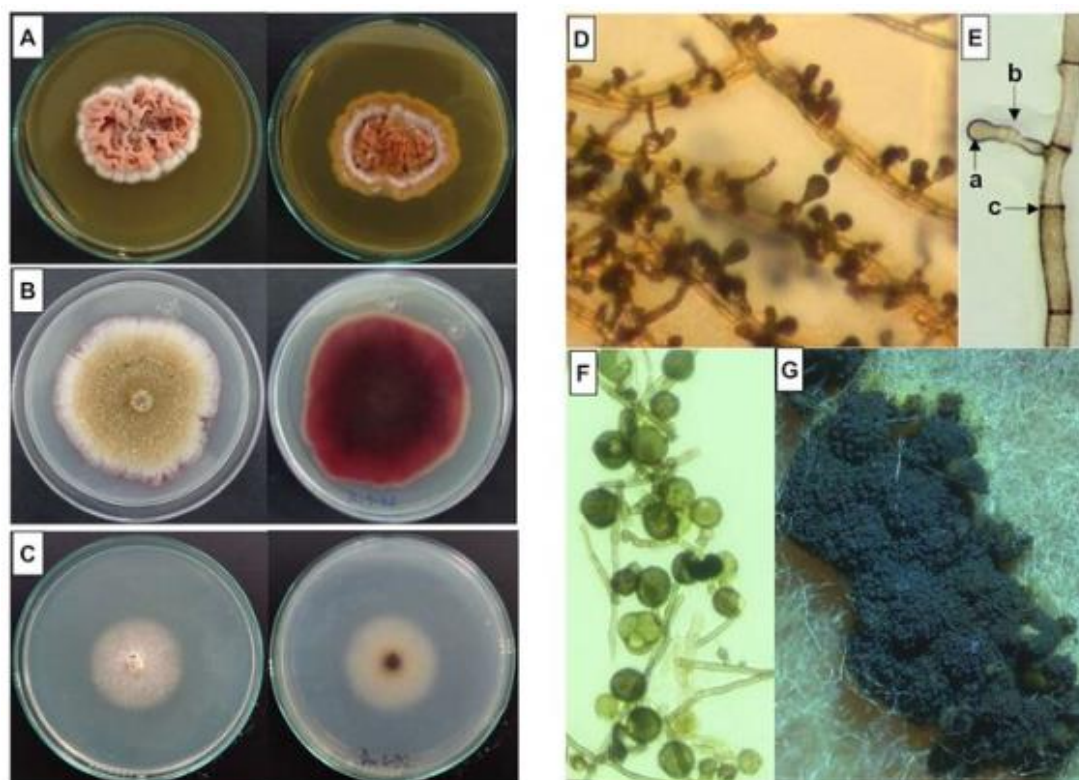
Atliekant lakiųjų metabolitų analizę nustatyta, kad *C. fastigiata* išskiria seskviterpenus, tokius kaip kariofileną bei esterius, pavyzdžiui, metilo benzoatą, junginį, kuris pasižymi insekticidinėmis savybėmis (Sunesson et al., 1995; Mostafiz et al., 2018)

1.8.3 *Epicoccum nigrum*

Epicoccum gentis priklauso Pleosporales eilei, Ascomycota skyriui. *Epicoccum nigrum* yra saprofitinis ir endofitinis grybas, aptinkamas visame pasaulyje, o jo genomą sudaro 34,7 Mbp (Fokin et al., 2017). Daugiausiai aprašytas kaip kviečius, miežius, avižas bei kukurūzus kolonizuojantis grybas, išskiriamas tokių augalų, kaip cukranendrės, persikai, vidinių audinių (Perelló et al., 2002; Arnold, 2007b; Fávoro et al., 2012). *E. nigrum* yra svarbus cukranendrių endofitinis grybas, susijęs su biologine fitopatogenų kontrole ir antrinių metabolitų gamyba (Fávoro et al., 2012). Šie endofitai pasižymi antagonistiniu poveikiu įvairiems augalų patogenams (t. y. *Sclerotinia sclerotiorum*, *Pythium irregulare* ir *Monilinia* spp.). *E. nigrum* produkuojami lakieji ir nelakūs organiniai junginiai reikšmingai mažina augalų patogenų augimą, nes jų sudėtyje yra priešgrybelinių, antioksidantinių, antimikrobinių medžiagų (Jin et al., 2023; Li et al., 2013). Tyrimas, kuriame kviečių lapai buvo užkrėsti *Bipolaris sorokiniana*, *Septoria tritici*, *Drechslera tritici-repentis* ir *Alternaria*

triticimaculans, atskleidė, jog augalas kolonizuotas *E. nigrum*, mažino patogenų sporų daigumą. *E. nigrum* turi daugeliui endofitiniams grybams būdingų augalų augimą skatinančių savybių, o sorgo sėklos, paveiktos *E. nigrum*, pasižymi pagerintu sėklų dygimu, pailgėjusiais ūgliais ir šaknimis bei padidinta augalo biomase (Rajini et al., 2020). Taip pat, *E. nigrum* geba padidinti tokių augalų kaip cukranendrės šaknų biomasę bei slopinti jų patogenų, įskaitant *Xanthomomas albilineans*, *Colletotrichum falcatum*, *Fusarium verticillioides* ir *Ceratocystis paradoxa*, augimą *in vitro* (Fávaro et al., 2011).

E. nigrum kolonijos yra greitai augančios, ryškiu geltonos arba oranžiškai rudos spalvos pigmentu. Sporuliuojant matyti daugybė juodų sporodochijų (konidioforų sancaupų). Konidijos susidaro pavieniui ant tankiai suspaustų, nespecializuotų, determinantinių, silpnai pigmentuotų konidioforų. Konidijos yra nuo rutuliškos iki piriforminės, dažniausiai 15–25 µm skersmens. Konidijos tampa daugiabranduolės (diktiokonidijos), tamsiai pigmentuotos, jų paviršius yra nelygus (1.5 pav.) (Fávaro et al., 2011; Thorne et al., 2013).



1.5 pav. *Epicoccum nigrum* kolonijos vaizdas (viršutinė ir apatinė pusės) ant skirtingų terpių (**A-C**) ir kolonijų micelio citomorfologija (**D-G**). **A.** kolonija ant Sabouraud dekstrozės agarų; **B.** kolonija ant bulvių dekstrozės agarų (PDA); **C.** kolonijos ant Czapek Dox agarų; **D.** micelis ir

diktiochlamidosporos (20X); **E.** jauna diktiochlamidospora (a), konidioforas (b) ir pertvarinė hifa (c) (40X); **F.** subrendusios diktiochlamidosporos (40X); **G.** subrendusios sporodochijos (stereoskopiškai). Pagal Guzmán-Moreno et al., 2024.

E. nigrum gali kolonizuoti įvairius augalus. Daugeliu atvejų jis veikia kaip naudingas endofitas, padedantis augalui toleruoti stresą, skatinantis augimą ar atsparumą ligoms. Tačiau tam tikromis sąlygomis jis taip pat gali tapti patogeniniu arba veikti kaip silpnas patogenas, ypač jei augalas – šeimininkas patiria stresą (Schulz & Boyle, 2005; Arnold, 2007b). Yra žinoma, kad *E. nigrum* gamina daugybę antrinių metabolitų, kai kurie iš jų turi antimikrobinių savybių. Šie metabolitai gali atlikti svarbų vaidmenį apsaugant augalus ir gali būti naudojami medicinoje ir žemės ūkyje (Fávaro et al., 2012; Braga et al., 2018).

1.8.4 *Microdochium bolleyi*

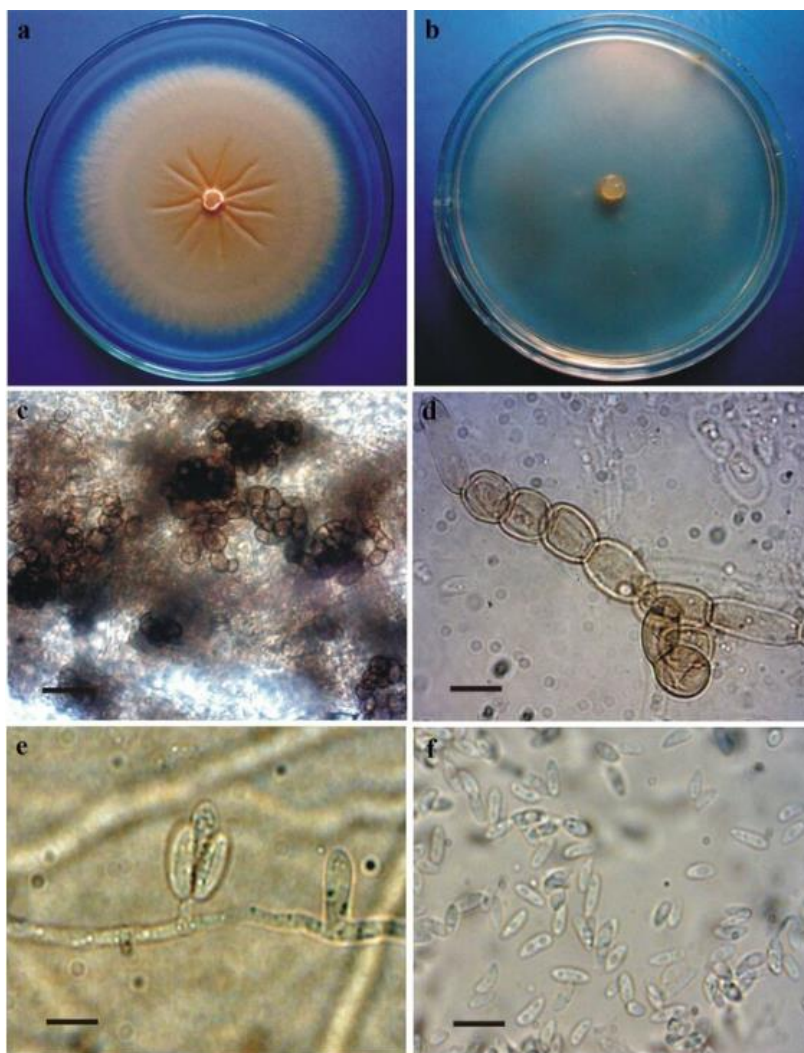
Microdochium bolleyi dažniausiai endofitiškai auga augalų, ypač žolinių, šaknyse (Mandyam et al., 2013). Priskiriamas Amphisphaeriales eilei, Ascomycota skyriui. Dėl melanizuotų ląstelių sienelių ir tarpląstelinio augimo sveikų augalų šaknyse jis apibūdinamas kaip tamsiaspalvis septuotas endofitinis grybas (Jumpponen & Trappe, 1998). *M. bolleyi* poveikis šeimininkui gali būti teigiamas arba neigiamas, priklausomai nuo grybo ir augalo genotipų. *M. bolleyi* genomas sudarytas iš 38,84 Mbp (David et al., 2016a).

David su kolegomis nustatė, kad *M. Bolleyi* kolonizuoja vietinių bei invazinių JAV Ramiojo vandenyno pakrančių žolių šaknis: vietinės *Elymus mollis*, invazinės *Ammophila arenaria* bei *Ammophila breviligulata*. Ši pakrantė yra laikoma atšiaure aplinka dėl stipraus vėjo bei sauso, skurdaus maistinio medžiagomis dirvožemio. Tiriant pajūrio žolinių augalų endofitus, *M. bolleyi* buvo dažniausiai izoliuotas endofitas ir pasižymėjo palyginti greitu augimu, (Mandyam et al., 2010; David et al., 2015). 2007 metais nustatytas, kad žoliniame augale *Agrostis stolonifera* L., daugiausia naudojama golfo ir teniso aikštyno apželdinimui, *M. bolleyi* sukelia puvinį (Hong et al., 2008).

M. bolleyi dažnai atsiranda ant daugelio grūdinių augalų rūšių šaknų, kur tam tikromis sąlygomis jis pasireiškia kaip silpnas patogenas. Jis taip pat buvo izoliuotas iš kviečių laukų dirvožemio bei miežių (David et al., 2016b; Shadmani et al., 2021). Nors *M. bolleyi* poveikis pajūrio žolinių augalų –

šeimininkams dar nėra kiekybiškai įvertintas, *M. bolleyi* paprastai laikomas komensaliniu arba silpnu patogenu. Žoliniuose augaluose sukelia šaknų nekrozę ir puvimą (Hong et al., 2008).

M. bolleyi gamina vienaląstes, lygias, plonasienes, pusrutulio formos, vidutiniškai $6,4 \times 1,9$ μm dydžio konidijas. Jo hifai yra tamsiai rudi ir gali išskirti oranžinį pigmentą (David et al., 2016b). Jaunos kolonijos auginamos ant PDA terpės yra lygios, šviesiai rudos spalvos, tačiau po 2-3 savaičių melanino pigmentuota zona palaipsniui išsiplėčia į išorę nuo kolonijos centro ir kolonijos tampa tamsesnės spalvos (1.6 pav.) (Jumpponen & Trappe, 1998; Hong et al., 2008).



1.6 pav. *Microdochium bolleyi* kolonijos vaizdas ant skirtingų terpių (**a-b**) ir kolonijų micelio citomorfologija (**c-f**). **a.** kolonijos viršutinė pusė ant bulvių dekstrozės agaro (PDA) terpės; **b.** kolonijos viršutinė pusė ant salyklo ekstrakto agaro (MEA) terpės; **c-d.** chlamidosporos išsidėsčiusios grandinėle

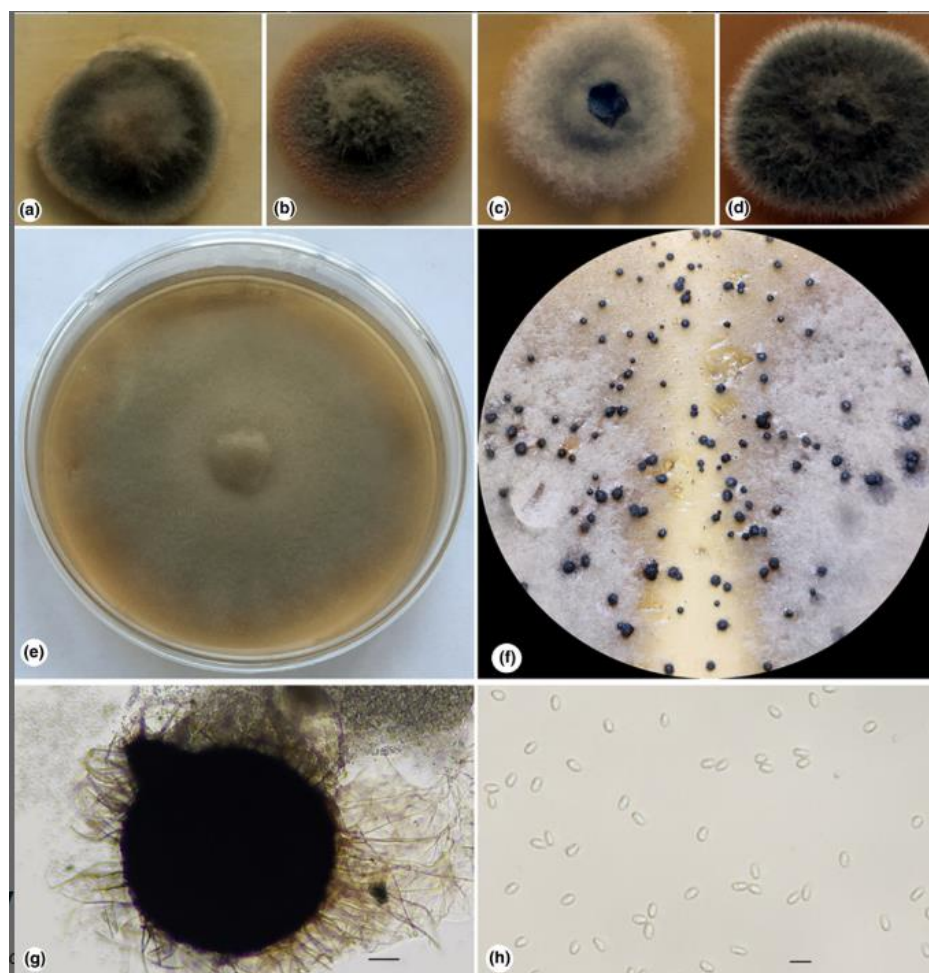
ant bulvių dekstrozės agaro (PDA) terpės; **e.** konidiogeninės ląstelės; **f.** konidijos, skalė (c, f) 10 µm, (d, e) 5 µm. Pagal Shadmani et al., 2018.

M. bolleyi yra svarbus endofitas norint suprasti, kaip grybai simbiozėje su augalu – šeiminku toleruoja ekstremalią aplinką.

1.8.5. *Paraphoma fimeti*

Paraphoma anksčiau buvo klasifikuojama kaip *Phoma* genties dalis, vėliau išskirta į atskirą gentį. Ši gentis formuoja piknidijas ir specializuotas nelytines sporas – chlamidiosporas (de Gruyter et al., 2013). *Paraphoma* rūšys daugiausiai aptinkamos dirvožemyje, sukelia ligas tiek antžeminėje, tiek augalų šaknų dalyje vidutinio klimato zonose Australijoje, Amerikoje, Euroazijoje (de Gruyter et al., 2013; Moslemi et al., 2016). *Paraphoma fimeti* pirmą kartą buvo išskirtas iš paprastojo kadagio (*Juniperus communis*) šaknų 1991 m. Šveicarijoje. Ši rūšis priklauso Pleosporales eilei, Ascomycota skyriui, daugiausiai aptinkama dirvožemyje ir geba pažeisti žolinių augalų lapus. *P. fimeti* turi platų šeimininkų spektrą įvairiose augalų šeimose, yra išskiriama iš žolinių bei sumedėjusių augalų negyvų audinių (de Gruyter et al., 2010).

Paraphoma fimeti kolonijos ant OA pasižymi šviesiai pilku ir alyviniu, lygiu kraštu miceliu. Konidijos yra 3–5 × 2–3 µm dydžio, poliuose aptinkamos aliejaus sankaupos, kurios padeda sporoms išlikti (Boerema et al., 2004).

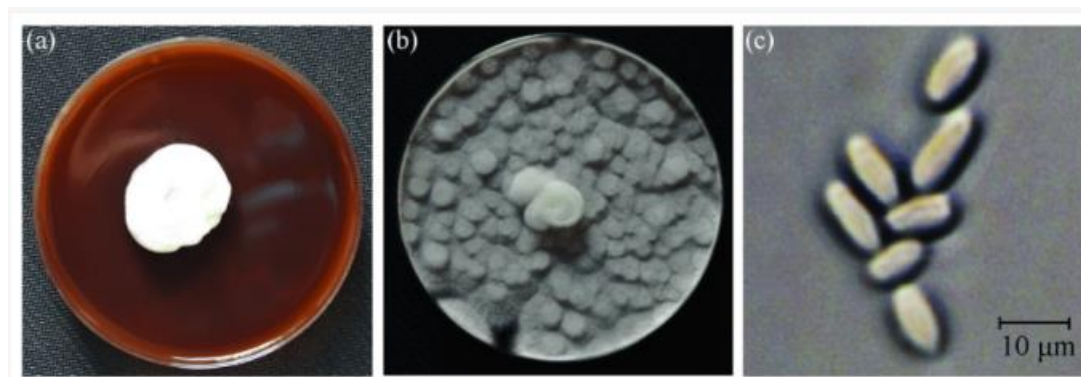


1.7 pav. *Paraphoma* sp. kolonijos vaizdas (viršutinė pusė) ant skirtingų terpių (**a-e**) ir kolonijų micelio citomorfologija (**f-h**). **a.** kolonija ant bulvių dekstrozės agarą (PDA) terpės, po 1 sav. augimo; **b.** kolonija ant avižinių dribsnių agarą terpės; **c.** kolonija ant salyklo ekstrakto agarą (MEA) terpės; **d.** kolonija ant V8 sulčių agarą terpės; **e.** kolonija ir **f.** apvalios juodos piknidijos ant bulvių dekstrozės agarą (PDA) terpės, po 4 sav. augimo; **g.** piknidijos padengtos šereliais; **h.** konidijos, skalė (g) 50 μ m, (h) 10 μ m. Pagal Cao et al., 2020.

Kadangi *Paraphoma fimeti* rūšis nėra plačiai aprašyta, jos morfologija apibūdinama remiantis esamomis žiniomis ir *Phoma* genčiai būdingomis bendrinėmis savybėmis, nes jos yra giminiškos viena kitai. Ant PDA terpės *Paraphoma* sp. izoliatas formuoja rutuliškos formos juodas konidijas, micelio spalva pilkšvai žalia (1.7 pav.) (de Gruyter et al., 2010; Cao et al., 2020).

1.8.6. *Cordyceps fumosorosea*

Cordyceps fumosorosea yra entomopatogeninis (parazituoja ir sukelia ligas vabzdžiams) grybas priskiriamas Hypocreales eilei, Ascomycota skyriui (Kepler et al., 2017; Rojas et al., 2023). Gamina įvairius toksinus ir antrinius metabolitus, kurie gali veikti kaip kenkėjų biokontrolės priemonės (Wu et al., 2021). Grybas formuoja fialides (konidijogeninės ląstelės) lygiomis, besplavėmis sienelėmis, konidijos pailgos ovalios, izoliato micelis pasižymi šviesiai rausva arba šviesiai pilka spalva (1.8 pav.) (Humber, 2012).



1.8 pav. *Cordyceps fumosorosea* kolonijos vaizdas ant SDA terpės (**a-b**) ir kolonijų micelio citomorfologija (**c**). **a.** kolonijos viršutinė pusė; **b.** subrendusios kolonijos viršutinė pusė; **c.** konidijos, skalė 10 μm. Pagal Luo et al., 2022.

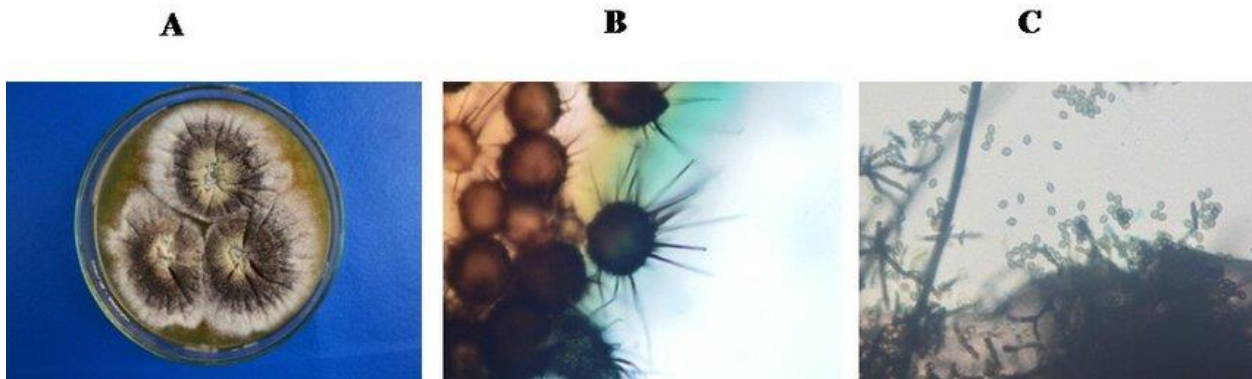
Sun su bendraautoriais nustatė, kad *C. fumosorosea* endofitiškai kolonizuoja baklažanų (*Solanum melongena*) šaknis, stiebus ir lapus bei inokuliuojant geba padidinti šių augalų biomasę ir apsaugoti juos nuo vabzdžių (Sun et al., 2020a). Taip pat geba pagerinti daržinių pupelių (*Phaseolus vulgaris*) augimą (Dash et al., 2018). Ši rūšis yra paplitusi visame pasaulyje ir yra plačiai naudojama žemės ūkio komercijoje. *C. fumosorosea* gerai toleruoja abiotinį stresą, pavyzdžiui, aukštą temperatūrą ir ultravioletinę spinduliuotę (UV-B), todėl yra laikomas palankiu komerciniu produktu (Rojas et al., 2023).

1.8.7. *Chaetomium funicola*

Chaetomium funicola prisklauso Sordariales eilei, Ascomycota skyriui. Grybo vaisiakūniai 100–210 × 100–200 μm, rutuliškos arba elipsoidinės formos, padengti plaukuotomis struktūromis, kas

būdinga *Chaetomium* genties rūšims. Peridiumas (apsauginis vaisiakūnio sluoksnis) sudarytas iš kampuotų ląstelių (Barbosa et al., 2012).

Chaetomium funicola kolonijos ant Czapek agarą (CZA) terpės yra pilkos spalvos, su šviesiai gelsvais kraštais (1.9 pav., A). Askomai tamsiai rudos arba šviesiai pilkos spalvos, ovalios arba sferinės formos (1.9 pav., B). Askosporos 6,0–7,5 x 4–4,5 µm dydžio, elipsinės formos su smailiais galais, rusvos alyvuogių spalvos (1.9 pav., C) (Barbosa et al., 2012; Nguyen et al., 2021).



1.9 pav. *Chaetomium funicola* kolonijos vaizdas ant Czapek agarą (CZA) terpės (**A**) ir kolonijų micelio citomorfologija (**B-C**). **A.** kolonijos viršutinė pusė; **B.** askoma (40X); **C.** askosporos (100X). Pagal Nguyen et al., 2021.

1.9 Vasariniai miežiai (*Hordeum vulgare* L.)

Vasariniai miežiai yra viena iš pagrindinių kultūrų maisto ir pašarų pramonėje, kultivuojama jau nuo senų laikų (daugiau nei 10 000 metų) (Weiss et al., 2012). Dėl ankstyvo brendimo ir didelio prisitaikymo prie stresinių sąlygų (įskaitant šaltį, sausrą, šarminę ir druskingą dirvožemį) miežiai puikiai tinka auginti visame pasaulyje nuo borealinių iki pusiaujo regionų (Baik & Ullrich, 2008). Dėl didelio vasarinių miežių derliaus, kuris palankiomis sąlygomis siekia 5,5 t/ha, jie yra svarbūs ir maisto, ir pašarų gamybai. Miežiai naudojami žmonių mityboje kaip vertingas grūdinis augalas, kuriame gausu baltymų (14-18 %) ir angliavandenių, o tai padeda gerinti sveikatą ir didinti mitybos energinę vertę. Pašarų gamyboje vasariniai miežiai dėl savo aukštos maistinės sudėties ir energijos yra puikus pašarų šaltinis gyvuliams, todėl gyvulininkystėje jie yra labai svarbūs (Lammas & Shitikova, 2024).

Šiame darbe mes tyrėme endofitinių grybų daromą įtaką vasarinių miežių augimui. Vasariniai miežiai (*Hordeum vulgare* L.) yra vienmetis žolinis augalas, priklausantis varpinių (miglinių) šeimai

(Poaceae). Stiebus sudaro bambliai ir tarpubambliai. Ties bambliais esančios lapų makštys yra atviros, o lapalakščiai linijiški. Žiedynas – keturbriaunė ar šešebriaunė sudėtinė varpa. Žiedo piestelė, trys kuokeliai ir dvi lodikulės yra dengiami apatiniu ir viršutiniu žiedažvyniu, kurie gaubia generatyvines struktūras – piestelę ir kuokelius. Miežio vaisius yra grūdas (Reid, 1985). Miežiai yra diploidinė rūšis, turinti didelį >5 Gbp genomą (Bennett & Smith, 1976).

Kenkėjai ir patogenai, tarp kurių ir endofitiniai grybai, mažina miežių derlių. Pirmą kartą apie *Ramularia* lapų dėmėtligės (RLS) simptomus buvo pranešta daugiau nei prieš 100 metų Italijoje. Su šia liga susijęs sukėlėjas iš pradžių buvo apibūdintas kaip grybelinis patogenas *Ophiocladium hordei*, bet vėliau buvo pervadintas į *Ramularia collo-cygni*. Liga pasireiškia vėlyvu sezono metu, sukeldama rausvai rudas nekrozines dėmes, kurios matomos abiejose lapo mentės pusėse, dažniausiai apsuptas chlorotinės aureolės ir ankstyvo lapų senėjimo, dėl ko pasėliuose sumažėja žaliųjų lapų plotas ir sumažėja pasėlių derlius (Walters et al., 2008; Havis et al., 2015).

Fusarium genties grybai pažeidžia miežių grūdus. Šią gentį sudaro kelios rūšys, kurios pasėliuose sukelia javų fuzariozę. Dėl šios ligos patiriami dideli derliaus ir produktų kokybės nuostoliai. *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium sporotrichoides*, *Fusarium poae*, *Fusarium langsethiae*, *Fusarium tricinctum*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium cerealis* ir *Fusarium asiaticum* yra labiausiai paplitusios rūšys, užkrečiančios smulkiuosius javus (Rojas et al., 2018).

Tinklinė dėmėtligė, kurią sukelia aukšliagrybis *Pyrenophora teres*, tapo viena svarbiausių miežių ligų. Lengvai atpažįstama iš rudų tinklinių juostų ant jautrių miežių lapų, tinklinė dėmėtligė iki 40 % sumažina derlių ir pablogina sėklų kokybę. Grybo gyvenimo ciklas, plitimo būdas ir patogeno vystymasis leidžia greitai užkrėsti šeiminką (Backes et al., 2021).

Shadmani savo tyrimuose iš miežių (*Hordeum vulgare* L.) šaknų, augusių vakarų Irane, išskyrė 400 endofitinių grybų izoliatų. Remiantis morfologijos ir rDNR sekos vidinio transkribuojamo tarpiklio (ITS) rDNA duomenimis bei palyginus sekas su NCBI duomenų bazėje esančiomis sekomis, 70 % izoliatų identifikuoti kaip tamsiaspalviai septuoti endofitiniai grybai (TSE), įskaitant *Alternaria alternata*, *Microdochium bolleyi*, *Bipolaris zeicola*, *Alternaria* sp, ir *Pleosporales* sp., likę 30 % ne TSE, tokie kaip *Fusarium redolens*, *Fusarium tricinctum*, *Fusarium moniliforme*, *Clonostachys rosea* ir *Epicoccum nigrum*. Tarp nustatytų genčių dominuojanti gentis buvo *Alternaria*, antra pagal dažnumą buvo *Fusarium* ir *Microdochium* (Shadmani et al., 2021).

1.10 Raudonieji dobilai (*Trifolium pratense*)

Raudonieji dobilai jau nuo seno yra laikomi svarbiais pašariniais augalais. Dobilai plačiai auginami vidutinio klimato regionų Europoje bei visame pasaulyje (Ghazanfarpour et al., 2016; Gościński et al., 2023).

Šiame darbe mes tyrėme endofitinių grybų daromą įtaką raudonųjų dobilų augimui. Raudonieji dobilai yra daugiamečiai augalai, priklausantis pupinių (Fabaceae) šeimai (Ellison et al., 2006). Stiebai formuoja kero formą, prasideda nuo vainiko, susiformavę būna tuščiaviduriai, dažniausiai jų ilgis svyruoja nuo 40 iki 80 cm. Žiedai bekočiai ir dvilyčiai, susitelkę 2-3 cm pločio žiedyne. Dobilai turi 418 Mbp genomą (Bowley et al., 1984; Dluhošová et al., 2018).

Labiausiai paplitusi raudonųjų dobilų šaknų bakterijų gentis yra *Rhizobium*. Tiriant raudonųjų dobilų šaknis skirtingose Švedijos vietovėse, identifikuotos 62 įvairių genčių grybų rūšys, kurios labiau linkusios užkrėsti žolinius augalus. Tokie grybai kaip *Sclerotinia trifoliorum* ir *Fusarium* spp. sukelia dobilų šaknų puvinį (Yli-Mattila et al., 2010; Jambagi et al., 2023).

1.11 Paprastosios alyvos (*Syringa vulgaris*)

Alyvos yra vienas iš populiariausių augalų, naudojami kraštovaizdžiui formuoti, kvėpalų pramonėje bei tradicinėje medicinoje. Paprastosios alyvos yra naudojamos kaip dekoratyvinė rūšis visame Europos žemyne (Woźniak et al., 2018; Zhu et al., 2021).

Šiame darbe buvo tirta endofitinių grybų daromą įtaką alyvų augimui. Alyvos (*Syringa vulgaris*) yra daugiamečiai augalai, priklausantis alyvmedinių (Oleaceae) augalų šeimai (Simpson, 2019). Krūmas ar nedidelis medis įprastai užauga 6-7 metrų ilgio. Lapai dviskilčiai, tamsiai žali, širdinės formos, 4-12 cm ilgio. Žiedai kvapnūs, susitelkę į šluotelinius žiedynus. Žiedai turi po 4 žiedlapius (Kirkham, 2023; Zhang et al., 2025). Paprastosios alyvos genomai siekia 1,6 Gbp (Lattier & Contreras, 2017).

Nustatyta, jog *S. vulgaris* šaknyse vyrauja *Pseudomonadota* ir *Bacillota* bakterijų tipai, tuo tarpu žinių apie endofitinius grybus aptikimą nėra daug (Tsavkelova et al., 2024). Žinoma, kad *Phyllactinia syringae* grybas sukelia miltligę ant paprastųjų alyvų lapų (Larsen et al., 2017).

2. TYRIMŲ MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Tyrimų objektas

Endofitinai grybai – *Epicoccum nigrum*, *Microdochium bolleyi*, *Plectosphaerella cucumerina*, *Cadophora fastigiata*, *Cordyceps fumosorosea*, *Chaetomium funicola* – pirmiausiai buvo pastebėti atliekant citologinius chromosomų tyrimus *Festuca gigantea* bei *Lolium perenne* × *Festuca gigantea* hibridų šaknies meristemų preparatuose (Stakelienė et al., 2025). Mūsų aptiktų endofitinių grybų LOJ ir jų augimą skatinančios savybės vasarinių miežių (*Hordeum vulgare*) ir raudonųjų dobilų (*Trifolium pratense*) augimui, alyvų (*Syringa vulgaris*) šaknų ir miežių sėklų inokuliacija literatūroje yra nepakankamai arba iš viso netirtos. Šis tyrimas skirtas išbandyti *in vitro* būdą, pasinaudojant vasariniais miežiais (Poaceae), dobilais (Fabaceae) kaip modelinėmis rūšimis, siekiant nustatyti endofitinių grybų išskiriamų lakiųjų organinių junginių daromą įtaką šaknų, šakniaplaukių ir ūglių augimui bei galimas sąsajas. Taip pat buvo siekiama įvertinti grybų suspensijos poveikį paprastųjų alyvų (Oleaceae) šaknų bei ūglių augimui bei sėklų inokuliacijos daromą įtaką miežių augimui.

Šiame tyrime naudoti:

- 1) Vasarinio miežio (*Hordeum vulgare* L.) 'Gunda DS' sėklų pavyzdys gautas iš LAMMC Žemdirbystės instituto;
- 2) Raudonieji dobilai (*Trifolium pratense* L.) 'Arimaičiai' gauti iš LAMMC Žemdirbystės instituto;
- 3) Paprastosios alyvos (*Syringa vulgaris* L.) 'Mme Lemoine' iš VU Botanikos sodo Kairėnuose, gautos iš M. Rimkevičiaus.

2.2. Tyrimų metodai

Šiame tyrime išbandytos 6 skirtingas endofitinių grybų rūšis – *Epicoccum nigrum*, *Microdochium bolleyi*, *Plectosphaerella cucumerina*, *Cadophora fastigiata*, *Cordyceps fumosorosea*, *Chaetomium funicola*.

2.2.1. Vasarinių miežių 'Gunda DS' daiginimas *in vitro* endofitinių grybų LOJ poveikyje

Endofitinių grybų lakiųjų organinių junginių poveikiui įvertinti naudotos 'Gunda DS' veislės miežių sėklos. Tyrimo apimtis – 240 sėklų, po 40 kiekvienam veikimo variantui. Sėklos sterilinamos sidabro nitratu (AgNO_3) ir perplautos steriliu vandeniu.

Endofitiniai grybai auginti 35 mm skersmens lėkštelėse, ant bulvių dekstrozės agaro (PDA) terpės su antibiotikų papildais, ampicilinu (galutinė koncentracija – 100 $\mu\text{g/ml}$) ir streptomicino sulfatu (galutinė koncentracija – 100 $\mu\text{g/ml}$), 27 °C tamsoje dvi dienas. Į kiekvieną didelę kvadratinę 120x120 mm lėkštelę, užpildyta Murashige ir Skoog terpe, paruošta $\frac{1}{2}$ standartinės koncentracijos (be papildomos sacharozės ir vitaminų), buvo dedama po dvi 35 mm skersmens lėkštelės su endofitiniu grybu, kontrolėje – lėkštelės be grybo, tik su PDA terpe. Miežių sėklos, skirtos visiems eksperimento veikimo būdams, buvo veikiamos sidabro nitratu (AgNO_3), 110 aps./min., 10 min. Po veikimo sidabro nitratu du kartus trumpai perplautos steriliu vandeniu, trečią kartą perplaunamos 10 min. Į kiekvieną Petri lėkštelę buvo dedama po 4 miežių sėklas. Dygstančios miežių sėklos buvo auginamos 22–24 °C temperatūroje, 16/8 h fotoperiodu. Šiose lėkštelėse miežių daigai patyrė grybų iškiriamus LOJ poveikį. Po 5, 6 ir 7 augimo dienų buvo suskaičiuotas šakniaplaukių 0,5 mm² skaičius, septintą dieną – pagrindinių ir šoninių šaknų skaičius, šaknų ir ūglių ilgis. Po 12 dienų pasvertos miežių požeminė ir antžeminė dalys. Šakniaplaukių skaičius buvo vertintas naudojant EuromexNexiusZoom EVO stereomikroskopą (kat. Nr. NZ.1902-B, Euromex Microscopen, Duiven, Nyderlandai), naudojant ImageFocusAlpha (4 versija) programą. Kiekvienam variantui ir kontrolei (lėkštelės be grybų kultūros) buvo įvertinti 0,50 mm² plotai 10 šaknų. Tyrimai buvo atlikti trimis serijomis, kiekvienoje tiriant po du skirtingus grybus. Pirmoje serijoje buvo tiriamas *E. nigrum* ir *M. bolleyi*, antroje – *C. fastigiata* ir *P. cucumerina*, trečioje – *C. fumosorosea* ir *C. funicola* LOJ poveikis miežiams. Kiekvienoje serijoje buvo naudojamos atskiros kontrolės.

2.2.2. Raudonųjų dobilų 'Arimaičiai' daiginimas *in vitro* endofitinių grybų LOJ poveikyje

Endofitinių grybų lakiųjų organinių junginių poveikiui įvertinti naudotos 'Arimaičiai' veislės dobilų sėklos. Tyrimo apimtis – 300 sėklų, po 50 kiekvienam veikimo variantui. Dobilų sėklos, skirtos visiems eksperimento veikimo būdams, buvo veikiamos 70 % etanoliu 1 min. Vėliau vieną kartą 30 sek. perplautos steriliu vandeniu ir sterilinamos 50 % natrio hipochloritu (ACE), 110 aps./min., 10 min.

Po veikimo natrio hipochloritu du kartus trumpai perplautos steriliu vandeniu, trečią kartą perplaunamos 10 min.

Endofitiniai grybai auginti 35 mm skersmens lėkštelėse, ant bulvių dekstrozės agaro (PDA) terpės su antibiotikų papildais, ampicilinu (galutinė koncentracija – 100 µg/ml) ir streptomicino sulfatu (galutinė koncentracija – 100 µg/ml), 27 °C tamsoje dvi dienas. Į kiekvieną didelę kvadratinę 120x120 mm lėkštelę, užpildyta Murashige ir Skoog terpe, paruošta ½ standartinės koncentracijos (be papildomos sacharozės ir vitaminų), buvo dedama po dvi 35 mm skersmens lėkštelės su endofitiniu grybu, kontrolėje lėkštelės be grybo, tik su PDA terpe.

Į kiekvieną Petri lėkštelę buvo dedama po 10 dobilų sėklas. Dygstančios sėklos buvo auginamos 22–24 °C temperatūroje, 16/8 h fotoperiodu. Po 7 augimo dienų buvo suskaičiuotas šakniaplaukių 0,5 mm² skaičius, pagrindinių ir šoninių šaknų skaičius ir išmatuotas šaknų ilgis. Po 12 dienų pasvertos miežių požeminė ir antžeminės dalys. Šakniaplaukių skaičius buvo vertintas naudojant EuromexNexiusZoom EVO stereomikroskopą (kat. Nr. NZ.1902-B, Euromex Microscopen, Duiven, Nyderlandai), naudojant ImageFocusAlpha (4 versija) programą. Kiekvienam variantui ir kontrolei (lėkštelės be grybų kultūros) buvo įvertinti 0,50 mm² plotai 10 šaknų. Tyrimai buvo atlikti dviem serijomis, kiekvienoje tiriant po tris skirtingus grybus. Pirmoje serijoje buvo tiriamas *M. bolleyi*, *C. fastigiata* ir *C. fumosorosea*, antroje – *P. cucumerina*, *C. funicola* ir *E. nigrum* LOJ poveikis dobilams. Kiekvienoje serijoje buvo naudojamos atskiros kontrolės.

2.2.3. Endofitinių grybų išskiriamų LOJ analizė

Dujų chromatografijos ir masių spektrometrijos (GC-MS) metodu atlikta LOJ analizė, ištirti 5 mėginiai, 4 endofitinių grybų variantai ir kontrolė – PDA terpė.

Lakieji organiniai junginiai, kuriuos išskiria grybai Petri lėkštelėje, buvo renkami 1 valandą iš viršutinės erdvės, naudojant PDMS/DVB 65 µm kietosios fazės mikroekstrakcijos (SPME) pluoštą. Kai tik LOJ surinkimas buvo baigtas, SPME pluoštas buvo nedelsiant perkeltas į dujų chromatografijos-masių spektrometrijos sistemą (Shimadzu GC-2010 dujų chromatografą (GC), sujungtą su Shimadzu MS-QP 2010 Plus masės selektyviniu detektoriumi (MS) (Shimadzu, Kioto, Janalysedpan). GC buvo įrengta nepolinė Rxi-5SilMS integra-Guard kolonėlė (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm; Restek, JAV), o junginių atskyrimas buvo atliktas tokiomis sąlygomis: pradinė 40 °C temperatūra palaikoma pastovi 2 min., po to temperatūra pakeliama iki 240 min/7. Galutinė temperatūra izotermiškai palaikoma 4 min. Kaip nešančiosios dujos buvo naudojamas helis, kurio srautas buvo 1,3

ml/min. Elektronų jonizacijos spektrai gauti esant 70 eV elektronų energijai. Injektoriaus, sąsajos ir jonų šaltinio temperatūra buvo atitinkamai 240 °C, 250 °C ir 220 °C. MS analizė atlikta skenavimo režimu 33-400 m/z diapazone. LOJ buvo preliminariai identifikuoti lyginant jų masės spektro duomenis ir sulaikymo indeksus su NIST masės spektro paieškos programos 2.0 versija (Nacionalinis standartų ir technologijos institutas, Gaithersburg, Merilandas, JAV). Kiekvienas pavyzdys buvo techniškai pakartotas du kartus.

2.2.4. Vasarinių miežių ‘Gunda DS’ inokuliacija endofitiniais grybais

Vasarinio miežio sėklų inokuliacijai buvo naudojami *Cordyceps fumosorosea*, *Microdochium bolleyi*, *Chaetomium funicola* 14 dienų izoliatų suspensijos. Ant kiekvieno izoliato 15-kos Petri lėkštelių buvo užpilta po 4 ml sterilaus vandens, švelniai braukiant automatinės pipetės antgaliu konidijos buvo paskleistos lėkštelėje ir surinktos į sterilius indus. Kiekvieno izoliato gauta apie 50 ml grybų sporų suspensijos. Buvo suskaičiuotas grybų sporų kiekis viename mililitre (sporos/ml). Siekiant užtikrinti vienodumą sporų tankis buvo pakoreguotas iki $4,00 \times 10^6/\text{mL}$. Endofitinių grybų suspensijos tūrio skaičiavimui naudotas hemocitometras. Konidijų suspensijos tūris skaičiuotas pagal Avin, 2019 rekomendacijas. Kiekvienai grybų suspensijai ir kontrolei buvo naudota po 150 sėklų. *M. bolleyi* sėklų viename variante sėklos po inokuliacijos nebuvo perpalunamos vandeniu, o kitame variante sėklos po inokuliacijos buvo perplautos steriliu vandeniu. Miežių sėklos, skirtos visiems eksperimento veikimo būdams, buvo veikiamos 65 % sieros rūgštimi 15 min. tam, kad būtų suardoma sėklos luobelė ir padidinamas inokuliacijos efektyvumas. Vėliau du kartus 30 sek. perplautos steriliu vandeniu ir sterilinamos 70 % etanolyje 2 min., vėl vieną kartą perplautos steriliu vandeniu ir sterilinamos 50 % natrio hipochloritu (ACE, 5 %) 10 min. Po veikimo natrio hipochloritu du kartus trumpai perplaunamos steriliu vandeniu, trečią kartą perplaunamos 10 min. Po sterilinimo miežių sėklos buvo užpildos paruošta grybų sporų suspensija (išskyrus kontrolę) ir laikoma 30 min. purtyklėje 28 °C, 140 rpm. Miežių inokuliacijos eksperimento schema pateikta 2.1 lentelėje.

2.1 lentelė. Vasarinių miežių (*Hordeum vulgare* L.) 'Gunda DS' sėklų veikimo būdai.

	Veikimas 65% sieros rūgštimi, x1	Veikimas steriliu vandeniu, x2	Veikimas 70 % etanoliu, x1	Veikimas steriliu vandeniu, x1	Veikimas 50% natrio hipochloritu (ACE, 5 %), x1	Veikimas steriliu vandeniu, x3	Veikimas endofitinių grybų sporų suspensija, x1
Kontrolė	15 min.	30 sek.	2 min.	30 sek.	10 min.	10 min.	-----
Veikimas grybų suspensijo mis	15 min.	30 sek.	2 min.	30 sek.	10 min.	10 min.	30 min.

Sėklos daiginamos laminare kambario temperatūroje (22-24 °C) Petri lėkštelėse ant steriliu vandeniu suvilgyto sterilaus popieriaus. Po 7 dienų buvo suskaičiuotas sudygusių miežių sėklų skaičius, o daigai buvo sodinami į 6,5×6,5 cm skersmens ir 6,2 cm gylio daigyklas, užpildytas autoklavuotu (30 min. 121°C temperatūroje) durpių ir kompostinės žemės mišiniu santykiu 1:4. Pasodinta po 50 kontrolės ir inokuliuotų skirtingais endofitais miežių daigų, kurie auginti šiltnamyje temperatūros diapozone 16,5-24,2 °C, drėgmės diapozone 50-80 %rH ir CO₂ diapozone 421-608 ppm. Praėjus 30 dienų, atliktas augalų antžeminės dalies ir šaknų masės įvertinimas, fiksuota šaknų morfologija fotografuojant. Ūgliai sveriami nedžiovinoti, šaknys prieš sveriant išplautos nuo dirvožemio ir per naktį išdžiovintos 28-30 °C temperatūroje.

2.2.5. Paprastųjų alyvų 'Mme Lemoine' veikimas endofitinių grybų sporų suspensija

Alyvų (*Syringa vulgaris*) 'Mme Lemoine' inokuliacijai buvo naudojami *C. fastigiata* ir *P. cucumerina* 7 dienų izoliatų suspensijos. Ant kiekvienos izoliato 40-kos Petri lėkštelių buvo užpilta po 4 ml sterilaus vandens, švelniai braukiant automatinės pipetės antgaliu grybiena buvo paskleista lėkštelėje ir gauta suspensija surinkta į sterilų indą. Kiekvieno izoliato gauta apie 120 ml suspensijos. Buvo suskaičiuotas suspensijų sporų kiekis viename mililitre (sporos/ml). Siekiant užtikrinti vienodumą sporų tankis buvo pakoreguotas iki $4,00 \times 10^6/\text{mL}$. Endofitinių grybų suspensijos tūrio skaičiavimui naudotas hemocitometras. Suspensijos tūris skaičiuotas pagal Avin, 2019 rekomendacijas. Kiekvienai grybų suspensijai ir kontrolei buvo naudota po 17 alyvų daigų. Po 52 dienų auginimo mėgintuvėlyje Murashige ir Skoog terpėje, paruošta ½ standartinės koncentracijos

(papildomai dėta 20 g/L sacharozės, su hormonu indolio sviesto rūgštimi 1 mg/L, pH 5,8) 24-26 °C, šviesos intensyvume 60 $\mu\text{m}^2/\text{s}$, 16/8 val. fotoperiodas sąlygomis, alyvų daigai buvo sodinami į 6,5×6,5 cm skersmens ir 6,2 cm gylio daigyklas, prieš tai atliekamas augalų masės vertinimas, suskaičiuoti lapai.

Į daigyklas, užpildytas autoklavuotu (30 min. 121°C temperatūroje) durpių, kompostinės žemės, perlito mišiniu santykiu 5:1:6, buvo pilama grybų suspensija, 5 ml į kiekvieną daigyklą. Suspensija buvo pilama į padarytą duobutę augalui sodinti, kad sporos patektų kuo arčiau šaknų.

Kontroliniam variantui vietoj suspensijos pilamas sterilus vanduo. Prieš sodinimą šaknys buvo pamirkytos grybų sporų suspensijoje, kontrolinių augalų šaknys mirkytos steriliame vandenyje. Veikimas grybų sporų suspensija vykdytas remiantis González-Pérez et al., 2022 rekomendacijomis. Pasodinta po 17 daigų kontrolės ir skirtingais grybais veikti ūglių, kurie auginti temperatūros diapozone 23-25 °C, šviesos intensyvume 60 $\mu\text{m}^2/\text{s}$, 16/8 val. fotoperiodas.

Praėjus 33 dienoms, atliktas augalų masės vertinimas, fiksuotas lapų skaičius, matuojamas ūglių bei šaknų ilgis. Alyvos sodinukai (ūgliai ir šaknys kartu) buvo sveriami nedžiovinti, šaknis prieš sveriant išplaunant nuo dirvožemio.

2.3. Grybų izoliatai

Tyrimams naudoti endofitinių grybų izoliatai iš mano kartu su kolegomis sukurtos VU Botanikos sodo laboratorinės kolekcijos: *C. fastigiata*, *C. funicola* izoliatai buvo gauti iš *Festuca gigantea*, *M. bolleyi*, *P. fimeti* ir *P. cucumerina* iš *Lolium perenne* × *Festuca gigantea* hibridų (laboratorinė augalų kolekcija), *E. nigrum* iš *Lolium multiflorum*, *C. fumosorosea* iš *Lolium temulentum* šaknų galų nuopjovų. Grybų išskyrimo procedūros aprašytos Pašakinskiene ir kt. (Pašakinskienė et al., 2024). Taksonominis priskyrimas buvo pagrįstas kolonijų morfologija ir rūšies citomorfologinėmis savybėmis ir patvirtintas PGR pagamintų ITS, RPB2, SSU ir TEF1-a sekų suderinimu su standartiniais grybų DNR duomenimis NCBI (1 priedas).

2.4. Statistinė analizė

Buvo apskaičiuota miežių – šoninių ir pagrindinių šaknų skaičius, ūglių ir šaknų ilgiai, šakniaplaukių 0.5 mm² skaičius, antžeminė ir požeminė biomasės vidurkiai, dobilų – šoninių ir pagrindinių šaknų skaičius, šaknų ilgis, šakniaplaukių 0.5 mm² skaičius ir bendras augalo biomasės

svėrimų vidurkis, miežių inokuliacijos eksperimente vertinta bendras augalo biomasės vidurkis, alyvų – lapų skaičius, bendras augalo biomasės vidurkis, ūglių ir šaknų ilgiai. Visiems matavimams apskaičiuotos standartinės paklaidos (SP) reikšmės.

Statistinė analizė atlikta naudojant Microsoft Excel programa. Statistinis įvertinimas buvo atliktas Stjudento t-testu. Grybų poveikis augalų augimo parametrams buvo įvertintas naudojant vienpusę ANOVA. Statistinis skirtumų tarp vidurkių reikšmingumas buvo įvertintas post hoc Tukey's testu. Skirtumai buvo laikomi reikšmingais, kai $p \leq 0,05$, labai reikšmingais $p \leq 0,01$. Diagramos braižomos naudojant R 4.4.1 versiją (2024-06-14) programinę įrangą.

Darbas atliktas Vilniaus universiteto Botanikos sodo mokslų programų skyriaus laboratorijoje.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1 Endofitinių grybų izoliatų išskyrimas iš *Festuca* ir *Lolium* augalų šaknų

Ant bulvių dekstrozės agarą (PDA) terpės buvo išauginti grybų izoliatai iš *F. gigantea*, *L. perenne* × *F. gigantea* hibridų, *Lolium multiflorum* ir *Lolium temulentum* šaknies galo mėginių. Iš viso gauti septynių skirtingų endofitinių grybų rūšių izoliatai.

Įvertinus izoliato, išauginto iš *F. gigantea* šaknų segmentų, kolonijų anatomiją ir micelio morfologiją, buvo identifikuota *Cadophora fastigiata* Lagerb. & Melin (1928) [= *Phialophora fastigate* (Lagerb. & Melin) Conant (1937)] endofitinė grybų rūšis (3.1 pav., A1-A4). Nustatyta, kad *C. fastigiata* kolonija apvalios formos su lygiu kraštu. Viršutinės izoliato grybienos pusės centras šviesiai pilkas, pereinantis į tamsiai žalią, pakraščiai šviesiai pilkos spalvos (3.1 pav., A1). Apatinei pusei būdinga tamsiai žalios spalvos centrinė dalis. Vidurinė kolonijos dalis pasižymi pilku pigmentu, pakraštys šviesiai pilkos spalvos, lygus (3.1 pav., A2). Šiam endofitui būdingi melanizuoti, pertvariniai hifai ir melanizuoti konidijakočiai (3.1 pav., A3). Konidijos elipsiškos formos (vaizdas stebint per fazokontrastinį mikroskopą) (3.1 pav., A4).

Iš *F. gigantea* šaknų užaugintas izoliatas identifikuotas kaip *Chaetomium funicola* Cooke (1872) [= *Dichotomopilus funicola* (Cooke) X.Wei Wang & Samson (2016)] (3.1 pav., B1-B3). *C. funicola* pagal viršutinę kolonijos pusę yra šviesiai pilkos spalvos su tamsiai pilku centru (3.1 pav., B1). Apatinės izoliato pusės centras rudo pigmento, pereinantis į šviesiai rudą link nelygaus kolonijos krašto (3.1 pav., B2). Endofito hifai hialiniai, askoma rudo pigmento, galinės atšakos dichotomiškai išsišakojusios (3.1 pav., B2).

Cordyceps fumosorosea (Wize) Kepler, B. Shrestha & Spatafora (2017) [= *Isaria fumosorosea* (Wize) (1904)] išskirtas iš *Lolium temulentum* šaknų (3.1 pav., C1-C4). Kolonijos viršutinė pusė balta ir iškilusi, apatinė pusė pasižymi geltonu centru pereinančiu į šviesiai geltoną spalvą link krašto (3.1 pav., C1, C2). Būdingos konidiogeninės ląstelės ir melanizuoti hifai, konidijos elipsinės formos (3.1 pav., C3-C4).

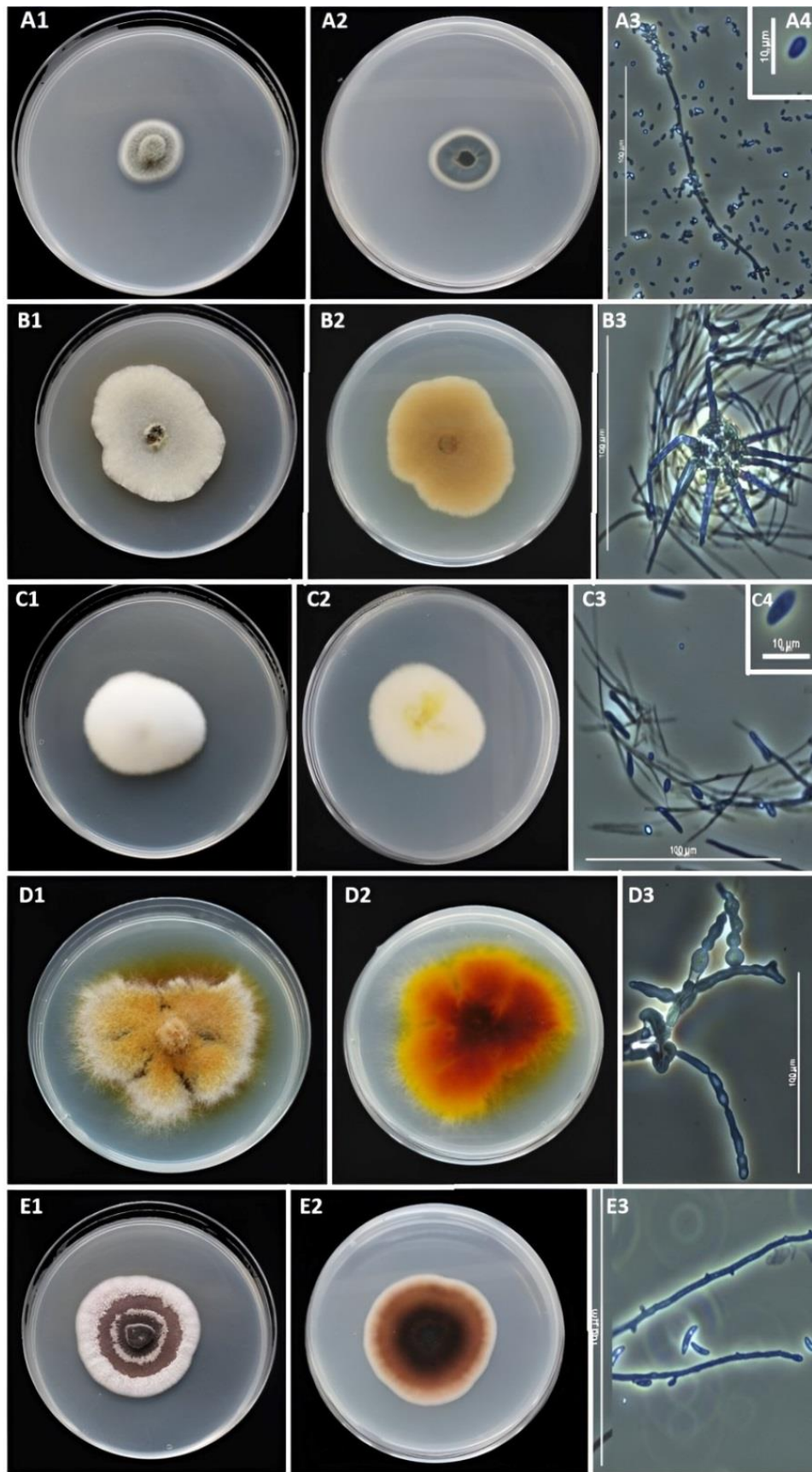
Iš *Lolium multiflorum* šaknų užaugintas izoliatas identifikuotas kaip *Epicoccum nigrum* Link (1816) [= *Epicoccum vulgare* Corda (1837)], [= *Epicoccum versicolor* var. *nigrum* (Link) Rabenh. (1844)] (3.1 pav., D1-D3). Izoliato grybienos viršutinei pusei būdingas šviesiai oranžinio pigmento centras ir vidurinė dalis, kraštai šviesiai pilkos spalvos, nelygūs. Apatinės pusės centras tamsiai

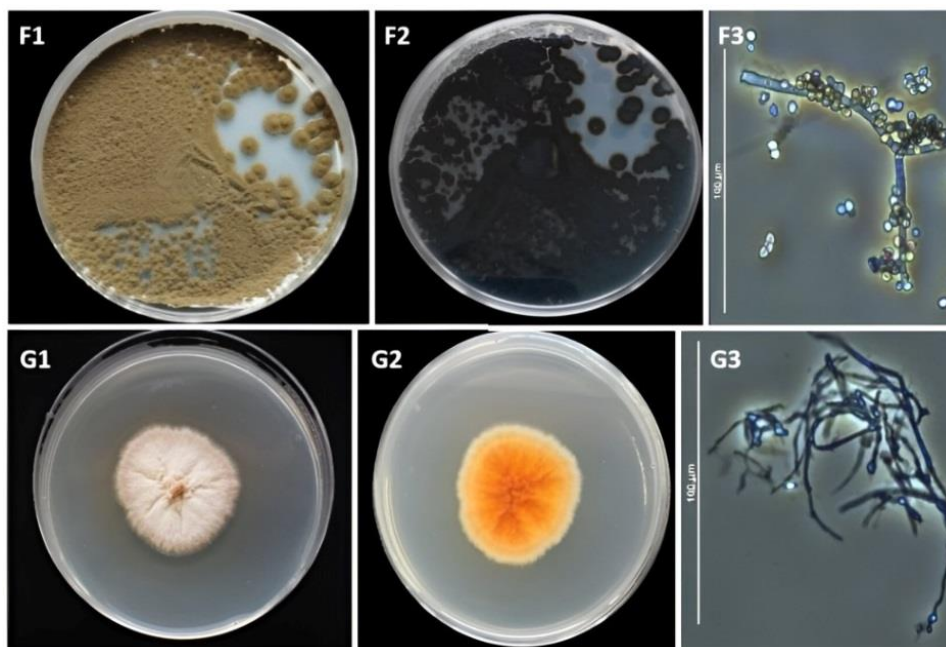
oranžinis, pereinantis į šviesiai oranžinį pigmentą link kolonijos krašto, kraštas dantytas. Grybui būdingos deformuotos blastokonidijos ir apvalios chlamidosporos (3.1 pav., D3).

Microdochium bolleyi (R. Sprague) de Hoog & Herm-Nijh. (1977) [= *Gloeosporium bolleyi* R. Sprague (1948)] buvo aptiktas ir išskirtas iš *L. perenne* × *F. gigantea* hibridų (3.1 pav., E1-E3). Kolonijos viršutinė pusė pasižymi tamsiai rudu centru ir plačiu, šviesiai pilku pakaraščiu (3.1 pav., E1). Apatinė izoliato pusė tamsiai rudos spalvos pereinanti į šviesiai rudą, kraštas šviesiai pilkas, siauras (3.1 pav., E2). Būdingos plonasienės konidiogeninės ląstelės bei pusmėnulio formos hialininės konidijos (3.1 pav., E3).

Iš *L. perenne* × *F. gigantea* hibrido šaknų užaugintas ir identifikuotas *Paraphoma fimeti* (Brunaud) Gruyter, Aveskamp & Verkley (2010) [= *Phoma fimeti* Brunaud (1889)] (3.1 pav., F1-F3). Endofitui būdinga pilkšvai žalia viršutinė kolonijos pusė (3.1 pav., F1). Apatinė kolonijos pusė tamsiai pilkos spalvos su neplačiu šviesiai geltonos spalvos pakaraščiu (3.1 pav., F2). Fazokontrastiniu mikroskopu matoma konidiogeninės ląstelės ir būdingos rutuliškos konidijos (3.1 pav., F3).

Plectosphaerella cucumerina (Lindf.) W. Gams (1972) [= *Venturia cucumerina* Lindf. (1919 m.)] (3.1 pav., G1-G3) gautas iš *L. perenne* × *F. gigantea* hibrido šaknų. Kolonijos viršutinė pusė šviesiai rudos spalvos su gelsvu centru (3.1 pav., G1). Kolonijos apatinės pusės centras tamsiai oranžinės spalvos, pereinantis į šviesiai oranžinę, pakraštys siauras, šviesiai geltonos spalvos (3.1 pav., G2). Būdingi melanizuoti, ploni hifai bei cilindro formos konidijos (3.1 pav., G3).





3.1 pav. 7–10 dienų kolonijų vaizdai ant ant bulvių dekstrozės agarą (PDA) terpės (kairėje viršutinė pusė, dešinėje apatinė pusė) ir grybų kolonijų micelio citomorfologija: (A1, A2) *Cadophora fastigiata*, (A3) konidijakotis, (A4) konidijos; (B1, B2) *Chaetomium funicola*, (B3) hifai ir askoma; (C1, C2) *Cordyceps fumosorosea*, (C3) hifai ir konidiogeninės ląstelės, (C4) konidijos; (D1, D2) *Epicoccum nigrum*, (D3) blastokonidijos ir chlamidosporos; (E1, E2) *Microdochium bolleyi*, (E3) konidiogeninės ląstelės ir konidijos; (F1, F2) *Paraphoma fimeti*, (F3) konidiogeninė ląstelė ir konidijos; (G1, G2) *Plectosphaerella cucumerina*, (G3) hifai ir konidijos. Mastelio juosta: (A3, B3, C3, D3, D4, E3, F3, G3) = 100 µm; (A4, C4) = 10 µm.

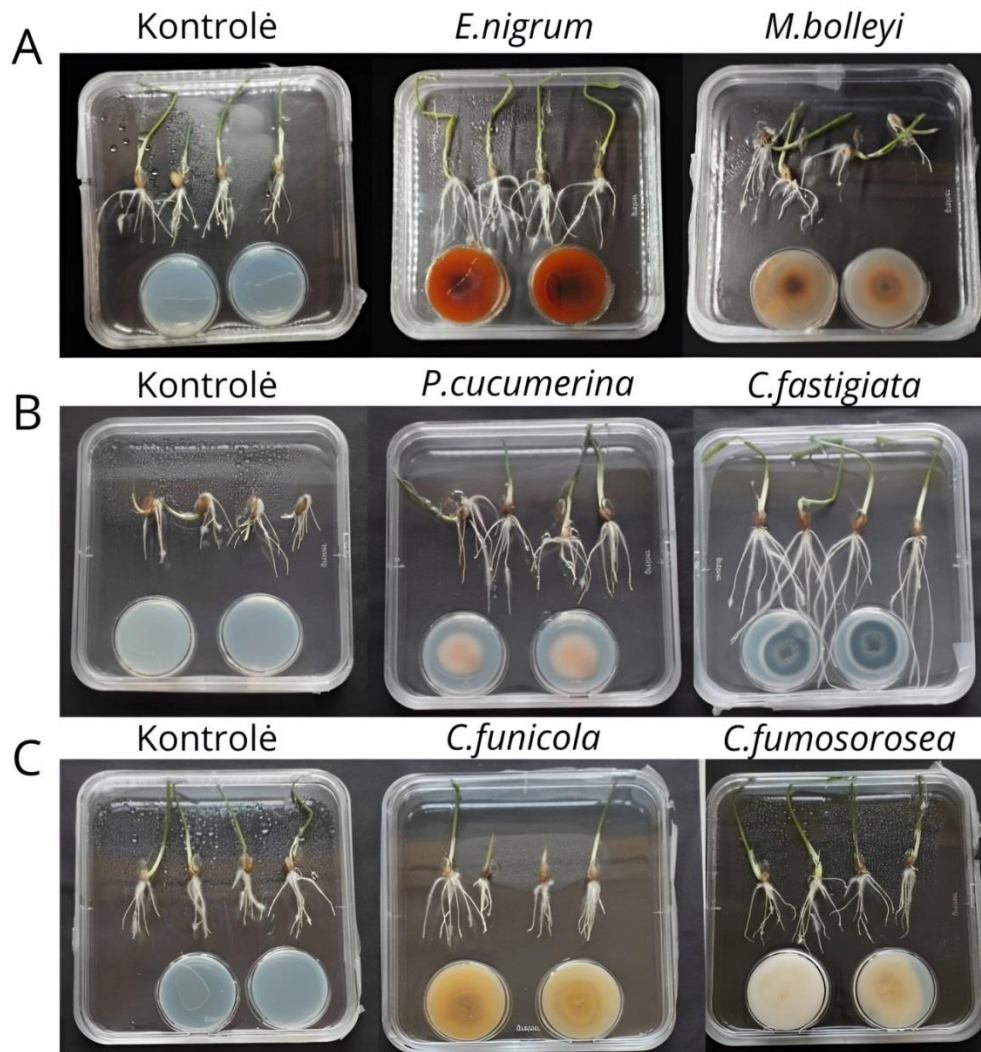
3.2. Endofitinių grybų LOJ poveikis vasariniams miežiams ‘Gunda DS’

Daugiausiai tirtas LOJ poveikis tokiems augalams kaip *Arabidopsis thaliana*, kukurūzams bei pomidorams (Yasmin et al., 2021; Kong et al., 2021; Lin et al., 2025). Literatūros šaltiniuose duomenų apie *Epicoccum nigrum*, *Microdochium bolleyi*, *Plectosphaerella cucumerina*, *Cadophora fastigiata*, *Cordyceps fumosorosea*, *Chaetomium funicola* grybų LOJ daromą įtaką vasarinių miežių augimui yra mažai. Ankstesnių tyrimų metu nustatyta, jog *C. fastigiata* ir *P. cucumerina* išskiriami LOJ turėjo teigiamą poveikį miežių daigų šaknų ir šakniaplaukių augimui (Pašakinskienė et al., 2025). *Epicoccum nigrum*, *Microdochium bolleyi*, *Cordyceps fumosorosea* ir *Chaetomium funicola* LOJ vaidmuo miežių augimui iki šiol nebuvo tirtas.

Siekiant nustatyti endofitinių grybų LOJ poveikį miežių augimui buvo išbandytas lėkštelė-lėkštelėje būdas pasinaudojant vasariniais miežiais kaip modeline miglinių šiemos rūšimi. Miežių privalumas eksperimentuojant su endofitinių grybų išskiriamais LOJ *in vitro* yra spartus jų augimas.

Endofitinių grybų lakiųjų organinių junginių poveikiui vasarinių miežių ‘Gunda DS’ augimo skatinimui nustatyti buvo naudoti mūsų gauti šešių skirtingų rūšių izoliatai (aprašyti 3.1. dalyje). Pirmoje eksperimento serijoje buvo naudojami *E. nigrum* ir *M. bolleyi* (3.2 pav. A), antroje – *C. fastigiata* ir *P. cucumerina* (3.2 pav. B), trečioje – *C. fumosorosea* ir *C. funicola* LOJ (3.2 pav. C).

5-tą, 6-tą ir 7-tą dienomis tyrime buvo įvertintas endofitinių grybų LOJ poveikis šakniaplaukių augimui, 7-tą dieną išmatuotas miežių šaknų ilgis ir ūglių aukštis, pagrindinių ir šoninių šaknų skaičius, 12-tą eksperimento dieną – šaknų ir ūglių biomasė.

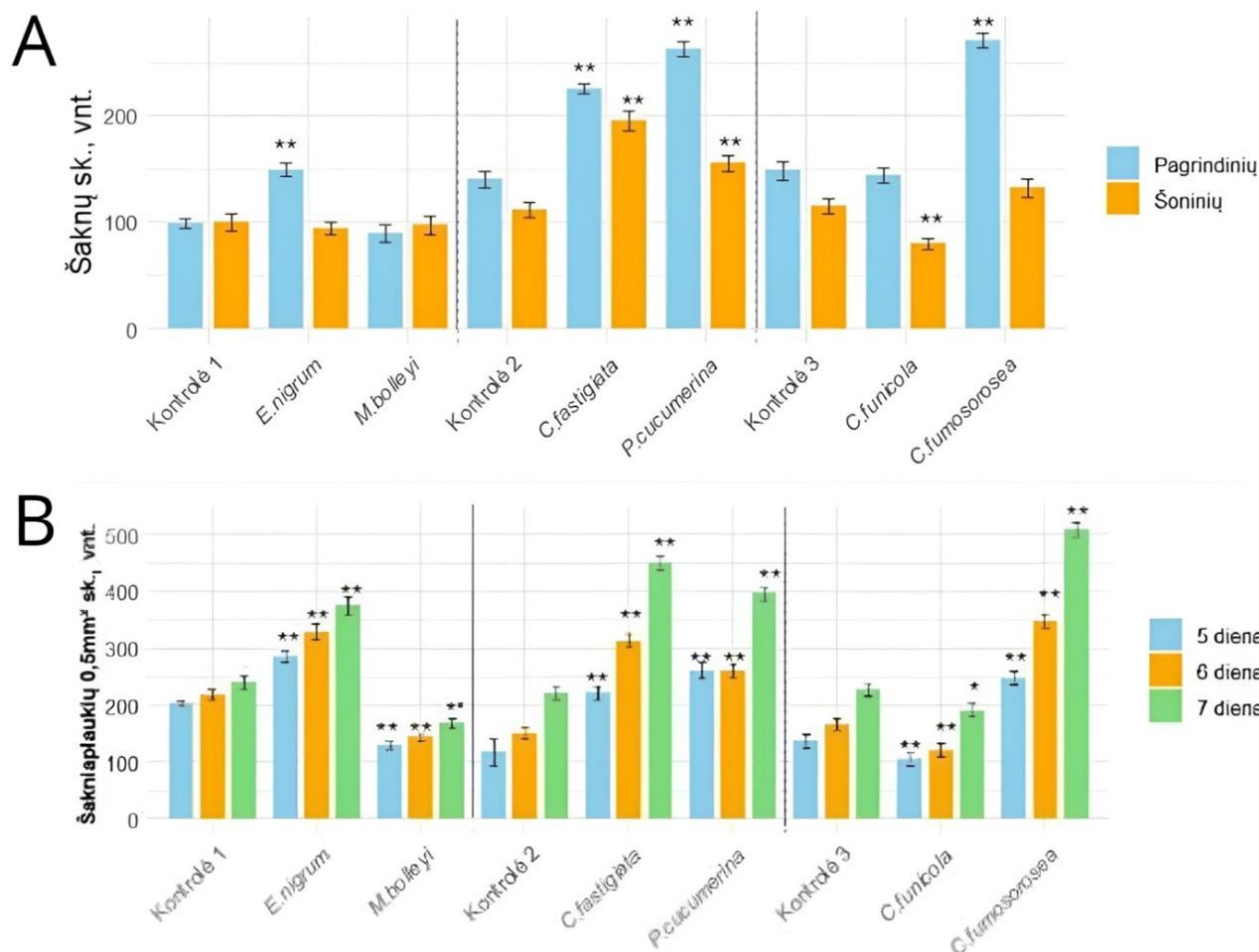


3.2 pav. Vasariniai miežiai po 7 dienų, auginti endofitinių grybų LOJ poveikyje lėkštelė-lėkštelėje eksperimente: **(A)** pirma eksperimento serija, tiriamas *E. nigrum* ir *M. bolleyi* LOJ poveikis; **(B)** antra serija – *C. fastigiata* ir *P. cucumerina*; **(C)** trečia serija – *C. fumosorosea* ir *C. funicola*.

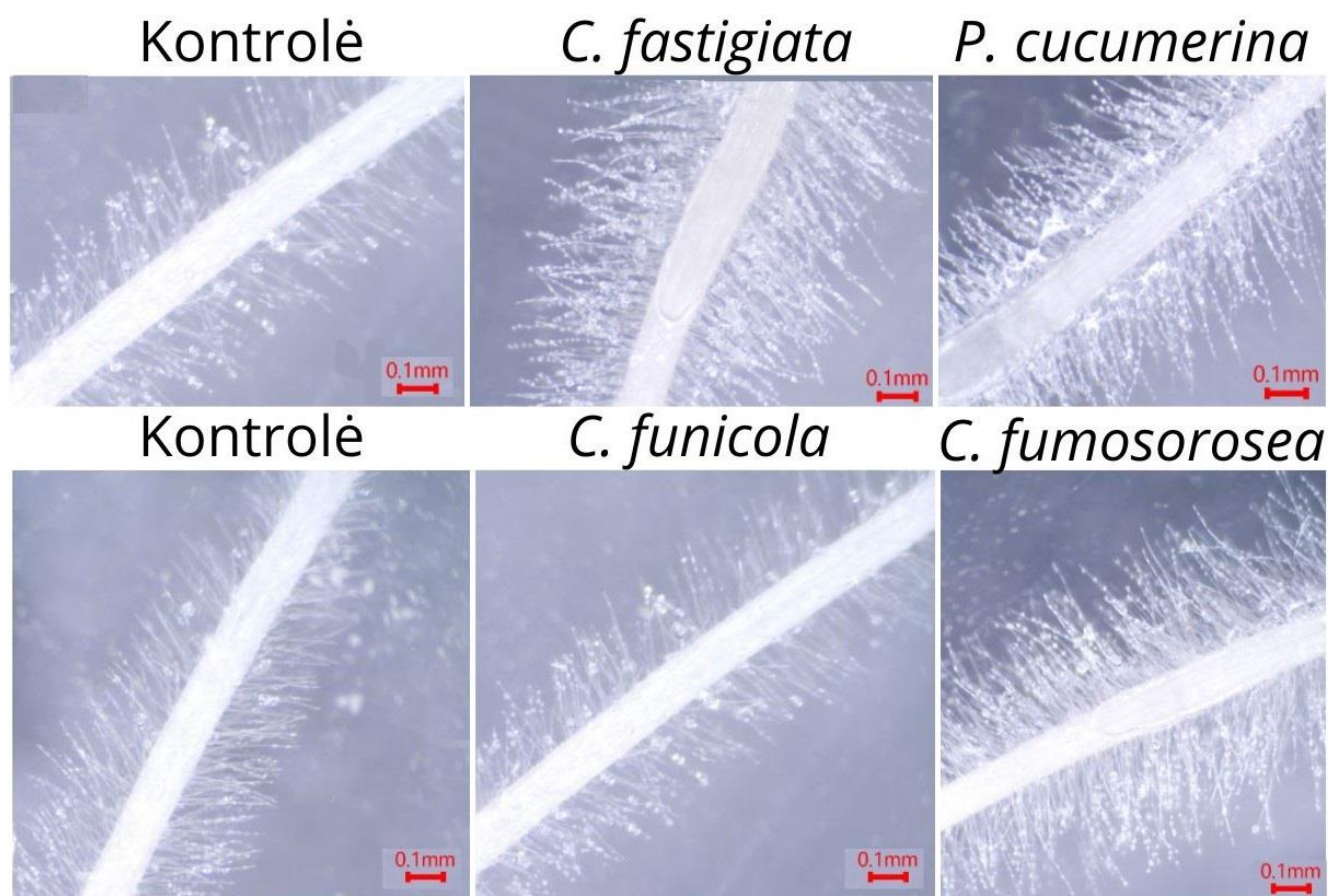
Naujai išbandytas vasarinių miežių *in vitro* metodas, buvo veiksmingas – lėkštelė-lėkštelėje sistemoje susidariusioje uždaroje aplinkoje miežių daigai patyrė grybų išskiriamų lakiųjų medžiagų poveikį.

Atlikus pagrindinių ir šoninių šaknų skaičiavimus matyti, jog *E. nigrum*, *C. fastigiata*, *P. cucumerina* ir *C. fumosorosea* turėjo įtakos šaknų skaičiaus didėjimui. Didžiausias pagrindinių šaknų skaičius stebėtas miežių veiktų *C. fumosorosea* LOJ. Šoninių šaknų skaičius *C. fastigiata* variante buvo 1,6 karto didesnis lyginant su kontrole. *C. funicola* neigiamai veikė šoninių šaknų augimą (3.3 pav. A).

Lyginant su kontrolėmis reikšmingai didėjo *E. nigrum*, *C. fastigiata*, *P. cucumerina* ir *C. fumosorosea* LOJ veiktų miežių šakniaplaukių skaičius (3.3 pav. B). Po 7 dienų auginimo didžiausias šakniaplaukių kiekis stebėtas miežiuose, veiktuose *C. fumosorosea* LOJ, kuris buvo 2,24 kartų didesnis lyginant su kontrole. Taip pat stebėtos ir atvirkščias LOJ poveikis – *M. bolleyi* ir *C. funicola* LOJ pasižymėjo neigiamu poveikiu miežių šakniaplaukių augimui (3.3 pav. B) (3.4 pav.).



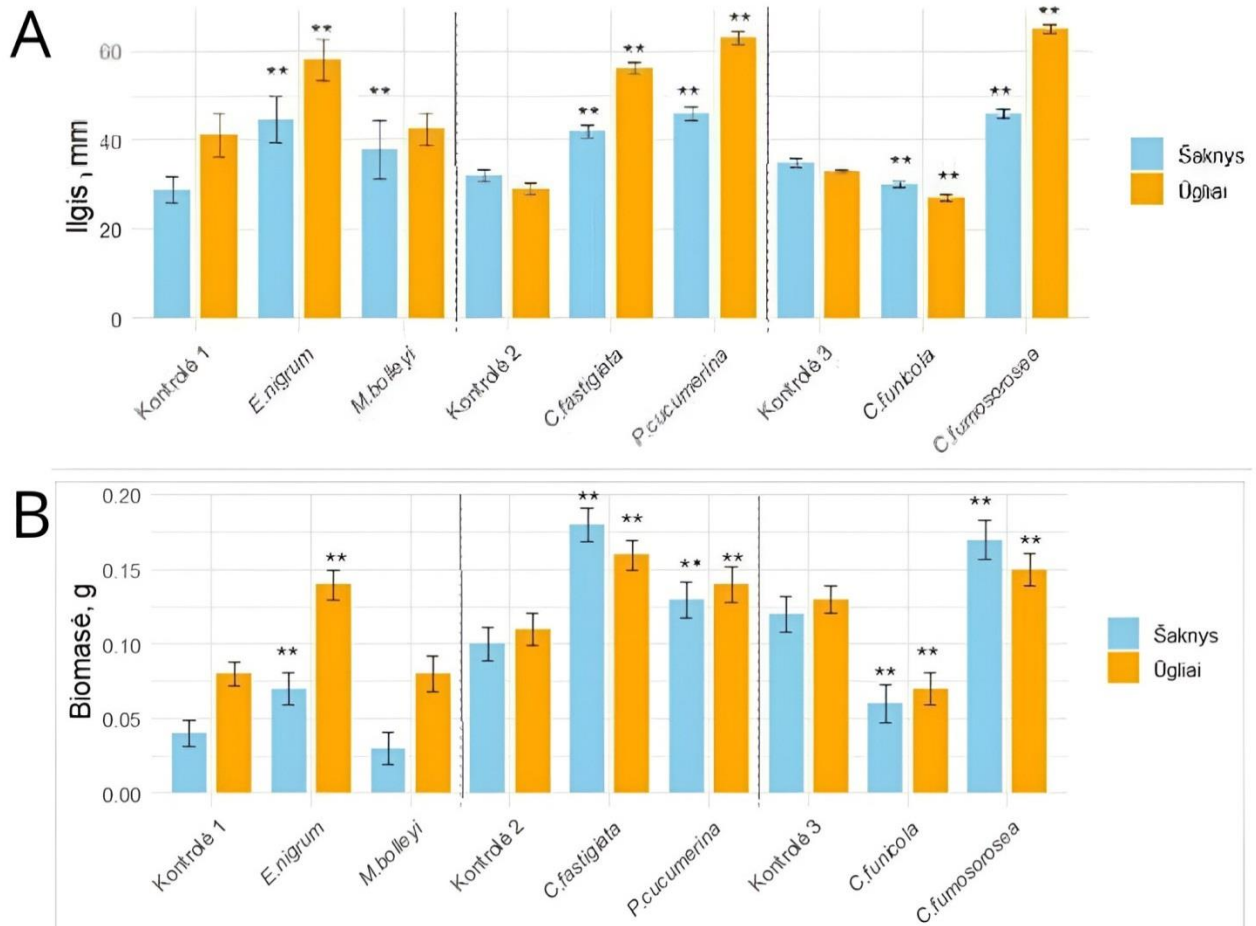
3.3 pav. Miežių vystymasis, veikiant *E. nigrum*, *M. bolleyi*, *C. fastigiata*, *P. cucumerina*, *C. fumosorosea* ir *C. funicola* lakiaisiais organiniais junginiais lėkštelė-lėkštelėje eksperimente (trys eksperimento serijos atskirtos punktyrinėmis linijomis): **(A)** poveikis pagrindinių ir šoninių šaknų skaičiui; **(B)** poveikis šakniaplaukių skaičiui 5, 6 ir 7 dienomis 0,5 mm² plote. „*“ ir „**“ atitinkamai rodo reikšmingus skirtumus ($p < 0,05$) ir labai reikšmingus skirtumus ($p < 0,01$) tarp atitinkamos kontrolės ir veikimo variantų. Mastelio juosta: (C) = 0,1 mm.



3.4 pav. Miežių šakniaplaukiai po 7 dienų daiginimo *in vitro*. Mastelio juosta 0,1 mm.

Atlikus šaknų ilgio ir ūglių aukščio matavimus, matyti, jog *E. nigrum*, *C. fastigiata*, *P. cucumerina* ir *C. fumosorosea* skatino ūglių ir šaknų augimą, o *C. funicola* atvirkščiai turėjo slopinantį poveikį (3.5 pav. A).

Atlikus svėrimus, nusatyta, kad didžiausia šaknų biomasė buvo miežių, paveiktų *C. fastigiata* ir *C. fumosorosea* LOJ, atitinkamai 0,18 g ir 0,17 g, palyginti su kontrolėmis – 0,1 g ir 0,12 g. (3.5 pav. B). Tuo tarpu kai kurių kitų rūšių poveikis buvo slopinantis – mažiausia šaknų biomasė nustatyta *M. bolleyi* ir *C. funicola* variantuose – atitinkamai 0,03 g ir 0,06 g. Įvertinus ūglių biomasę, *C. funicola* biomasė taip buvo mažiausia – 0,07 g, t. y. dvigubai mažiau nei kontrolėje. Didžiausią augimą skatinantį poveikį ūglių biomasės atžvilgiu turėjo *E. nigrum*, *C. fastigiata* ir *C. fumosorosea* LOJ – miežių ūglių biomasė atitinkamai siekė 0,14 g, 0,16 g ir 0,15 g, o tai sudarė iki 100 % prieaugio, lyginant su kontrole (3.5 pav. B).



3.5 pav. Miežių vystymasis, veikiant *E. nigrum*, *M. bolleyi*, *C. fastigiata*, *P. cucumerina*, *C. fumosorosea* ir *C. funicola* lakiaisiais organiniais junginiais lėkštelė-lėkštelėje eksperimente (trys eksperimento serijos atskirtos punktyrinėmis linijomis): **(A)** poveikis šaknų ir ūglių ilgiams; **(B)** poveikis šaknų ir ūglių biomasei po 12 dienų auginimo. „*“ ir „**“ atitinkamai rodo reikšmingus skirtumus ($p < 0,05$) ir labai reikšmingus skirtumus ($p < 0,01$) tarp atitinkamos kontrolės ir veikimo variantų.

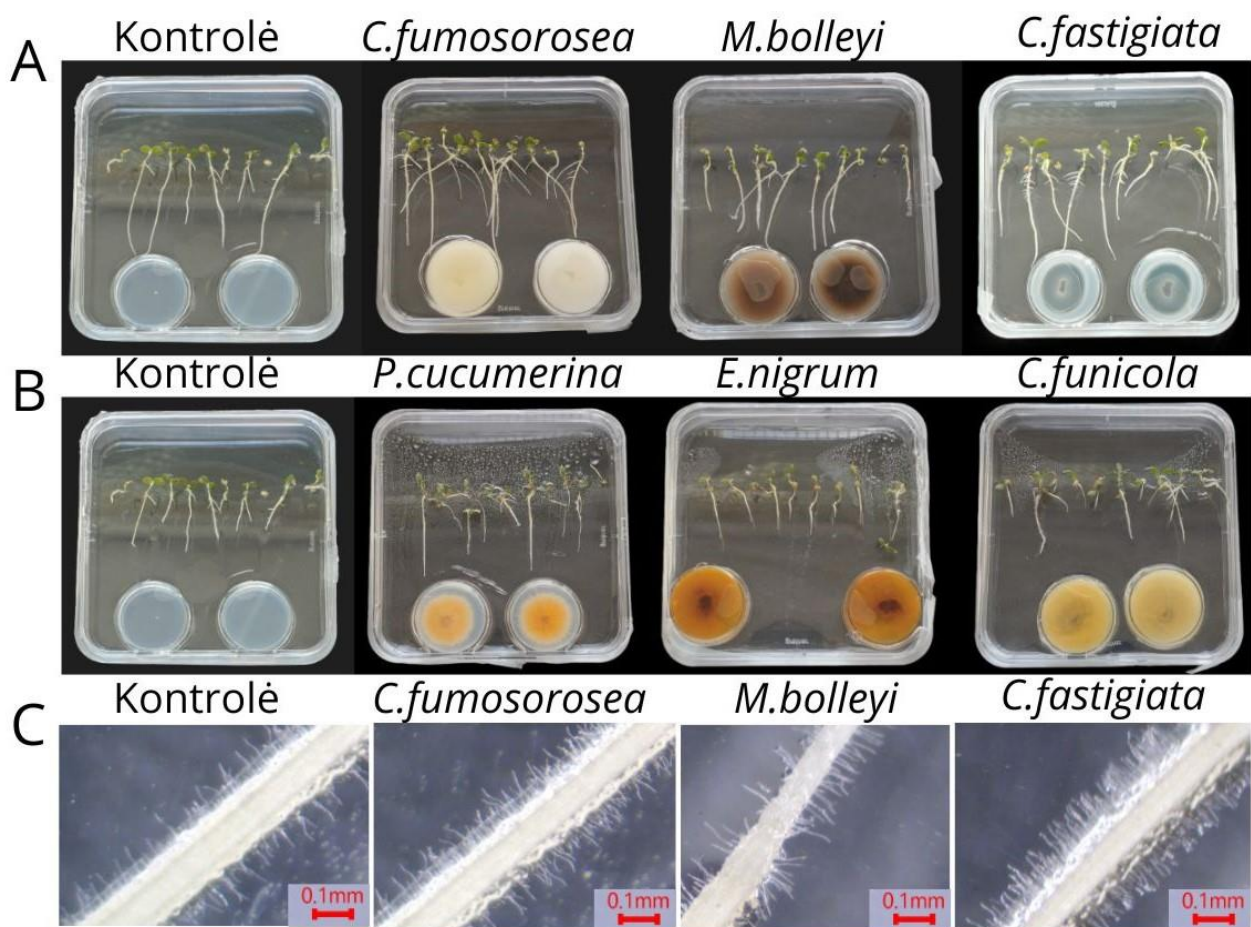
3.3. Endofitinių grybų LOJ poveikis raudoniesiems dobilams ‘Arimaičiai’

Daugiausiai grybų LOJ poveikis literatūroje ištirtas Poaceae šeimos atsovams, tokiems kaip kviečiai, ryžiai ir kukurūzai (Piesik et al., 2022; Chen et al., 2024; Peng et al., 2025). Tuo tarpu tyrimų, susijusių su grybų LOJ poveikiu Fabaceae šeimai priklausančioms augalams, nėra daug. Šios sąveikos supratimas, padėtų pagerinti pasėlių derlių bei praplėsti žinias grybų LOJ sąveika su mažai tirtomis Fabacea šeimos rūšimis.

Siekiant išplėsti tyrimą ir geriau suprasti endofitinių grybų LOJ poveikį skirtingų augalų augimui buvo pasirinkti raudonieji dobilai. Dobilai priklauso pupinių (Fabaceae) šeimai ir yra daugiamečiai pašarinis augalas.

Raudonųjų dobilų 'Arimaičiai' augimui, veikiant endofitinių grybų lakiaisiais organiniais junginiais, buvo naudoti tie patys izoliatai, kaip ir miežiams. Pirmoje serijoje buvo naudojami *C. fumosorosea*, *M. bolleyi*, *C. fastigiata* (3.6 pav. A, C), antroje – *P. cucumerina*, *E. nigrum*, *C. funicola* (3.6 pav. B).

Po 7 dienų auginimo buvo įvertintas endofitinių grybų poveikis šakniaplaukių augimui, išmatuotas dobilų šaknų ilgis, po 12 dienų atlikti augalų svėrimai.



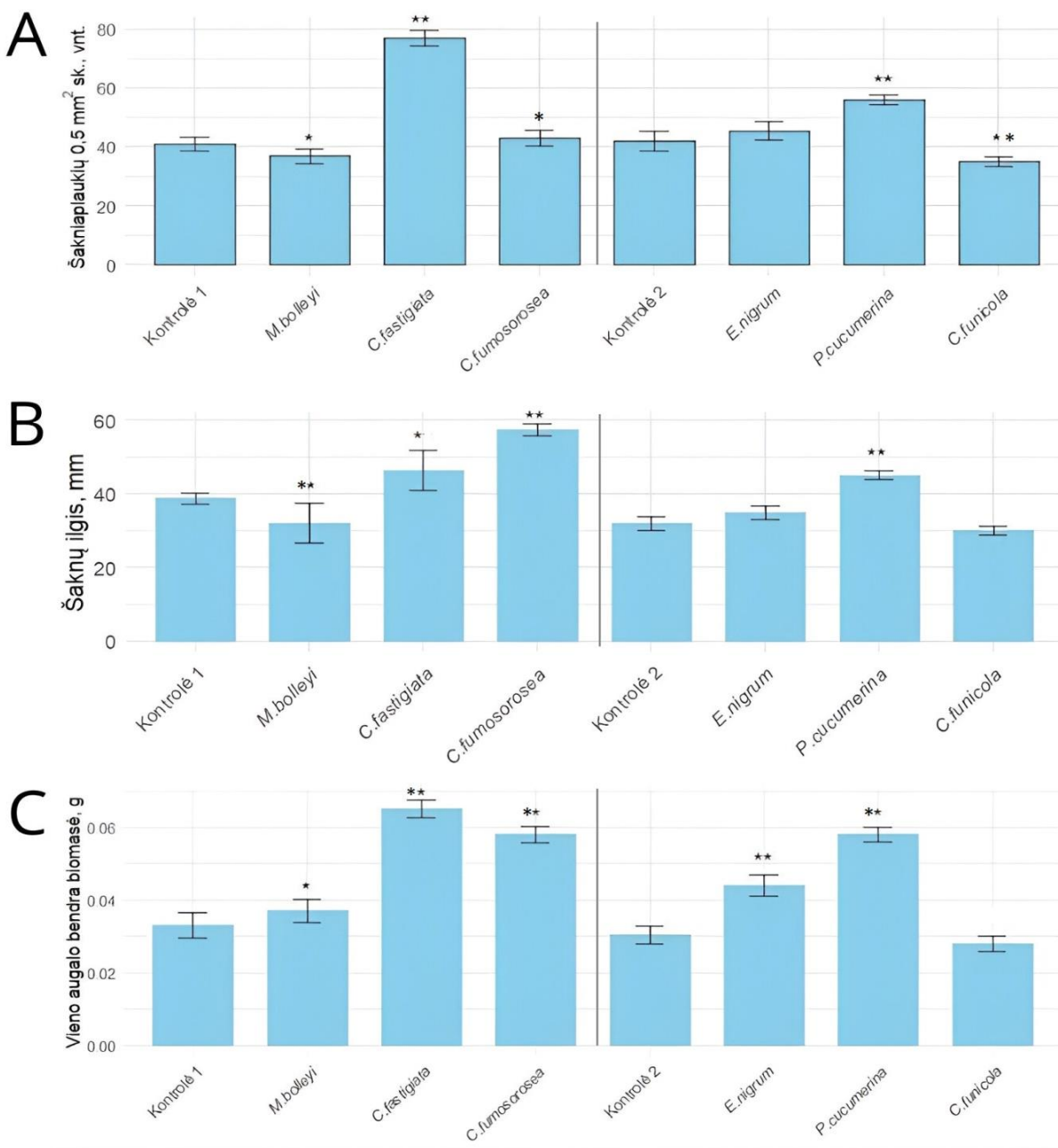
3.6 pav. Dobilų augalai po 7 dienų, auginti endofitinių grybų LOJ poveikyje lėkštelė-lėkštelėje eksperimente: (A) pirma serija, tiriamas *C. fumosorosea*, *M. bolleyi* ir *C. fastigiata* LOJ poveikis; (B) antra serija – *P. cucumerina*, *E. nigrum* ir *C. funicola*; (C) dobilų šakniaplaukiai po 7 dienų daiginimo *in vitro*. Mastelio juosta: (C) = 0,1 mm.

Po 7 dienų auginimo *C. fastigiata* LOJ poveikį patyrę dobilai išsiskyrė didžiausiu šakniaplaukiu skaičiumi – 77 vnt. ($0,5 \text{ mm}^2$ plote), lyginant su kontrole – 41 vnt. *M. bolleyi* ir *C. funicola* pasižymėjo slopinančiu poveikiu šakniaplaukių augimui, atitinkamai 37 vnt. ir 35 vnt. (3.7 pav. A).

Lyginant dobilų šaknų ilgį, pastebėta, jog labiausiai šaknų ilgėjimą skatino *C. fumosorosea*, *C. fastigiata*, *P. cucumerina* – 57,36 mm, 46,38 mm ir 45 mm, palyginus su atitinkamomis kontrolėmis – 38,8 mm ir 32 mm. Priešingai, *M. bolleyi* LOJ pasižymėjo neigiamu poveikiu – vidutinis šaknų ilgis buvo 32,03 mm (3.7 pav. B).

Atlikus svėrimus, nustatyta, kad didžiausia bendra biomasė buvo dobilų veiktų *C. fastigiata*, *C. fumosorosea* ir *P. cucumerina* LOJ, atitinkamai 0,095 g, 0,088 g, 0,087 g, o tai sudarė iki 100 % prieaugio, lyginant su kontrole. *E. nigrum* LOJ taip pat pasižymėjo nežymiu skatinamuoju poveikiu

dobilų augimui – 0.044 g, lyginant su kontroliniu variantu – 0,030 g (3.7 pav. C).



3.7 pav. Dobilų vystymasis, veikiant *E. nigrum*, *M. bolleyi*, *C. fastigiata*, *P. cucumerina*, *C. fumosorosea* ir *C. funicola* lakiaisiais organiniais junginiais lėkštelė-lėkštelėje eksperimente (dvi eksperimento serijos atskirtos punktyrine linija): **(A)** poveikis šakniaplaukių skaičiui 5, 6 ir 7 dienomis 0,5 mm² plote; **(B)** poveikis šaknų ilgiui; **(C)** poveikis bendrai augalo biomasei po 12 dienų auginimo. „*“ ir „**“ atitinkamai rodo reikšmingus skirtumus ($p < 0,05$) ir labai reikšmingus skirtumus ($p < 0,01$) tarp atitinkamų kontrolių ir veikimo variantų.

3.4. Endofitinių grybų išskiriamų LOJ pasiskirstymas (GC-MS analizė)

Mokslinėje literatūroje nurodoma, jog tarp išskiriamų grybų LOJ, tokie junginiai kaip seskviterpenai, gali reikšmingai pakeisti augalų šaknų architektūrą bei augimą (Ditengou et al., 2015). Panašus *Arabidopsis thaliana* augimą moduliuojantis LOJ poveikis buvo nagrinėjamas González-Pérez ir kt. (2018) darbe, kurio metu nustatyti 41 *Trichoderma* genties grybų išskiriami LOJ, daugiausiai seskviterpenai, kurie skatino augalo augimą ir vystymąsi. Nors per pastaruosius du dešimtmečius grybų ir augalų – šeiminkų sąveika buvo plačiai tiriama, LOJ vaidmuo reguliuojant ir skatinant augalų augimą reikalauja daugiau tyrimų.

Mūsų tyrime, LOJ junginių analizei pasirinkti trys edofitiniai grybai, kurių LOJ veikimas skatino miežių ir dobilų augimą (3.2 ir 3.3 skyriai). Dujų chromatografijos masių spektrometrijos (GC-MS) metodu atlikta LOJ analizė, ištirti 5 skirtingi mėginiai – *C. fastigiata*, *P. cucumerina* ir *P. fimeti* kolonijų mėginiai bei šių grybų bendras kolonijų mėginys (miksas) ir kontrolė. Iš viso nustatyta 51 skirtingas LOJ junginys, tarp kurių vyravo terpenai, alkanai ir alkoholiai. Išsiskyrė specifiniai biologiškai aktyvūs junginiai. Šie LOJ, ypač monoterpenai, įvairiais būdais teigiamai veikia augalų šaknų augimą. Jų veikimas apima auksino transportavimo moduliavimą, maistinių medžiagų įsisavinimo didinimą ir turi įtakos šaknų architektūrai.

P. cucumerina LOJ analizėje nustatyti junginiai daugiausiai seskviterpenai (4 junginiai) ir alkanai (3 junginiai). Įtakos augalų augimo skatinimui galėjo turėti monoterpenai (pvz., borneol) ir seskviterpenai (pvz., trans-caryophyllene, α -copaene, β -copaene, β -copaene, β -elemene). *C. fastigiata* variante aptikta daugiausiai LOJ – 25, tarp kurių vyravo seskviterpenai (18 junginių). Tokie junginiai kaip germacrene D, α -humulene ir cadinene derivatives yra žinomi dėl gebėjimo skatinti augalų vystymąsi. Tarp *P. fimeti* LOJ daugiausiai vyravo alkanai – 5 junginiai (3.1 lentelė).

C. fastigiata ir *P. cucumerina* grybų LOJ, mūsų eksperimente, lėkštelė – lėkštelėje sistemoje, skatino miežių šakniaplaukių, šaknų ir ūglių augimą, didino biomasę bei stimuliavo dobilų šakniaplaukių gausėjimą ir biomasės prieaugį. Reikalingi tolesni tyrimai, kad būtų galima konkrečiai nustatyti skirtingų LOJ poveikį ir įvardinti, kurie iš jų labiausiai daro įtaką augalų augimui. Verta paminėti, jog iš mūsų nustatytų *P. cucumerina* junginių, trans-caryophyllene aprašytas kaip turintis skatinamąjį poveikį *Brassica campestris* augimui (Yamagiwa et al., 2011). Mūsų rezultatai pabrėžia tai, kad endofitinių grybų, mūsų atveju – *C. fastigiata* ir *P. cucumerina*, išskiriamų LOJ svarba augalų augimui yra reikšminga ir iki šiol nėra pakankamai ištirta.

3.1 lentelė. *C. fastigiata*, *P. cucumerina* ir *P. fimeti* endofitinių grybų išskiriamų lakiųjų organinių junginių (LOJ) pasiskirtymas.

Table 1: Chemical composition of Plectrosporella cucumerina, Cadophora fastigiata, and Paraphoma finetti (Left Column)

	<i>Plectrosporella cucumerina</i>	<i>Cadophora fastigiata</i>	<i>Paraphoma finetti</i>	Määritys	Kontrolli
Carbon dioxide					
Cyclobutanol (Alcohol)					
Hexane (Alkane)					
2-Methyl-1-propanol (Alcohol)					
Tetrachloromethane (Chlorinated hydrocarbon)					
Heptane (Alkane)					
3-Methylbutanenitrile (Nitrile)					
2-Methyl-1-butanol (Alcohol)					
Toluene (Aromatic hydrocarbon)					
3-Methyl-1-butanol (Alcohol)					
1-Octene (Alkene)					
Octane (Alkane)					
Hexanal (Aldehyde)					
Ethylbenzene (Aromatic hydrocarbon)					
para-Xylene (Aromatic hydrocarbon)					
Styrene (Aromatic hydrocarbon)					
Nitropentane (Nitroalkane)					
Cumene (Aromatic hydrocarbon)					
α -Pinene (Monoterpene)					

Table 2: Chemical composition of Plectrosporella cucumerina, Cadophora fastigiata, and Paraphoma finetti (Right Column)

	<i>Plectrosporella cucumerina</i>	<i>Cadophora fastigiata</i>	<i>Paraphoma finetti</i>	Määritys	Kontrolli
β -Pinene (Monoterpene)					
3- δ -Carene (Monoterpene)					
Limonene (Monoterpene)					
Isopentyl 2-methylbutanoate (Ester)					
Borneol (Oxygenated monoterpene)					
Dodecane (Alkane)					
Tridecane (Alkane)					
α -Cubebene (Sesquiterpene)					
α -Ylangene (Sesquiterpene)					
α -Copaene (Sesquiterpene)					
para-But-(1E)-enyl Anisole (Ether)					
β -Elemene (Sesquiterpene)					
β -Cubebene + Sativene (Sesquiterpene)					
Tetradecane (Alkane)					

Table 3: Chemical composition of Plectrosporella cucumerina, Cadophora fastigiata, and Paraphoma finetti (Left Column)

	<i>Plectrosporella cucumerina</i>	<i>Cadophora fastigiata</i>	<i>Paraphoma finetti</i>	Määritys	Kontrolli
α -Gurjunene (Sesquiterpene)					
trans-Caryophyllene (Sesquiterpene)					
β -Copaene (Sesquiterpene)					
Aromadendrene (Sesquiterpene)					
cis-Muurola-3,5-diene (Sesquiterpene)					
trans-Muurola-3,5-diene (Sesquiterpene)					
α -Humulene (Sesquiterpene)					
Alloaromadendrene (Sesquiterpene)					
cis-Muurola-4(14),5-diene (Sesquiterpene)					
β -Acoradiene (Sesquiterpene)					
γ -Muurolene (Sesquiterpene)					
Germacrene D (Sesquiterpene)					
β -Selinene (Sesquiterpene)					
α -Muurolene (Sesquiterpene)					

Table 4: Chemical composition of Plectrosporella cucumerina, Cadophora fastigiata, and Paraphoma finetti (Right Column)

	<i>Plectrosporella cucumerina</i>	<i>Cadophora fastigiata</i>	<i>Paraphoma finetti</i>	Määritys	Kontrolli
γ -Cadinene (Sesquiterpene)					
δ -Cadinene (Sesquiterpene)					
Zonarene (Sesquiterpene)					
trans-Cadina-1,4-diene (Sesquiterpene)					

3.5. Endofitinių grybų inokuliacijos poveikis vasariniams miežiams ‘Gunda DS’

Ankstesnių tyrimų rezultatai parodė, kad inokuliacija tokiais grybais kaip *Cordyceps fumosorosea* reikšmingai didina baklažanų (*Solanum melongena*) šaknų ir ūglių augimą (Sun et al., 2020b), o *Microdochium bolleyi* gerina miežių (*Hordeum vulgare* L.) augimą, esant stresinėms sąlygoms (Shadmani et al., 2021).

Siekiant nustatyti endofitinių grybų poveikį augalų augimui buvo išbandyta sėklų inokuliacija grybų sporų suspensijomis, veikiant vasarinius miežius. Miežių privalumas eksperimentuojant su endofitinių grybų inokuliacija yra jų spartus augimas – užtenka 30 dienų augimo, kad būtų galima įvertinti pokyčius, tuo tarpu, pavyzdžiui, eksperimentuojant su daugiametėmis žolėmis toks bandymas užtruktų mažiausiai 6 mėnesius.

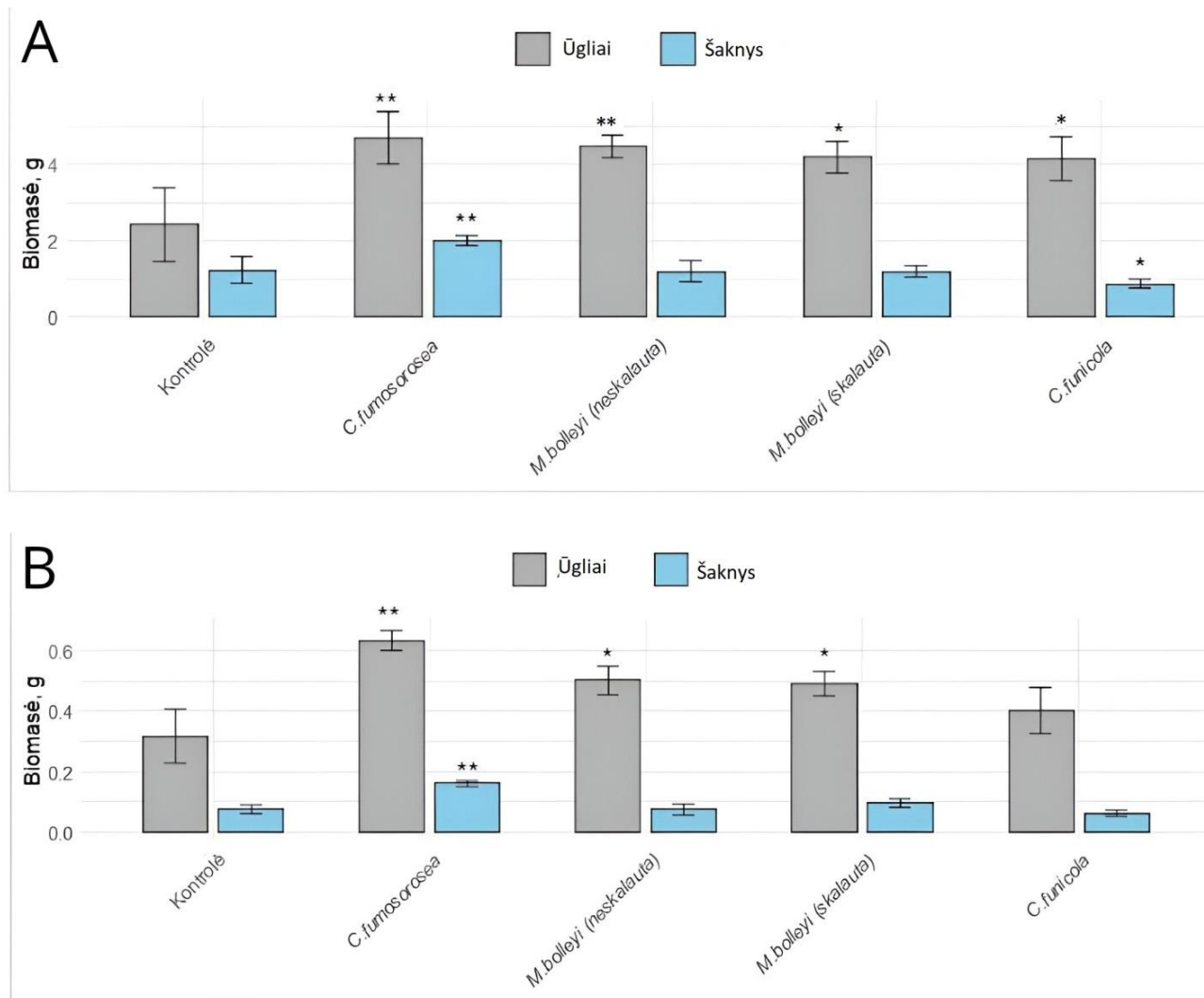
Ankstesniuose tyrimuose, mano bakalauro darbe, jau buvo tirta trijų mūsų gautų grybų rūšių – *Cadophora fastigiata*, *Plectosphaerella cucumerina* ir *Paraphoma fimeti* – inokuliacijos įtaka miežiams, o tyrimo rezultatai, kartu su bendraautoriais, buvo publikuoti moksliniame žurnale *Microorganisms* (Pašakinskienė et al., 2025).

Šiame tyrime eksperimentai su vasarinių miežių ‘Gunda DS’ sėklų inokuliacija buvo pratęsti įtraukiant iki šio nebandytas tris endofitinių grybų rūšis – *Microdochium bolleyi*, *Cordyceps fumosorosea* ir *Chaetomium funicola*. Po 30 dienų auginimo 28 vietų (6,5 x 6.5 cm) daigyklose šiltnamio sąlygomis, buvo įvertinta miežių ūglių ir šaknų šviežioji bei sausoji biomasė.

Inokuliavimas endofitinių grybų suspensijomis turėjo įtakos miežių biomasei. Lyginat su kontrole reikšmingai didėjo šaknų ir ūglių apimtis *C. fumosorosea* variante (3.8 pav.).



3.8 pav. Inokuliuoti endofitiniais grybais miežiai po 30 dienų auginimo šiltnamyje. *, „skalauta“ – sėklos skalautos vandeniu po inokuliacijos.



3.9 pav. Miežių, inokuliuotų skirtingų gybų suspensijomis biomasės pokyčiai: **(A)** šviežio augalo biomasė; **(B)** džiovinta augalo biomasė. „*“, „**“ ir „***“ atitinkamai rodo reikšmingus skirtumus ($p < 0,05$) ir labai reikšmingus skirtumus ($p < 0,01$) tarp kontrolės ir veikimo variantų.

Atlikus žalios masės svėrimus, nustatyta, kad didžiausia ūglių biomasė buvo miežių inokuliuotų *C. fumosorosea* ir *M. bolleyi* („neskalauta“ – sėklos neskaldytos vandeniui po inokuliacijos), atitinkamai 4,7 g ir 4,47 g (3.9 pav. A). Didžiausia išdžiovintų sausų ūglių biomasė taip pat buvo miežių inokuliuotų *C. fumosorosea* ir *M. bolleyi* (neskalauta), atitinkamai 0,63 g ir 0,50 g, lyginant su kontrolinių miežių ūglių biomasė, 0,32 g (3.9 pav. B).

Įvertinus šviežių šaknų biomasę, *C. fumosorosea* biomasė buvo didžiausia – 2,01 g (3.9 pav. A). Analogiški rezultatai pastebėti ir po džiovinimo – *C. fumosorosea* šaknų biomasė buvo 2,1 karto

didesnė, lyginant su kontrolinių neinokuliuotų miežių (3.9 pav. B). Tuo tarpu *C. funicola* inokuliacija darė neigiamą poveikį miežių šaknų augimui – šaknų biomasė siekė tik 0,89 g (3.9 pav. A).

3.6. Endofitinių grybų inokuliacijos poveikis paprastosioms alyvoms ‘Mme Lemoine’

Remiantis literatūros šaltiniais, paprastųjų alyvų inokuliacija endofitiniais grybais nebuvo atlikta, tačiau buvo tirta vynuogė (*Vitis vinifera*), kuri taip pat yra priskiriama sumedėjusiems augalams. *V. vinifera* inokuliacija *Beauveria bassiana* endofitiniais grybais atskleidė teigiamą poveikį vynuogės šaknų augimui (Mantzoukas et al., 2021).

Siekiant nustatyti endofitinių grybų poveikį sumedėjusių augalų augimui buvo išbandyta sporų suspensijų inokuliacija alyvoms (3.10 pav.). Alyvos yra dekoratyvinis sumedėjęs augalas, naudojamas kraštovaizdžio formavimui.

Inokuliacijai pasitelkti *P. cucumerina* ir *C. fastigiata* endofitiniai grybai, ankstesniuose mano kartu su bedrautoriais inokuliacijos tyrimuose su vasariniais miežiais ir gausiažiede svidre pasižymėję kaip turintys augimą skatinamąjį poveikį (Pašakinskienė et al., 2025).



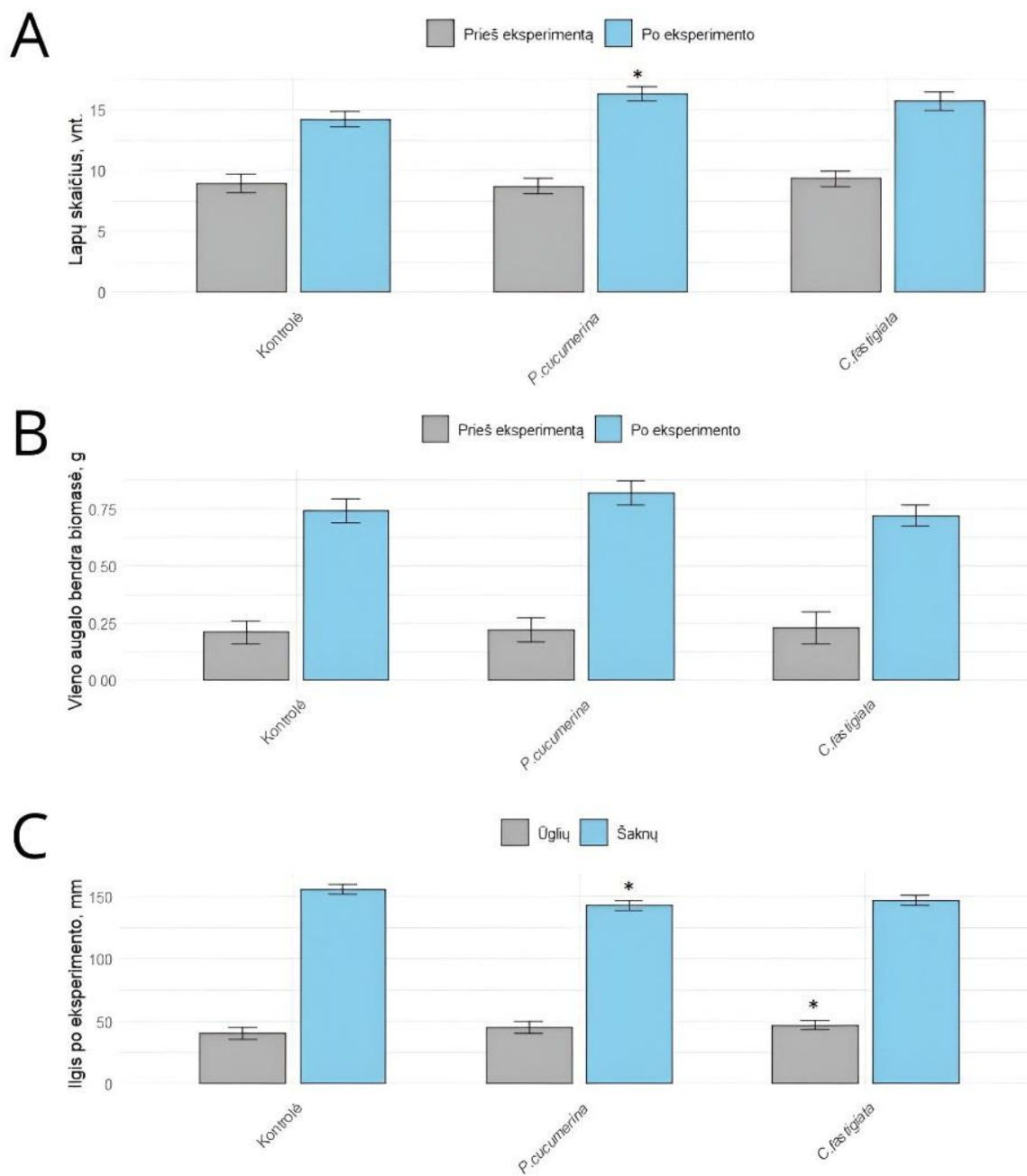
3.10 pav. Inokuliuotos endofitiniais grybais alyvos (*Syringa vulgaris*) ‘Mme Lemoine’ po 33 dienų auginimo šiltnamyje.

Po eksperimento vertinant lapų skaičių pastebėta, jog *P. cucumerina* turėjo skatinamąjį poveikį – 16 vnt., lyginant su kontrole – 14 vnt. (3.11 pav. A).

Atlikus svėrimus, nustatyta, kad *P. cucumerina* suspensija veiktų alyvų biomasė buvo didesnė nei kontrolės, atitinkamai 0,82 g ir 0,74 g, nors skirtumai nesiekia $p < 0,05$ patikimumo lygmens (3.11 pav. B).

Po 33 dienų alyvų auginimo šiltnamyje pastebėta, kad *C. fastigiata* skatino ūglių augimą, lyginant su kontrole, atitinkamai 46,83 mm, 40,11 mm. Tačiau šaknims tokio poveikio negauta, didžiausią šaknų ilgį turėjo kontrolinės alyvos – 155,83 mm (3.11 pav. C).

Apskritai, endofitinių grybų suspensijos poveikis alyvoms nebuvo toks ryškus kaip eksperimente su vasariniais miežiais. Tikėtina, kad tai susiję su palyginti trumpa eksperimento trukme (33 dienos), kuri gali būti nepakankama sumedėjusiems augalams, tokiems kaip alyvos. Siekiant tiksliau įvertinti poveikį, būtini ilgesnės trukmės (2–3 mėnesių) tyrimai, į kuriuos būtų įtrauktos skirtingos alyvų veislės, nes atsakas gali priklausyti ir nuo genetinių veislės ypatybių.



3.11 pav. Alyvų augimo, veikiant *P. cucumerina* ir *C. fastigiata* suspensijomis, pokyčiai: **(A)** lapų skaičius; **(B)** vieno augalo bendra biomasė; **(C)** ūglių ir šaknų ilgiai po eksperimento. „*“ rodo reikšmingus skirtumus ($p < 0,05$) tarp kontrolės ir veikimo variantų.

IŠVADOS

1. Lakiųjų organinių junginių (LOJ) poveikio *in vitro* tyrime, keturi iš šešių išbandytų žolinių augalų šaknų endofitų – *Cadophora fastigiata*, *Cordyceps fumosorosea*, *Epicoccum nigrum* ir *Plectosphaerella cucumerina* – parodė saktinamąjį poveikį vasarinių miežių (Poaceae) šaknų, šakniaplaukių ir ūglių augimui.
2. LOJ *in vitro* tyrimas, kuriame raudonieji dobilai buvo naudojami kaip modelinė pupinių (Fabaceae) šeimos rūšis, taip pat parodė teigiamą *Cadophora fastigiata*, *Cordyceps fumosorosea* ir *Plectosphaerella cucumerina* išskiriamų LOJ poveikį šaknų, šakniaplaukių formavimuisi bei bendram augalo augimui.
3. Įvertinus vasarinių miežių ir raudonųjų dobilų šakniaplaukių skaičių, nustatyta, kad *Microdochium bolleyi* ir *Chaetomium funicola* išskiriamos lakiosios organinės medžiagos (LOJ) darė neigiamą poveikį šakniaplaukių formavimuisi. Taip pat *C. funicola* pasižymėjo šaknų augimą slopinančiu poveikiu ir miežių sėklų inokuliacijos eksperimento metu.
4. Dujų chromatografijos–masių spektrometrijos (GC-MS) analizė parodė, kad *Plectosphaerella cucumerina*, *Cadophora fastigiata* ir *Paraphoma fimeti* grybų išskiriamose LOJ dominuoja specifiniai biologiškai aktyvūs junginiai, daugiausia terpenai ir alkanai, kurie gali veikti kaip augalų augimo stimulatoriai.
5. Vasarinių miežių sėklų ir paprastųjų alyvų sodinukų inokuliacijos tyrimas, atskleidė grybų inokuliatų skatinamąjį poveikį augimui: *Cordyceps fumosorosea* – miežių šaknims ir ūgliams bei *Cadophora fastigiata* – alyvų ūgliams.

ASMENINIO INDELIO APRAŠYMAS

Tyrimo idėja buvo pateikta prof. habil. dr. Izoldos Pašakinskienės. Tyrimo metodika parinkta prof. habil. dr. Izoldos Pašakinskienės, Saulės Matijošiūtės. Eksperimentai, duomenų analizė, vizualizacija bei literatūros apžvalga buvo atlikta Saulės Matijošiūtės, padedant ir konsultuojantis su prof. habil. dr. Izolda Pašakinskiene, dokt. Violeta Stakeliene. Darbo vadovė, prof. habil. dr. Izolda Pašakinskienė daug prisidėjo prie darbo redagavimo ir peržiūros, rezultatų dalies analizės ir išvadų tobulinimo bei papildymo.

PADĖKA

Tyrimai finansuoti Vilniaus Universiteto Botanikos sodo bei Lietuvos mokslo tarybos biudžeto lėšomis.

Nuoširdžiai dėkoju savo darbo vadovei prof. habil. dr. Izoldai Pašakinskienei už skirtą laiką, vertintgas žinias ir sklandų bendradarbiavimą rašant magistrinį darbą. Taip pat dėkoju dokt. V. Stakelienei, J. Martūnui, M. Rimkevičiui už pagalbą, žinias bei palaikymą atliekant tyrimus. Dėkoju Dr. Jurgai Būdienei iš GTC už galimybę pasinaudoti dujų chromatografijos-masių spektrometrijos įranga ir suteiktą metodinę pagalbą.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Saulė Matijošiūtė

Magistro baigiamasis darbas

**ASCOMYCOTA ŠAKNŲ ENDOFITŲ IŠSKIRIAMŲ LAKIŲJŲ
ORGANINIŲ JUNGINIŲ (LOJ) IR SPORŲ INOKULIACIJOS
SKATINAMASIS POVEIKIS AUGALŲ AUGIMUI**

SANTRAUKA

Endofitiniai grybai geba kolonizuoti vidinius augalo audinius ir yra žinomi dėl savo potencialo produkuoti biologiškai aktyvius lakiuosius organinius junginius (LOJ). Endofitų išskiriami LOJ dalyvauja augalo fiziologiniuose procesuose. LOJ poveikyje stebimas šaknų ir ūglių augimo padidėjimas, augalo architektūros pokyčiai, taip yra žinoma, kad jie suteikia atsparumo abiotiniam ir biotiniam stresui. Dėl savo sugebėjimo skatinti augalų šaknų bei ūglių vystymąsi, endofitų ir jų produkuojamų LOJ augalų augimo skatinimui leistų sumažinti cheminių trąšų daromą žalą aplinkai. Endofitiniai grybai bei jų metabolitai yra tiriami jau ne vieną dešimtmetį, tačiau vis dar trūksta informacijos apie jų ypatybes ir daroma įtaką augalo augimui.

Šiame darbe buvo siekiama išbandyti *in vitro* būdą, pasinaudojant vasariniais miežiais ir dobilus kaip modelinėmis rūšimis ir nustatyti endofitinių grybų išskiriamų lakiųjų organinių junginių daromą įtaką šaknų, ūglių ir šakniaplaukių augimui bei galimas sąsajas su produkuojamais antriniais metabolitais. Taip pat buvo siekiama įvertinti grybų suspensijos poveikį alyvų šaknų bei ūglių augimui bei sėklų inokuliacijos daromą įtaką miežių augimui. Šiame tyrime buvo išbandytos 6 skirtingos endofitinių grybų rūšys, priklausančios aukšliagrybūnams (Ascomycota), aptiktos žolinių augalų šaknyse – *Epicoccum nigrum*, *Microdochium bolleyi*, *Plectosphaerella cucumerina*, *Cadophora fastigiata*, *Cordyceps fumosorosea*, *Chaetomium funicola*.

Išbandytas *in vitro* lėkštelė-lėkštelėje būdas buvo veiksmingas – sistemoje susidariusioje uždaroje aplinkoje miežių daigai patyrė grybų išskiriamų lakiųjų medžiagų poveikį. *Epicoccum nigrum*, *Plectosphaerella cucumerina* ir *Cadophora fastigiata*, *Cordyceps fumosorosea* grybų išskiriami LOJ turėjo teigiamą poveikį miežių šaknų ir šakniaplaukių augimui. *Cadophora fastigiata*, *Cordyceps fumosorosea* ir *Plectosphaerella cucumerina* LOJ skatino raudonųjų dobilų šaknų ilgėjimą bei biomasės prieaugį. Lyginant su kontrole, *Cadophora fastigiata* poveikyje dobilų šakniaplaukių buvo 1,88 kartus daugiau. Dujų chromatografijos masių spektrometrijos (GC-MS) metodu nustatyti *Plectosphaerella cucumerina* ir *Cadophora fastigiata* grybų LOJ iš viso nustatytas 51 skirtingas LOJ junginys, tarp jų – terpenai ir alkanai, literatūroje žinomi kaip turintys skatinamąjį poveikį augalų augimui.

Išbandyta inokuliacija, veikiant sėklas grybų sporų suspensijomis, atskleidė teigiamą *Cordyceps fumosorosea* grybo inokulianto poveikį vasarinių miežių augimui. *Cadophora fastigiata* inokuliatas skatino alyvų ūglių vystymąsi, o *Plectosphaerella cucumerina* lėmė spartesnį lapų augimą. Darbe gauti rezultatai leidžia numatyti tolesnių tyrimų kryptis gilinant ir plečiant žinias apie Ascomycota endofitinių grybų daromą įtaką augalų augimui.

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCES CENTER

Saulė Matijošiūtė

Master thesis

**THE ASCOMYCOTA ROOT ENDOPHYTES GROWTH-
PROMOTING EFFECT OF VOLATILE ORGANIC
COMPOUNDS (VOCs) AND SPORE INOCULATION ON PLANT
GROWTH**

SUMMARY

Endophytic fungi are able to colonize the internal tissues of plants and are known for their potential to produce biologically active volatile organic compounds (VOCs). VOCs secreted by endophytes participate in plant physiological processes. Increased root and shoot growth, changes in plant architecture are observed under the influence of VOCs, and they are also known to provide resistance to abiotic and biotic stress. Due to their ability to promote the development of plant roots and shoots, endophytes and the VOCs they produce could reduce the environmental damage caused by chemical fertilizers by promoting plant growth. Endophytic fungi and their metabolites have been studied for several decades, but there is still a lack of information about their properties and the impact they have on plant growth.

The aim of this work was to test an *in vitro* method using spring barley and clover as model species and to determine the effect of volatile organic compounds released by endophytic fungi on the growth of roots, shoots and root hairs and possible links with the secondary metabolites produced. The aim was also to evaluate the effect of fungal suspension on the growth of olive roots and shoots and the effect of seed inoculation on barley growth. In this study, 6 different endophytic fungal species belonging to the phylum Ascomycota, found in the roots of herbaceous plants, were tested – *Epicoccum*

nigrum, *Microdochium bolleyi*, *Plectosphaerella cucumerina*, *Cadophora fastigiata*, *Cordyceps fumosorosea*, *Chaetomium funicola*.

The tested *in vitro* plate-in-plate method was effective – in the closed environment created in the system, barley seedlings were exposed to volatile substances released by the fungi. VOCs released by *Epicoccum nigrum*, *Plectosphaerella cucumerina* and *Cadophora fastigiata*, *Cordyceps fumosorosea* fungi had a positive effect on the growth of barley roots and root hairs. VOCs from *Cadophora fastigiata*, *Cordyceps fumosorosea* and *Plectosphaerella cucumerina* promoted the elongation of red clover roots and biomass growth. Compared to the control, clover root hairs were 1.88 times more under the influence of *Cadophora fastigiata*. A total of 51 different VOC compounds were identified in the VOCs of *Plectosphaerella cucumerina* and *Cadophora fastigiata* fungi using the gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method, including terpenes and alkanes, known in the literature to have a stimulating effect on plant growth.

Tested inoculation by exposing seeds to suspensions of fungal spores revealed a positive effect of the *Cordyceps fumosorosea* fungus inoculum on the growth of spring barley. *Cadophora fastigiata* inoculum promoted olive shoot development, while *Plectosphaerella cucumerina* led to faster leaf growth. The results obtained in the work allow us to predict further research directions in deepening and expanding knowledge about the influence of Ascomycota endophytic fungi on plant growth.

LITERATŪROS ŠALTINIAI

1. Abdelaziz, M. E., Abdelsattar, M., Abdeldaym, E. A., Atia, M. A. M., Mahmoud, A. W. M., Saad, M. M., & Hirt, H. (2019). *Piriformospora indica* alters Na⁺/K⁺ homeostasis, antioxidant enzymes and *LeNHX1* expression of greenhouse tomato grown under salt stress. *Scientia Horticulturae*, 256, 108532. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.05.059>
2. Adedayo, A. A., & Babalola, O. O. (2023). Fungi That Promote Plant Growth in the Rhizosphere Boost Crop Growth. *Journal of Fungi*, 9(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/jof9020239>
3. Airin, A. A., Arafat, M. I., Begum, R. A., Islam, M. R., & Seraj, Z. I. (2023). Plant growth-promoting endophytic fungi of the wild halophytic rice *Oryza coarctata*. *Annals of Microbiology*, 73(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s13213-023-01738-3>
4. Aly, A. H., Debbab, A., & Proksch, P. (2011). Fungal endophytes: Unique plant inhabitants with great promises. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(6), 1829–1845. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3270-y>
5. Antil, S., Abraham, J. S., Sripoorna, S., Maurya, S., Dagar, J., Makhija, S., Bhagat, P., Gupta, R., Sood, U., Lal, R., & Toteja, R. (2023). DNA barcoding, an effective tool for species identification: A review. *Molecular Biology Reports*, 50(1), 761–775. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-08015-7>
6. Arnold, A. E., Mejía, L. C., Kylo, D., Rojas, E. I., Maynard, Z., Robbins, N., & Herre, E. A. (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(26), 15649–15654. <https://doi.org/10.1073/pnas.2533483100>
7. Arnold, A. E. (2007a). Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: Progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews*, 21(2), 51–66. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.05.003>
8. Arnold, A. E., & Lutzoni, F. (2007b). Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology*, 88(3), 541–549. <https://doi.org/10.1890/05-1459>
9. Arora, N. K., & Mishra, J. (2016). Prospecting the roles of metabolites and additives in future bioformulations for sustainable agriculture. *Applied Soil Ecology*, 107, 405–407. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.05.020>
10. Avin. (2019). (PDF) Easy way to count spores and prepare spore suspension by Hemocytometer. ResearchGate. https://www.researchgate.net/publication/337772212_Easy_way_to_count_spores_and_prepare_spore_suspension_by_Hemocytometer

11. Azuddin, N. F., Mohamad Noor Azmy, M. S., & Zakaria, L. (2023). Molecular identification of endophytic fungi in lawn grass (*Axonopus compressus*) and their pathogenic ability. *Scientific Reports*, 13(1), 4239. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31291-7>
12. Backes, A., Guerriero, G., Ait Barka, E., & Jacquard, C. (2021). *Pyrenophora teres*: Taxonomy, Morphology, Interaction With Barley, and Mode of Control. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.614951>
13. Baik, B.-K., & Ullrich, S. E. (2008). Barley for food: Characteristics, improvement, and renewed interest. *Journal of Cereal Science*, 48(2), 233–242. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2008.02.002>
14. Barbosa, F., H.A. R., & L.F.P. S. (2012). Three *Chaetomium* species (Chaetomiaceae, Ascomycota) from the semi-arid region of Brazil. *Sitientibus Série Ciências Biológicas*, 12, 115–118.
15. Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., & Kausrud, H. (2010). ITS as an environmental DNA barcode for fungi: An in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology*, 10(1), 189. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-189>
16. Bennett, M. D., & Smith, J. B. (1976). Nuclear dna amounts in angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 274(933), 227–274. <https://doi.org/10.1098/rstb.1976.0044>
17. Blackwell, M. (2011). The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany*, 98(3), 426–438. <https://doi.org/10.3732/ajb.1000298>
18. Blanchette, R. A., Held, B. W., Hellmann, L., Millman, L., & Buntgen, U. (2016). Arctic driftwood reveals unexpectedly rich fungal diversity. *Fungal Ecology*, 23, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2016.06.001>
19. Boerema, G., Gruyter, J., Noordeloos, M., & Hamers, M. (2004). *A Phoma sect. Phoma*. (pp. 32–118). <https://doi.org/10.1079/9780851997438.0032>
20. Bowley, S. R., Taylor, N. L., & Dougherty, C. T. (1984). Physiology and Morphology of Red Clover. In N. C. Brady (Ed.), *Advances in Agronomy* (Vol. 37, pp. 317–347). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60457-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60457-5)
21. Brader, G., Compant, S., Mitter, B., Trognitz, F., & Sessitsch, A. (2014). Metabolic potential of endophytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 27, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.09.012>
22. Braga, R. M., Padilla, G., & Araújo, W. L. (2018). The biotechnological potential of *Epicoccum* spp.: Diversity of secondary metabolites. *Critical Reviews in Microbiology*, 44(6), 759–778. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2018.1514364>

23. Campos, M. L., Kang, J.-H., & Howe, G. A. (2014). Jasmonate-triggered plant immunity. *Journal of Chemical Ecology*, 40(7), 657–675. <https://doi.org/10.1007/s10886-014-0468-3>
24. Cao, S., Liang, Q. W., Nzabanita, C., & Li, Y. Z. (2020). Paraphoma root rot of alfalfa (*Medicago sativa*) in Inner Mongolia, China. *Plant Pathology*, 69(2), 231–239. <https://doi.org/10.1111/ppa.13131>
25. Carlucci, A., Raimondo, M. L., Santos, J., & Phillips, A. J. L. (2012). Plectosphaerella species associated with root and collar rots of horticultural crops in southern Italy. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 28, 34–48. <https://doi.org/10.3767/003158512X638251>
26. Carroll, G. (1988). Fungal Endophytes in Stems and Leaves: From Latent Pathogen to Mutualistic Symbiont. *Ecology*, 69(1), 2–9. <https://doi.org/10.2307/1943154>
27. Chagas, M. B. de O., Prazeres dos Santos, I., Nascimento da Silva, L. C., Correia, M. T. dos S., Magali de Araújo, J., Cavalcanti, M. da S., & Lima, V. L. de M. (2017). Antimicrobial Activity of Cultivable Endophytic Fungi Associated with *Hancornia Speciosa* Gomes Bark. *The Open Microbiology Journal*, 11, 179–188. <https://doi.org/10.2174/1874285801711010179>
28. Chen, H., Xu, J., Shao, D., Zhao, C., Xu, X., Xu, X., & Chen, C. (2024). Growth Promotion of Rice and *Arabidopsis thaliana* by Volatile Organic Compounds Produced by Endophytic *Clonostachys* Species. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 10(11), 754. <https://doi.org/10.3390/jof10110754>
29. Clay, K. (1988). Fungal Endophytes of Grasses: A Defensive Mutualism between Plants and Fungi. *Ecology*, 69(1), 10–16. <https://doi.org/10.2307/1943155>
30. Clay, K., & Schardl, C. (2002). Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *The American Naturalist*, 160 Suppl 4, S99–S127. <https://doi.org/10.1086/342161>
31. Coelho, M. A., Bakkeren, G., Sun, S., Hood, M. E., & Giraud, T. (2017). Fungal Sex: The Basidiomycota. *Microbiology Spectrum*, 5(3), 10.1128/microbiolspec.funk-0046–2016. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0046-2016>
32. Das, S., Dash, H. R., Mangwani, N., Chakraborty, J., & Kumari, S. (2014). Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 103, 80–100. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.05.013>
33. Dash, C. K., Bamisile, B. S., Keppanan, R., Qasim, M., Lin, Y., Islam, S. U., Hussain, M., & Wang, L. (2018). *Endofitinaia entomopatogeniniaia grybai skatina Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae) augimą ir neigiamai veikia *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) vystymąsi ir dauginimąsi. *Microbial Pathogenesis*, 125, 385–392. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.09.044>

34. David, A. S., Haridas, S., LaButti, K., Lim, J., Lipzen, A., Wang, M., Barry, K., Grigoriev, I. V., Spatafora, J. W., & May, G. (2016a). Draft Genome Sequence of *Microdochium bolleyi*, a Dark Septate Fungal Endophyte of Beach Grass. *Genome Announcements*, 4(2), e00270-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00270-16>
35. David, A. S., Seabloom, E. W., & May, G. (2016b). Plant Host Species and Geographic Distance Affect the Structure of Aboveground Fungal Symbiont Communities, and Environmental Filtering Affects Belowground Communities in a Coastal Dune Ecosystem. *Microbial Ecology*, 71(4), 912–926. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0712-6>
36. David, A. S., Zarnetske, P. L., Hacker, S. D., Ruggiero, P., Biel, R. G., & Seabloom, E. W. (2015). Invasive congeners differ in successional impacts across space and time. *PloS One*, 10(2), e0117283. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117283>
37. de Carvalho, M. J. A., Amorim Jesuino, R. S., Daher, B. S., Silva-Pereira, I., de Freitas, S. M., Soares, C. M. A., & Felipe, M. S. S. (2003). Functional and genetic characterization of calmodulin from the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 39(3), 204–210. [https://doi.org/10.1016/s1087-1845\(03\)00044-6](https://doi.org/10.1016/s1087-1845(03)00044-6)
38. de Gruyter, J., Woudenberg, J. H. C., Aveskamp, M. M., Verkley, G. J. M., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2010). Systematic reappraisal of species in *Phoma* section *Paraphoma*, *Pyrenochaeta* and *Pleurophoma*. *Mycologia*, 102(5), 1066–1081. <https://doi.org/10.3852/09-240>
39. de Gruyter, J., Woudenberg, J. H. C., Aveskamp, M. M., Verkley, G. J. M., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2013). Redisposition of phoma-like anamorphs in Pleosporales. *Studies in Mycology*, 75(1), 1–36. <https://doi.org/10.3114/sim0004>
40. Delory, B. M., Delaplace, P., du Jardin, P., & Fauconnier, M.-L. (2016). Barley (*Hordeum distichon* L.) roots synthesise volatile aldehydes with a strong age-dependent pattern and release (E)-non-2-enal and (E,Z)-nona-2,6-dienal after mechanical injury. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB*, 104, 134–145. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.03.028>
41. Ditengou, F. A., Müller, A., Rosenkranz, M., Felten, J., Lasok, H., van Doorn, M. M., Legué, V., Palme, K., Schnitzler, J.-P., & Polle, A. (2015). Volatile signalling by sesquiterpenes from ectomycorrhizal fungi reprogrammes root architecture. *Nature Communications*, 6, 6279. <https://doi.org/10.1038/ncomms7279>
42. Dizkirici, A., & Kalmer İpek, A. (2019). Utility of various molecular markers in fungal identification and phylogeny. *Nova Hedwigia*, 109, 187–224. https://doi.org/10.1127/nova_hedwigia/2019/0528

43. Dluhošová, J., Ištváněk, J., Nedělník, J., & Řepková, J. (2018). Red Clover (*Trifolium pratense*) and Zigzag Clover (*T. medium*) – A Picture of Genomic Similarities and Differences. *Frontiers in Plant Science*, 9, 724. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00724>
44. Effmert, U., Kalderás, J., Warnke, R., & Piechulla, B. (2012). Volatile Mediated Interactions Between Bacteria and Fungi in the Soil. *Journal of Chemical Ecology*, 38(6), 665–703. <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0135-5>
45. Egidi, E., Delgado-Baquerizo, M., Plett, J. M., Wang, J., Eldridge, D. J., Bardgett, R. D., Maestre, F. T., & Singh, B. K. (2019). A few Ascomycota taxa dominate soil fungal communities worldwide. *Nature Communications*, 10(1), 2369. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10373-z>
46. Ellison, N. W., Liston, A., Steiner, J. J., Williams, W. M., & Taylor, N. L. (2006). Molecular phylogenetics of the clover genus (*Trifolium*—Leguminosae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 39(3), 688–705. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.01.004>
47. Estrada, C., Wcislo, W. T., & Van Bael, S. A. (2013). Symbiotic fungi alter plant chemistry that discourages leaf-cutting ants. *New Phytologist*, 198(1), 241–251. <https://doi.org/10.1111/nph.12140>
48. Faeth, S. H., Gardner, D. R., Hayes, C. J., Jani, A., Wittlinger, S. K., & Jones, T. A. (2006). Temporal and spatial variation in alkaloid levels in *Achnatherum robustum*, a native grass infected with the endophyte *Neotyphodium*. *Journal of Chemical Ecology*, 32(2), 307–324. <https://doi.org/10.1007/s10886-005-9003-x>
49. Faeth, S. H., & Sullivan, T. J. (2003). Mutualistic asexual endophytes in a native grass are usually parasitic. *The American Naturalist*, 161(2), 310–325. <https://doi.org/10.1086/345937>
50. Farh, M. E.-A., & Jeon, J. (2020). Roles of Fungal Volatiles from Perspective of Distinct Lifestyles in Filamentous Fungi. *The Plant Pathology Journal*, 36(3), 193–203. <https://doi.org/10.5423/PPJ.RW.02.2020.0025>
51. Farré-Armengol, G., Filella, I., Llusia, J., & Peñuelas, J. (2016). Bidirectional Interaction between Phyllospheric Microbiotas and Plant Volatile Emissions. *Trends in Plant Science*, 21(10), 854–860. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.06.005>
52. Fávaro, L. C. de L., de Melo, F. L., Aguilar-Vildoso, C. I., & Araújo, W. L. (2011). Polyphasic analysis of intraspecific diversity in *Epicoccum nigrum* warrants reclassification into separate species. *PloS One*, 6(8), e14828. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014828>
53. Fávaro, L., Sebastianes, F., & Araújo, W. (2012). *Epicoccum nigrum* P16, a Sugarcane Endophyte, Produces Antifungal Compounds and Induces Root Growth. *PloS One*, 7, e36826. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036826>

54. Field, K. J., Pressel, S., Duckett, J. G., Rimington, W. R., & Bidartondo, M. I. (2015). Symbiotic options for the conquest of land. *Trends in Ecology & Evolution*, 30(8), 477–486. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2015.05.007>
55. Furbino, L. E., Godinho, V. M., Santiago, I. F., Pellizari, F. M., Alves, T. M. A., Zani, C. L., Junior, P. A. S., Romanha, A. J., Carvalho, A. G. O., Gil, L. H. V. G., Rosa, C. A., Minnis, A. M., & Rosa, L. H. (2014). Diversity patterns, ecology and biological activities of fungal communities associated with the endemic macroalgae across the Antarctic peninsula. *Microbial Ecology*, 67(4), 775–787. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0374-9>
56. Gardes, M., & Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes—Application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2(2), 113–118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.1993.tb00005.x>
57. Gateta, T., Nacoan, S., Seemakram, W., Ekprasert, J., Theerakulpisut, P., Sanitchon, J., Suwannarach, N., & Boonlue, S. (2023). The Potential of Endophytic Fungi for Enhancing the Growth and Accumulation of Phenolic Compounds and Anthocyanin in Maled Phai Rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Fungi*, 9(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/jof9090937>
58. Gerber, A., Ito, K., Chu, C.-S., & Roeder, R. G. (2020). Gene-Specific Control of tRNA Expression by RNA Polymerase II. *Molecular Cell*, 78(4), 765–778.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.03.023>
59. Gerrits van den Ende, B., & Hoog, S. (1999). Variability and molecular diagnostics of the neurotropic species *Cladophialophora bantiana*. *Studies in Mycology*, 1999, 151–162.
60. Ghazanfarpour, M., Sadeghi, R., Roudsari, R., Latifnejad, Khorsand, I., Khadivzadeh, T., & Muoio, B. (2016). Red clover for treatment of hot flashes and menopausal symptoms: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 36(3), 301–311. <https://doi.org/10.3109/01443615.2015.1049249>
61. Gilibert, J.-E. (1782). *Flora Lithuanica inchoata seu enumeratio plantarum quas circa Grodnam collegit & determinavit*. <http://elibrary.mab.lt/handle/1/28092>
62. Gillot, G., Jany, J.-L., Coton, M., Le Floch, G., Debaets, S., Ropars, J., López-Villavicencio, M., Dupont, J., Branca, A., Giraud, T., & Coton, E. (2015). Insights into *Penicillium roqueforti* Morphological and Genetic Diversity. *PloS One*, 10(6), e0129849. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129849>
63. Gonçalves, V. N., Vaz, A. B. M., Rosa, C. A., & Rosa, L. H. (2012). Diversity and distribution of fungal communities in lakes of Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology*, 82(2), 459–471. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01424.x>

64. González-Pérez, E., Ortega-Amaro, M. A., Bautista, E., Delgado-Sánchez, P., & Jiménez-Bremont, J. F. (2022). The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* enhances *Arabidopsis*, tomato, and maize plant growth. *Plant Physiology and Biochemistry*, 176, 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.02.008>
65. González-Pérez, E., Ortega-Amaro, M. A., Salazar-Badillo, F. B., Bautista, E., Douterlungne, D., & Jiménez-Bremont, J. F. (2018). The *Arabidopsis*-*Trichoderma* interaction reveals that the fungal growth medium is an important factor in plant growth induction. *Scientific Reports*, 8(1), 16427. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34500-w>
66. Gościński, A., Szulc, P., Zielewicz, W., Walkowiak, J., & Cielecka-Piontek, J. (2023). Multidirectional Effects of Red Clover (*Trifolium pratense* L.) in Support of Menopause Therapy. *Molecules*, 28(13), Article 13. <https://doi.org/10.3390/molecules28135178>
67. Gough, C., & Cullimore, J. (2011). Lipo-chitooligosaccharide Signaling in Endosymbiotic Plant-Microbe Interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions®*, 24(8), 867–878. <https://doi.org/10.1094/MPMI-01-11-0019>
68. Gould, A. B. (2009). Fungi: Plant Pathogenic. In M. Schaechter (Ed.), *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)* (pp. 457–477). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00347-3>
69. Gramaje, D., Mostert, L., & Armengol, J. (2011). Characterization of *Cadophora luteo-olivacea* and *C. melinii* isolates obtained from grapevines and environmental samples from grapevine nurseries in Spain. *Phytopathologia Mediterranea*, 50, S112–S126.
70. Guzmán-Moreno, J., Ramírez-Santoyo, R., Ortega-Sigala, J., Ángeles-Chávez, C., Glez, V., Rodríguez, C., Patrón-Soberano, A., Ávila-Araiza, G., Luna-Álvarez, F., & Vidales, L. (2024). Fungal biosynthesis of gold nanoparticles with sporicidal activity against bacterial endospores. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 17. <https://doi.org/10.1080/17518253.2024.2360489>
71. Hassan, O., & Chang, T. (2022). Morphological and molecular characteristics of fungal species associated with crown rot of strawberry in South Korea. *Molecular Biology Reports*, 49(1), 51–62. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06841-9>
72. Havis, N. D., Brown, J. K. M., Clemente, G., Frei, P., Jedryczka, M., Kaczmarek, J., Kaczmarek, M., Matusinsky, P., McGrann, G. R. D., Pereyra, S., Piotrowska, M., Sghyer, H., Tellier, A., & Hess, M. (2015). *Ramularia collo-cygni*—An Emerging Pathogen of Barley Crops. *Phytopathology®*, 105(7), 895–904. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-14-0337-FI>
73. Hawksworth, D. L., & Lücking, R. (2017). Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiology Spectrum*, 5(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016>

74. Hong, S.-K., Kim, W.-G., Choi, H.-W., & Lee, S.-Y. (2008). Identification of *Microdochium bolleyi* Associated with Basal Rot of Creeping Bent Grass in Korea. *Mycobiology*, 36(2), 77–80. <https://doi.org/10.4489/MYCO.2008.36.2.077>
75. Humber, R. A. (2012). Identification of entomopathogenic fungi. In *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology* (pp. 151–187). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386899-2.00006-3>
76. Hung, R., Lee, S., & Bennett, J. W. (2015). Fungal volatile organic compounds and their role in ecosystems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(8), 3395–3405. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6494-4>
77. Hustad, V. P., & Miller, A. N. (2015). Studies in the genus *Glutinoglossum*. *Mycologia*, 107(3), 647–657. <https://doi.org/10.3852/14-328>
78. Hyde, K. D., Abd-Elsalam, K., & Cai, L. (2011, February 11). *Morphology: Still essential in a molecular world* [Text]. Mycotaxon. <https://doi.org/10.5248/114.439>
79. Jambagi, S., Hodén, K. P., Öhlund, L., & Dixelius, C. (2023). Red clover root-associated microbiota is shaped by geographic location and choice of farming system. *Journal of Applied Microbiology*, 134(4), lxad067. <https://doi.org/10.1093/jambio/lxad067>
80. James, T. Y., Kauff, F., Schoch, C. L., Matheny, P. B., Hofstetter, V., Cox, C. J., Celio, G., Gueidan, C., Fraker, E., Miadlikowska, J., Lumbsch, H. T., Rauhut, A., Reeb, V., Arnold, A. E., Amtoft, A., Stajich, J. E., Hosaka, K., Sung, G.-H., Johnson, D., ... Vilgalys, R. (2006). Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*, 443(7113), 818–822. <https://doi.org/10.1038/nature05110>
81. Jin, M., Yang, C., Wang, Y., Wei, L., & Osei, R. (2023). Isolation and identification of *Epicoccum nigrum* as the causal agent of brown spot disease in *Solanum tuberosum* in China. *Plant Pathology*, 72(4), 829–838. <https://doi.org/10.1111/ppa.13696>
82. Jumpponen, A., & Trappe, J. M. (1998). Dark septate endophytes: A review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *The New Phytologist*, 140(2), 295–310. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1998.00265.x>
83. Jundziłł, J. (1830). Opisanie roślin w Litwie, na Wołyniu, Podolu i Ukrainie dziko rosnących, iako i oswoionych: Podług wyd. szesnastego układu roślin Linneusza. In *Biblioteka Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy*. Józef Zawadzki. <https://kpbc.umk.pl/dlibra/doccontent?id=505>
84. Kaddes, A., Fauconnier, M.-L., Sassi, K., Nasraoui, B., & Jijakli, M.-H. (2019). Endophytic Fungal Volatile Compounds as Solution for Sustainable Agriculture. *Molecules*, 24(6), 1065. <https://doi.org/10.3390/molecules24061065>

85. Kaddes, A., Parisi, O., Berhal, C., Ben Kaab, S., Fauconnier, M.-L., Nasraoui, B., Jijakli, M. H., Massart, S., & De Clerck, C. (2016). Evaluation of the Effect of Two Volatile Organic Compounds on Barley Pathogens. *Molecules*, 21(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/molecules21091124>
86. Kai, M., Effmert, U., Berg, G., & Piechulla, B. (2007). Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Archives of Microbiology*, 187(5), 351–360. <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0199-0>
87. Kanchiswamy, C. N., Malnoy, M., & Maffei, M. E. (2015). Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. *Frontiers in Plant Science*, 6, 151. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00151>
88. Kepler, R. M., Luangsa-ard, J. J., Hywel-Jones, N. L., Quandt, C. A., Sung, G.-H., Rehner, S. A., Aime, M. C., Henkel, T. W., Sanjuan, T., Zare, R., Chen, M., Li, Z., Rossman, A. Y., Spatafora, J. W., & Shrestha, B. (2017). A phylogenetically-based nomenclature for Cordycipitaceae (Hypocreales). *IMA Fungus*, 8(2), 335–353. <https://doi.org/10.5598/ima fungus.2017.08.02.08>
89. Khan, A. R., Ullah, I., Waqas, M., Shahzad, R., Hong, S.-J., Park, G.-S., Jung, B. K., Lee, I.-J., & Shin, J.-H. (2015). Plant growth-promoting potential of endophytic fungi isolated from *Solanum nigrum* leaves. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 31(9), 1461–1466. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1888-0>
90. Khare, E., Mishra, J., & Arora, N. K. (2018). Multifaceted Interactions Between Endophytes and Plant: Developments and Prospects. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02732>
91. Kirkham, M. B. (2023). Chapter 23—Leaf anatomy and leaf elasticity. In M. B. Kirkham (Ed.), *Principles of Soil and Plant Water Relations (Third Edition)* (pp. 451–471). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95641-3.00031-3>
92. Klebhan, H. (1929). Vergibende junge treibgurken, ein darauf gefundes cephalosporium und dessen schlauchfruchte. *Phytopathologische Zeitschrift*, 1, 31–44.
93. Knapp, D. G., Németh, J. B., Barry, K., Hainaut, M., Henrissat, B., Johnson, J., Kuo, A., Lim, J. H. P., Lipzen, A., Nolan, M., Ohm, R. A., Tamás, L., Grigoriev, I. V., Spatafora, J. W., Nagy, L. G., & Kovács, G. M. (2018). Comparative genomics provides insights into the lifestyle and reveals functional heterogeneity of dark septate endophytic fungi. *Scientific Reports*, 8(1), 6321. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24686-4>
94. Kong, H. G., Song, G. C., Sim, H.-J., & Ryu, C.-M. (2021). Achieving similar root microbiota composition in neighbouring plants through airborne signalling. *The ISME Journal*, 15(2), 397–408. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00759-z>

95. Koza, N. A., Adedayo, A. A., Babalola, O. O., & Kappo, A. P. (2022). Microorganisms in Plant Growth and Development: Roles in Abiotic Stress Tolerance and Secondary Metabolites Secretion. *Microorganisms*, 10(8), 1528. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081528>
96. Lagerberg, T., Melin, E., & Lundberg, G. (1928). *Biological and practical researches into blueing in pine and spruce = Biologiska och praktiska undersökningar över blåyta hos tall och gran*. Centraltryckeriet. <https://catalog.hathitrust.org/Record/010833351>
97. Lammas, M. E., & Shitikova, A. (2024). Spring barley is a promising crop in agricultural production. *BIO Web of Conferences*, 139. <https://doi.org/10.1051/bioconf/202413901012>
98. Larsen, H. J., Braun, U., Blomquist, C., Woods, P., & Mohan, S. K. (2017). Powdery mildews on lilac in western North America include *Phyllactinia syringae*, sp. Nov. *Mycologia*, 109(3), 485–494. <https://doi.org/10.1080/00275514.2017.1328220>
99. Lattier, J. D., & Contreras, R. N. (2017). Ploidy and Genome Size in Lilac Species, Cultivars, and Interploid Hybrids. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 142(5), 355–366. <https://doi.org/10.21273/JASHS04189-17>
100. Lemfack, M. C., Gohlke, B.-O., Toguem, S. M. T., Preissner, S., Piechulla, B., & Preissner, R. (2018). mVOC 2.0: A database of microbial volatiles. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D1261–D1265. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1016>
101. Li, X., He, X.-L., Zhou, Y., Hou, Y.-T., & Zuo, Y.-L. (2019). Effects of Dark Septate Endophytes on the Performance of *Hedysarum scoparium* Under Water Deficit Stress. *Frontiers in Plant Science*, 10, 903. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00903>
102. Li, Y., Xia, L. Q., Wang, Y. N., Liu, X. Y., Zhang, C. H., Hu, T. L., & Cao, K. Q. (2013). The inhibitory effect of *Epicoccum nigrum* strain XF1 against *Phytophthora infestans*. *Biological Control*, 67(3), 462–468. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.09.007>
103. Lin, Z., Wang, K., & Feng, J. (2025). Identification and analysis of VOCs released by *Rhodococcus ruber* GXMZU2400 to promote plant growth and inhibit pathogen growth. *BMC Plant Biology*, 25(1), 559. <https://doi.org/10.1186/s12870-025-06582-y>
104. López-Ráez, J. A., Shirasu, K., & Foo, E. (2017). Strigolactones in Plant Interactions with Beneficial and Detrimental Organisms: The Yin and Yang. *Trends in Plant Science*, 22(6), 527–537. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.03.011>
105. Luo, Y., Wu, S., He, X., Wang, D., He, Y., & Nian, X. (2022). Identification of a *Cordyceps fumosorosea* Fungus Isolate and Its Pathogenicity against Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). *Insects*, 13(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/insects13040374>

106. Malkus, A., Chang, P.-F. L., Zuzga, S. M., Chung, K.-R., Shao, J., Cunfer, B. M., Arseniuk, E., & Ueng, P. P. (2006). RNA polymerase II gene (RPB2) encoding the second largest protein subunit in *Phaeosphaeria nodorum* and *P. avenaria*. *Mycological Research*, 110(Pt 10), 1152–1164. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.07.015>
107. Mandyam, K. G., Roe, J., & Jumpponen, A. (2013). *Arabidopsis thaliana* model system reveals a continuum of responses to root endophyte colonization. *Fungal Biology*, 117(4), 250–260. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.02.001>
108. Mandyam, K., Loughin, T., & Jumpponen, A. (2010). Isolation and morphological and metabolic characterization of common endophytes in annually burned tallgrass prairie. *Mycologia*, 102(4), 813–821. <https://doi.org/10.3852/09-212>
109. Mantzoukas, S., Lagogiannis, I., Mpousia, D., Ntoukas, A., Karmakolia, K., Eliopoulos, P. A., & Poulas, K. (2021). *Beauveria bassiana* Endophytic Strain as Plant Growth Promoter: The Case of the Grape Vine *Vitis vinifera*. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 7(2), 142. <https://doi.org/10.3390/jof7020142>
110. Mari, M., Bautista-Baños, S., & Sivakumar, D. (2016). Decay control in the postharvest system: Role of microbial and plant volatile organic compounds. *Postharvest Biology and Technology*, 122, 70–81. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.04.014>
111. Martin, K. J., & Rygielwicz, P. T. (2005). Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology*, 5, 28. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-5-28>
112. McConnaughey, M. (2014). Physical Chemical Properties of Fungi☆. In *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.05231-4>
113. Minkevičius, A. (1927). *Kosmos*, 1927. Nr. 6. <http://archive.org/details/kosmos-1927-nr.-6>
114. Moslemi, A., Ades, P. K., Groom, T., Crous, P. W., Nicolas, M. E., & Taylor, P. W. J. (2016). *Paraphoma* Crown Rot of *Pyrethrum* (*Tanacetum cinerariifolium*). *Plant Disease*, 100(12), 2363–2369. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-16-0628-RE>
115. Mostafiz, M. M., Jhan, P. K., Shim, J.-K., & Lee, K.-Y. (2018). Methyl benzoate exhibits insecticidal and repellent activities against *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). *PLoS ONE*, 13(12), e0208552. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208552>
116. Mueller, G. M., Bills, G. F., & Foster, M. S. (2004). *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods*. Academic Press.

117. Muñoz-Barrios, A., Sopena-Torres, S., Ramos, B., López, G., del Hierro, I., Díaz-González, S., González-Melendi, P., Mélida, H., Fernández-Calleja, V., Mixão, V., Martín-Dacal, M., Marcet-Houben, M., Gabaldón, T., Sacristán, S., & Molina, A. (2020). Differential Expression of Fungal Genes Determines the Lifestyle of *Plectosphaerella* Strains During *Arabidopsis thaliana* Colonization. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 33(11), 1299–1314. <https://doi.org/10.1094/MPMI-03-20-0057-R>
118. Nagano, Y., Miura, T., Nishi, S., Lima, A. O., Nakayama, C., Pellizari, V. H., & Fujikura, K. (2017). Fungal diversity in deep-sea sediments associated with asphalt seeps at the Sao Paulo Plateau. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 146, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2017.05.012>
119. Naranjo-Ortiz, M. A., & Gabaldón, T. (2019). Fungal evolution: Diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. *Biological Reviews*, 94(6), 2101–2137. <https://doi.org/10.1111/brv.12550>
120. Navarrete, F., Abreo, E., Martínez, S., Bettucci, L., & Lupo, S. (2011). Pathogenicity and molecular detection of Uruguayan isolates of *Greeneria uvicola* and *Cadophora luteo-olivacea* associated with grapevine trunk diseases. *Phytopathologia Mediterranea*, 50, S166–S175.
121. Nguema-Ona, E., Vické-Gibouin, M., Cannesan, M.-A., & Driouich, A. (2013). Arabinogalactan proteins in root–microbe interactions. *Trends in Plant Science*, 18(8), 440–449. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.03.006>
122. Nguyen et al., C. M. (2021). (PDF) ISOLATE ENDOPHYTIC FUNGI FROM LOCAL CATHARANTHUS ROSEUS AND ANALYZE THEIR EXTRACELLULAR ENZYME ACTIVITIES. *ResearchGate*. <https://doi.org/10.21474/IJAR01/12896>
123. Nogueira-Lopez, G., Greenwood, D. R., Middleditch, M., Winefield, C., Eaton, C., Steyaert, J. M., & Mendoza-Mendoza, A. (2018). The Apoplastic Secretome of *Trichoderma virens* During Interaction With Maize Roots Shows an Inhibition of Plant Defence and Scavenging Oxidative Stress Secreted Proteins. *Frontiers in Plant Science*, 9, 409. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00409>
124. Palm, M. E., Gams, W., & Nirenberg, H. I. (1995). *Plectosporium*, a new genus for *Fusarium*, *tabacinum*, the anamorph of *Plectosphaerella cucumerina*. *Mycologia*, 87(3), 397–406. <https://doi.org/10.1080/00275514.1995.12026545>
125. Perelló, A., Simón, M. R., & Arambarri, A. M. (2002). Interactions between Foliar Pathogens and the Saprophytic Microflora of the Wheat (*Triticum aestivum* L.) Phylloplane. *Journal of Phytopathology*, 150(4–5), 232–243. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2002.00747.x>

126. Pašakinskienė, I., Stakelienė, V., Matijošiūtė, S., & Martūnas, J. (2024). Diversity of Endophytic Fungi and Bacteria Inhabiting the Roots of the Woodland Grass, *Festuca gigantea* (Poaceae). *Diversity*, 16(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/d16080453>
127. Pašakinskienė, I., Stakelienė, V., Matijošiūtė, S., Martūnas, J., Rimkevicius, M., Budiene, J., Aučina, A., & Skridaila, A. (2025). Growth-Promoting Effects of Grass Root-Derived Fungi *Cadophora fastigiata*, *Paraphoma fimetii* and *Plectosphaerella cucumerina* on Spring Barley (*Hordeum vulgare*) and Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum*). *Microorganisms*, 13, 25. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13010025>
128. Peng, Z., Cao, M., Yan, B., Wang, S., Kang, C., Wang, H., Wan, X., Hao, Q., Xiang, Z., Zhang, Z., Xue, W., Feng, L., Zhang, Y., Wu, H., & Guo, L. (2025). Maize promoted the growth and volatile oil accumulation of *Atractylodes lancea* through rhizosphere VOCs. *Plant and Soil*, 506(1), 109–123. <https://doi.org/10.1007/s11104-023-06460-2>
129. Petrini, O. (1991). Fungal Endophytes of Tree Leaves. In J. H. Andrews & S. S. Hirano (Eds.), *Microbial Ecology of Leaves* (pp. 179–197). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3168-4_9
130. Piesik, D., Lemańczyk, G., Bocianowski, J., Buszewski, B., Vidal, S., & Mayhew, C. A. (2022). Induction of volatile organic compounds in *Triticum aestivum* (wheat) plants following infection by different *Rhizoctonia* pathogens is species specific. *Phytochemistry*, 198, 113162. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113162>
131. Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., & Oberlies, N. H. (2017). Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *Journal of Natural Products*, 80(3), 756–770. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>
132. Rajini, S. B., Nandhini, M., Udayashankar, A. C., Niranjana, S. R., Lund, O. S., & Prakash, H. S. (2020). Diversity, plant growth-promoting traits, and biocontrol potential of fungal endophytes of *Sorghum bicolor*. *Plant Pathology*, 69(4), 642–654. <https://doi.org/10.1111/ppa.13151>
133. Reid, D. A. (1985). Morphology and Anatomy of the Barley Plant. In *Barley* (pp. 73–101). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr26.c4>
134. Rodriguez, R. J., White, J. F., Arnold, A. E., & Redman, R. S. (2009). Fungal endophytes: Diversity and functional roles. *The New Phytologist*, 182(2), 314–330. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x>
135. Rojas, E. C., Jørgensen, H. J. L., Jensen, B., & Collinge, D. B. (2018). Fusarium diseases: Biology and management perspectives University of Copenhagen, Denmark. In *Integrated disease management of wheat and barley*. Burleigh Dodds Science Publishing.

136. Rojas, V. M. A., Iwanicki, N. S., D'Alessandro, C. P., Fatoretto, M. B., Demétrio, C. G. B., & Delalibera, I. (2023). Characterization of Brazilian *Cordyceps fumosorosea* isolates: Conidial production, tolerance to ultraviolet-B radiation, and elevated temperature. *Journal of Invertebrate Pathology*, 197, 107888. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2023.107888>
137. Rosenblueth, M., & Martínez-Romero, E. (2006). Bacterial Endophytes and Their Interactions with Hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions®*, 19(8), 827–837. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0827>
138. Rozpądek, P., Domka, A. M., Nosek, M., Ważny, R., Jędrzejczyk, R. J., Wiciarz, M., & Turnau, K. (2018). The Role of Strigolactone in the Cross-Talk Between *Arabidopsis thaliana* and the Endophytic Fungus *Mucor* sp. *Frontiers in Microbiology*, 9, 441. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00441>
139. Saini, H. P., Meena, M., Sahoo, A., & Mehta, T. (2025). A review on fungal endophytes of the family Fabaceae, their metabolic diversity and biological applications. *Heliyon*, 11(3), e42153. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2025.e42153>
140. Sánchez-Vallet, A., Mesters, J. R., & Thomma, B. P. H. J. (2015). The battle for chitin recognition in plant-microbe interactions. *FEMS Microbiology Reviews*, 39(2), 171–183. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuu003>
141. Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Fungal Barcoding Consortium, Fungal Barcoding Consortium Author List, Bolchacova, E., Voigt, K., Crous, P. W., Miller, A. N., Wingfield, M. J., Aime, M. C., An, K.-D., Bai, F.-Y., Barreto, R. W., Begerow, D., ... Schindel, D. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
142. Schulz, B., & Boyle, C. (2005). The endophytic continuum. *Mycological Research*, 109(Pt 6), 661–686. <https://doi.org/10.1017/s095375620500273x>
143. Selosse, M. A., & Le Tacon, F. (1998). The land flora: A phototroph-fungus partnership? *Trends in Ecology & Evolution*, 13(1), 15–20. [https://doi.org/10.1016/s0169-5347\(97\)01230-5](https://doi.org/10.1016/s0169-5347(97)01230-5)
144. Selosse, M.-A., Vohník, M., & Chauvet, E. (2008). Out of the rivers: Are some aquatic hyphomycetes plant endophytes? *The New Phytologist*, 178(1), 3–7. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02390.x>
145. Shadmani, L., Jamali, S., & Fatemi, A. (2018). Biocontrol activity of endophytic fungus of barley, *Microdochium bolleyi*, against *Gaeumannomyces graminis* var. *Tritici*. <https://doi.org/10.22043/mi.2019.118205>

146. Shadmani, L., Jamali, S., & Fatemi, A. (2021). Isolation, identification, and characterization of cadmium-tolerant endophytic fungi isolated from barley (*Hordeum vulgare* L.) roots and their role in enhancing phytoremediation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(3), 1097–1106. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00493-4>
147. Simão, R. C., & Gomes, S. L. (2001). Structure, expression, and functional analysis of the gene coding for calmodulin in the chytridiomycete *Blastocladiella emersonii*. *Journal of Bacteriology*, 183(7), 2280–2288. <https://doi.org/10.1128/JB.183.7.2280-2288.2001>
148. Simpson, M. G. (2019). *Plant Systematics*.
149. Song, X.-Y., Wang, H., Ren, F., Wang, K., Dou, G., Lv, X., Yan, D.-H., & Strobel, G. (2019). An Endophytic *Diaporthe apiculatum* Produces Monoterpenes with Inhibitory Activity against Phytopathogenic Fungi. *Antibiotics*, 8(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8040231>
150. Spatafora, J. W., Chang, Y., Benny, G. L., Lazarus, K., Smith, M. E., Berbee, M. L., Bonito, G., Corradi, N., Grigoriev, I., Gryganskyi, A., James, T. Y., O'Donnell, K., Roberson, R. W., Taylor, T. N., Uehling, J., Vilgalys, R., White, M. M., & Stajich, J. E. (2016). A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*, 108(5), 1028–1046. <https://doi.org/10.3852/16-042>
151. Stakelienė, V., Pašakinskienė, I., Matijošiūtė, S., Martūnas, J., & Štukėnienė, G. (2025). Identifying Root-Associated Endophytic Fungi and Bacteria in *Festuca* and *Lolium* Grasses from a Site in Lithuania. *Microorganisms*, 13(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13040799>
152. Sun, T., Shen, Z., Shaukat, M., Du, C., & Ali, S. (2020a). Endophytic Isolates of *Cordyceps fumosorosea* to Enhance the Growth of *Solanum melongena* and Reduce the Survival of Whitefly (*Bemisia tabaci*). *Insects*, 11(2), 78. <https://doi.org/10.3390/insects11020078>
153. Sun, X., Wang, N., Li, P., Jiang, Z., Liu, X., Wang, M., Su, Z., Zhang, C., Lin, F., & Liang, Y. (2020b). Endophytic fungus *Falciphora oryzae* promotes lateral root growth by producing indole derivatives after sensing plant signals. *Plant, Cell & Environment*, 43(2), 358–373. <https://doi.org/10.1111/pce.13667>
154. Sunesson, A., Vaes, W., Nilsson, C., Blomquist, G., Andersson, B., & Carlson, R. (1995). Identification of volatile metabolites from five fungal species cultivated on two media. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(8), 2911–2918. <https://doi.org/10.1128/aem.61.8.2911-2918.1995>
155. Tang, M.-J., Lu, F., Yang, Y., Sun, K., Zhu, Q., Xu, F.-J., Zhang, W., & Dai, C.-C. (2022). Benefits of Endophytic Fungus *Phomopsis liquidambaris* Inoculation for Improving Mineral Nutrition, Quality, and

- Yield of Rice Grains Under Low Nitrogen and Phosphorus Condition. *Journal of Plant Growth Regulation*, 41(6), 2499–2513. <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10462-8>
156. Tedersoo, L., Anslan, S., Bahram, M., Põlme, S., Riit, T., Liiv, I., Kõljalg, U., Kisand, V., Nilsson, H., Hildebrand, F., Bork, P., & Abarenkov, K. (2015). Shotgun metagenomes and multiple primer pair-barcode combinations of amplicons reveal biases in metabarcoding analyses of fungi. *MycoKeys*, 10, 1–43. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.10.4852>
157. Tedersoo, L., Bahram, M., Zinger, L., Nilsson, R. H., Kennedy, P. G., Yang, T., Anslan, S., & Mikryukov, V. (2022). Best practices in metabarcoding of fungi: From experimental design to results. *Molecular Ecology*, 31(10), 2769–2795. <https://doi.org/10.1111/mec.16460>
158. Thorne, M., Rhodes, L., & Cardina, J. (2013). Effectivity of arbuscular mycorrhizal fungi collected from reclaimed mine soil and tallgrass prairie. *Open Journal of Ecology*, 03(03), 224–233. <https://doi.org/10.4236/oje.2013.33026>
159. Travadon, R., Lawrence, D. P., Rooney-Latham, S., Gubler, W. D., Wilcox, W. F., Rolshausen, P. E., & Baumgartner, K. (2015). Cadophora species associated with wood-decay of grapevine in North America. *Fungal Biology*, 119(1), 53–66. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.11.002>
160. Tsavkelova, E. A., Churikova, O. A., Volynchikova, E. A., Sapun, S. S., Leontieva, M. R., Speranskaya, A. S., Konorov, E. A., & Krinitsina, A. A. (2024). Plant-associated bacteria of *Syringa vulgaris* L. in an urban environment. *Plant and Soil*, 497(1), 585–610. <https://doi.org/10.1007/s11104-023-06417-5>
161. Van Bael, S. A., Seid, M. A., & Wcislo, W. T. (2012). Endophytic fungi increase the processing rate of leaves by leaf-cutting ants (*Atta*). *Ecological Entomology*, 37(4), 318–321. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.2012.01364.x>
162. Vasiliasukas, R., Menkis, A., Finlay, R. D., & Stenlid, J. (2007). Wood-decay fungi in fine living roots of conifer seedlings. *The New Phytologist*, 174(2), 441–446. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02014.x>
163. Větrovský, T., Kolařík, M., Žifčáková, L., Zelenka, T., & Baldrian, P. (2016). The *rpb2* gene represents a viable alternative molecular marker for the analysis of environmental fungal communities. *Molecular Ecology Resources*, 16(2), 388–401. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12456>
164. Vilgalys, R., & Hester, M. (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology*, 172(8), 4238–4246. <https://doi.org/10.1128/jb.172.8.4238-4246.1990>

165. Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Hong, S.-B., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., Seifert, K. A., Varga, J., Yaguchi, T., & Samson, R. A. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 78, 343–371. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.001>
166. Walsh, E., Duan, W., Mehdi, M., Naphri, K., Khiste, S., Scalera, A., & Zhang, N. (2018). *Cadophora meredithiae* and *C. interclivum*, new species from roots of sedge and spruce in a western Canada subalpine forest. *Mycologia*, 110(1), 201–214. <https://doi.org/10.1080/00275514.2017.1406748>
167. Walters, D. R., Havis, N. D., & Oxley, S. J. P. (2008). *Ramularia collo-cygni*: The biology of an emerging pathogen of barley. *FEMS Microbiology Letters*, 279(1), 1–7. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00986.x>
168. Wang, Q., Zhang, X., Xie, Q., Tao, J., Jia, Y., Xiao, Y., Tang, Z., Li, Q., Yuan, M., & Bu, T. (2024). Exploring Plant Growth-Promoting Traits of Endophytic Fungi Isolated from *Ligusticum chuanxiong* Hort and Their Interaction in Plant Growth and Development. *Journal of Fungi*, 10(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/jof10100713>
169. Waqas, M., Khan, A. L., Kamran, M., Hamayun, M., Kang, S.-M., Kim, Y.-H., & Lee, I.-J. (2012). Endophytic Fungi Produce Gibberellins and Indoleacetic Acid and Promotes Host-Plant Growth during Stress. *Molecules*, 17(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/molecules170910754>
170. Wasternack, C., & Hause, B. (2013). Jasmonates: Biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of Botany*, 111(6), 1021–1058. <https://doi.org/10.1093/aob/mct067>
171. Weiss, E., Zohary, D., & Hopf, M. (2012). *Domestication of Plants in the Old World—The Origin and Spread of Domesticated Plants in South-west Asia, Europe, and the Mediterranean Basin*. <https://doi.org/10.1093/acprof:osobl/9780199549061.001.0001>
172. Wijayawardene, N. N., Hyde, K. D., & Dai, D.-Q. (2021). Outline of Ascomycota. In Ó. Zaragoza & A. Casadevall (Eds.), *Encyclopedia of Mycology* (pp. 246–254). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819990-9.00064-0>
173. *World Food and Agriculture – Statistical Yearbook 2024*. (2024). FAO. <https://doi.org/10.4060/cd2971en>
174. Woźniak, M., Michalak, B., Wyszomierska, J., Dudek, M. K., & Kiss, A. K. (2018). Effects of Phytochemically Characterized Extracts From *Syringa vulgaris* and Isolated Secoiridoids on Mediators of Inflammation in a Human Neutrophil Model. *Frontiers in Pharmacology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00349>

175. Wu, J., Yang, B., Xu, J., Cuthbertson, A. G. S., & Ali, S. (2021). Characterization and Toxicity of Crude Toxins Produced by *Cordyceps fumosorosea* against *Bemisia tabaci* (Gennadius) and *Aphis craccivora* (Koch). *Toxins*, 13(3), 220. <https://doi.org/10.3390/toxins13030220>
176. Yamagiwa, Y., Inagaki, Y., Ichinose, Y., Toyoda, K., Hyakumachi, M., & Shiraishi, T. (2011). *Talaromyces wortmannii* FS2 emits β -caryophyllene, which promotes plant growth and induces resistance. *Journal of General Plant Pathology*, 77(6), 336–341. <https://doi.org/10.1007/s10327-011-0340-z>
177. Yasmin, H., Rashid, U., Hassan, M. N., Nosheen, A., Naz, R., Ilyas, N., Sajjad, M., Azmat, A., & Alyemeni, M. N. (2021). Volatile organic compounds produced by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* alleviated drought stress by modulating defense system in maize (*Zea mays* L.). *Physiologia Plantarum*, 172(2), 896–911. <https://doi.org/10.1111/ppl.13304>
178. Yli-Mattila, T., Kalko, G., Hannukkala, A., Paavanen-Huhtala, S., & Hakala, K. (2010). Prevalence, species composition, genetic variation and pathogenicity of clover rot (*Sclerotinia trifoliorum*) and *Fusarium* spp. In red clover in Finland. *European Journal of Plant Pathology*, 126(1), 13–27. <https://doi.org/10.1007/s10658-009-9516-1>
179. Zhang, M., Zhai, X., He, L., Wang, Z., Cao, H., Wang, P., Ren, W., & Ma, W. (2025). Morphological description and DNA barcoding research of nine *Syringa* species. *Frontiers in Genetics*, 16, 1544062. <https://doi.org/10.3389/fgene.2025.1544062>
180. Zhu, W., Wang, Z., Sun, Y., Yang, B., Wang, Q., & Kuang, H. (2021). Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of genus *Syringa*: A comprehensive review. *Journal of Ethnopharmacology*, 266, 113465. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113465>

PRIEDAI

1 priedas

Grybų taksonominė lentelė.

Endofitinis grybas	Kolonijos izoliato kodas	DNR sritis	DNR sutapimas, bp	Sutapimas, %	BLAST ID
<i>Cadophora fastigiata</i>	BSG003	ITS	531/531	100,00	MN833359.1
			508/508	100,00	MF077223.1
<i>Chaetomium funicola</i>	BSG039	ITS	633/633	100,00	PP165499.1
			248/249	99,60	FN394680
		SSU	417/417	100,00	AF048794.1
<i>Cordyceps fumosorosea</i>	BSG015 BSG066 BSG067 BSG068 BSG069	ITS	652/652	100,00	OY756928.1
			542/543	99,82	OY756922.1
			430/430	100,00	MH532834.1
			491/491	100,00	ON796011.1
			609/609	100,00	OR758802.1
			532/533	99,81	OR758801.1
			452/453	99,78	OR121546.1
			600/600	100,00	MF872372.1
			503/503	100,00	MT333241.1
		SSU	492/492	100,00	MH879640.1
			429/429	100,00	MH879638.1
			505/505	100,00	MW391722.1
			411/411	100,00	OR194098.1
			595/595	100,00	MN576761.1
		TEF	385/385	100,00	OY756920.1
<i>Epicoccum nigrum</i>	BSG025	ITS	457/457	100,00	MT557339.1
		RPB2	475/475	100,00	PP333174.1
		SSU	432/432	100,00	MF072589.1
<i>Microdochium bolleyi</i>	BSG007 BSG008 BSG011 BSG024 BSG026 BSG027 BSG028 BSG029 BSG036 BSG054 BSG055 BSG064	ITS	460/460	100,00	MT276137.1
			458/458	100,00	MT276118.1
			553/553	100,00	OL898490.1
			469/469	100,00	MT446207.1
			448/449	99,78	MT446123.1
			466/466	100,00	MT446104.1
			466/466	100,00	MT446101.1
			457/457	100,00	KP859018.1
			499/501	99,60	MT102452.1
			590/590	100,00	KY305060.1
			500/500	100,00	OM647846.1
			499/500	99,80	OM743901.1
		RPB2	574/576	99,65	MN313335.1
			543/543	100,00	MN817764.1
			611/612	99,84	OP184898.1
			523/523	100,00	OP184897.1
<i>Paraphoma fimeti</i>	BSG010	ITS	640/649	98,61	AB488489.1
			710/710	100,00	KF251675.1
			1236/1252	98,72	MF494612.1
<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	BSG006 BSG062 BSG070	ITS	426/426	100,00	MT447472.1
			453/453	100,00	MZ206376.1
			573/573	100,00	KC427067.1
			455/456	99,78	LR594792.1
		RPB2	544/544	100,00	GU180612.1
		SSU	522/524	99,62	ON935484.1