

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.833>

<https://orcid.org/0009-0005-8351-3710>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Violeta Stakelienė

Festuca gigantea (L.) Vill. rūšies
ypatumai: filogenetinė kilmė ir ryšiai su
endofitais

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai,
Biologija (N 010)

VILNIUS 2025

Disertacija rengta 2020–2024 metais (Vilniaus universiteto botanikos sodo Mokslo programų skyriuje).

Mokslinė vadovė – prof. habil. dr. Izolda Pašakinskienė (Vilniaus universiteto, gamtos mokslai, biologija – N 010).

Gynimo taryba:

Pirmininkas – prof. habil. dr. Juozas Rimantas Lazutka (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010).

Nariai:

dr. Sigita Jurkonienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010),

prof. dr. Vilma Kisnierienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biofizika – N 011),

doc. dr. Audrius Menkis (Švedijos žemės ūkio mokslų universitetas, Švedija, gamtos mokslai, biologija – N 010),

dr. Radvilė Rimgailė-Voicik (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2025 m. spalio mėn. 10 d. 13 val. Gyvybės mokslų centre, R401 auditorijoje. Adresas: Saulėtekio al. 7, Vilnius, Lietuva.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir Vilniaus universiteto interneto svetainėje adresu: <https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

VILNIUS UNIVERSITY

Violeta Stakalienė

Characteristics of *Festuca Gigantea* (L.)
Vill.: Phylogenetic Origin and
Relationships with Endophytes

DOCTORAL DISSERTATION

Natural Sciences,
Biology (N 010)

VILNIUS 2025

The dissertation was prepared between 2020 and 2024 (Vilnius University Botanical Garden, Department of Scientific Programs).

Academic Supervisor – Prof. Habil. Dr. Izolda Pašakinskienė (Vilnius University, Natural Sciences, Biology – N 010)

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

Chairman – Prof. Habil. Dr. Juozas Rimantas Lazutka (Vilnius University, Natural Sciences, Biology – N 010).

Members:

Dr. Sigita Jurkonienė (Vilnius University, Natural Sciences, Biology – N 010),

Prof. Dr. Vilma Kisnierienė (Vilnius University, Natural Sciences, Biophysics – N 011),

Doc. Dr. Audrius Menkis (Swedish University of Agricultural Sciences, Sweden, Natural Sciences, Biology – N 010),

Dr. Radvilė Rimgailė-Voicik (Vilnius University, Natural Sciences, Biology – N 010).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 13 h on 10th October 2025 in Room R401 of the Life Sciences Center. Address: Saulėtekio av. 7, Vilnius, Lithuania.

The text of this dissertation can be accessed at the library of Vilnius University, as well as on the website of Vilnius University:

www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

TURINYS

TURINYS	5
SANTRUMPOS	9
ĮVADAS	11
MOKSLINIS NAUJUMAS	13
GINAMIEJI TEIGINIAI	14
1. LITERATŪROS APŽVALGA	15
1.1. <i>Festuca gigantea</i> biologija	15
1.2. Poliploidija augalų rūšių evoliucijoje	15
1.3. FISH/GISH metodo esmė	18
1.3.1. <i>Lolium</i> ir <i>Festuca</i> rūšių genomo sandaros išaiškinimo, taikant GISH, pavyzdžiai	21
1.3.2. Trumpų pasikartojančių sekų pritaikymo FISH technologijai galimybės	23
1.4. Endofitai: apibrėžimas, paplitimas ir klasifikacija	26
1.4.1 Endofitinių grybų klasifikacija	27
1.4.2. Endofitinių bakterijų klasifikacija	27
1.5. Endofitinių mikroorganizmų identifikavimo metodai	28
1.6. Kolonizacija ir gynybos mechanizmas	30
1.7. Endofitų biologinis vaidmuo	32
1.7.1. Endofitų vaidmuo mineralinėje mityboje	33
1.7.2. Endofitų vaidmuo apsaugant augalus nuo žalingo biotinių ir abiotinių veiksnių poveikio	33
1.7.3. Endofitų vaidmuo augalų fotosintzei	35
1.7.4 Endofitų poveikis fitohormonų veiklai	35
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	37
2.1. <i>Festulolium</i> hibridų kūrimas	43
2.2. Morfolginiai matavimai	44
2.3. FISH/GISH metodas	46
2.3.1. Citologinių preparatų ruošimas iš šaknų meristemos	46

2.3.2. Telomerinių, centromerinių ir 5S rDNR sekų gausinimas	48
2.3.3. pTA71 plazmidės panaudojimas 18S-5.8S-26S rDNR žymėti	49
2.3.4. Zondų ženklavimas fluorochromais	50
2.3.5. Fluorescencinė <i>in situ</i> hibridizacija	51
2.4. Endofitų identifikavimas	53
2.4.1. Šaknų surinkimas ir sterilinimas.....	53
2.4.2. Endofitinių grybų dažnio skaičiavimas.....	54
2.4.3. Endofitinių grybų izoliavimas	55
2.4.4. Endofitinių bakterijų izoliavimas	55
2.4.5. Endofitinių grybų ir bakterijų DNR išskyrimas	55
2.4.6. PGR reakcija ir sekoskaita.....	56
2.4.7. Endofitinių mikroorganizmų morfologinis apibūdinimas	56
2.4.8. Statistinė analizė.....	56
2.5. <i>L. multiflorum</i> sėklų inokuliavimas endofitiniais grybais	57
2.5.1. <i>C. fastigiata</i> , <i>P. fimetis</i> , <i>P. cucumerina</i> sporų suspensijos paruošimas	57
2.5.2. <i>L. multiflorum</i> sėklų sterilinimas ir inokuliavimas	58
2.5.3. Inokuluotų <i>L. multiflorum</i> augalų auginimas ir morfologinių parametrų matavimai.....	58
2.5.4. Grybų gausumo <i>L. multiflorum</i> augalų šaknyse po inokuliacijos vertinimas.....	59
2.6. Programinė įranga	59
2.6.1. Mikroskopinių vaizdų analizė ir bioinformatikos programinė įranga	59
2.6.2. Statistinė analizė ir vizualizacija	60
3. REZULTATAI	61
3.1. Tarpgentinių <i>L. perenne</i> × <i>F. gigantea</i> hibridų gavimas ir jų įvertinimas	61
3.2. <i>F. gigantea</i> ir giminingų <i>Lolium</i> bei <i>Festuca</i> rūšių citogenetiniai ypatumai, nustatyti fluorescencinės <i>in situ</i> hibridizacijos (FISH) metodu...	64
3.2.1. <i>F. gigantea</i> alopoliploidinės kilmės tyrimas GISH metodu ir galimi ryšiai su diploidinėmis <i>Lolium</i> ir <i>Festuca</i> rūšimis	64

3.2.2. <i>L. perenne</i> × <i>F. gigantea</i> hibridų citogenetiniai ypatumai	69
3.3. Specifinių chromosominių sekų FISH <i>F. gigantea</i> ir artimose rūšyse..	72
3.3.1. Centromerinių Fesreba sekų FISH diploidinėse <i>Lolium</i> ir <i>Festuca</i> rūšyse, susijusiose su alopoliploidinės <i>F. gigantea</i> formavimusi	73
3.3.2. Centromerinių ir telomerinių sekų FISH palyginimas <i>F. gigantea</i> ir <i>L. perenne</i> × <i>F. gigantea</i> hibriduose.....	74
3.3.3. Chromosomų centromerų ir telomerų FISH ypatumai interfaziniuose branduoliuose	80
3.3.4. rDNR sekų pasiskirstymas <i>F. gigantea</i> ir <i>L. perenne</i> × <i>F. gigantea</i> hibriduose.....	85
3.4. Šaknų endofitų įvairovė <i>F. gigantea</i> ir giminingose <i>Festuca/Lolium</i> rūšyse bei <i>L. perenne</i> × <i>F. gigantea</i> hibriduose.....	89
3.4.1. Endofitų citologinės morfostruktūros ir jų dažnis šaknyse	89
3.4.2. Endofitinių grybų įvairovė ir jų pasiskirstymas <i>F. gigantea</i> ir giminingose rūšyse.....	91
3.4.3. Endofitinių bakterijų įvairovė ir jų pasiskirstymas <i>F. gigantea</i> ir giminingose rūšyse.....	99
3.4.4. Endofitinių mikroorganizmų gausumas ir taksonų turtingumas <i>F. gigantea</i> ir jam giminingose rūšyse	100
3.5. Endofitinių grybų inokuliacijos poveikis <i>L. multiflorum</i> augalų augimui	103
4. REZULTATŲ APTARIMAS	107
4.1 <i>Festuca gigantea</i> alopoliploidinės kilmės tyrimas GISH metodu: galimi ryšiai su diploidinėmis <i>Lolium</i> ir <i>Festuca</i> rūšimis	107
4.2. Specifinių chromosominių sekų pasiskirstymo ypatumai <i>F. gigantea</i> , giminingose diploidinėse rūšyse ir <i>L. perenne</i> × <i>F. gigantea</i> hibriduose...	109
4.3. Endofitų rūšinė įvairovė ir jų pasiskirstymas <i>F. gigantea</i> ir jam artimų rūšių šaknyse	112
4.4. Augimą skatinantis endofitinių grybų inokuliacijos poveikis <i>L. multiflorum</i> augimui.....	116
IŠVADOS	119
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	120
SUMMARY	157

INTRODUCTION.....	157
SCIENTIFIC NOVELTY	160
STATEMENTS TO BE DEFENDED.....	161
MATERIALS AND METHODS	162
RESULTS	172
DISCUSSION	185
CONCLUSIONS.....	197
PADĖKA	198
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS	199
KONFERENCIJŲ SĄRAŠAS	201
GYVENIMO APRAŠYMAS.....	203
PRIEDAI.....	205
UŽRAŠAMS.....	221

SANTRUMPOS

AM	arbuskuliniai mikoriziniai / <i>arbuscular mycorrhizal</i>
BAC	dirbtinės bakterijų chromosomos / <i>bacterial artificial chromosome</i>
BAC-FISH	dirbtinės bakterijų chromosomos fluorescencinė <i>in situ</i> hibridizacija / <i>bacterial artificial chromosome fluorescence in situ hybridization</i>
BAP	6-benzilaminopurinas / <i>6-benzylaminopurine</i>
BLAST	pagrindinis vietos lygiavimo paieškos įrankis / <i>basic local alignment search tool</i>
bp	bazių pora / <i>base pair</i>
ChT	chromosomų teritorijos / <i>chromosomal territories</i>
CR	centromeriniai pasikartojimai / <i>centromeric repeat</i>
cv.	veislė / <i>cultivar</i>
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindolas / <i>4,6-diamidino-2-phenylindole</i>
EDTA	etilendiamintetraacto rūgštis / <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
FISH	fluorescencinė <i>in situ</i> hibridizacija / <i>fluorescence in situ hybridization</i>
gDNR / gDNA	genominė deoksiribonukleorūgštis / <i>genomic deoxyribonucleic acid</i>
GISH	genominė <i>in situ</i> hibridizacija / <i>genomic in situ hybridization</i>
IBA	Indolo-3-sviesto rūgštis / <i>Indole-3-butyric acid</i>
ITR	intersticinis telomerinis pasikartojimas / <i>interstitial telomeric repeat</i>
kb	kilobazė / <i>kilobase</i>
KT / RT	kambario temperatūra / <i>room temperature</i>
LTR	ilgas terminalinis pasikartojimas / <i>long terminal repeat</i>
LAMMC, ŽI	Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centras, žemdirbystės institutas / <i>LCAFS, IA – Lithuanian Centre for Agricultural and Forestry Sciences, Institute of Agriculture</i>
MS	<i>Murashige & Skoog</i>
N1 / N2 / N3	<i>Lolium perenne</i> × <i>Festuca gigantea</i> hibrido numeris / <i>Lolium perenne</i> × <i>Festuca gigantea</i> hybrid number
OTU	operatyviniai taksonominiai vienetai / <i>operational taxonomic units</i>
rDNR / rDNA	ribosominė deoksiribonukleorūgštis / <i>ribosomal deoxyribonucleic acid</i>

RT	atvirkštinė transkriptazė / <i>reverse transcriptase</i>
sp.	rūšis / <i>species</i>
spp.	kelios rūšys / <i>a few species</i>
TAE	Tris-acetatas-EDTA / <i>Tris-acetate-EDTA</i>
TRs	tandeminiai pasikartojimai / <i>tandem repeats</i>

IVADAS

Augalų kryžminimasis gamtoje yra dažnas reiškiny. Manoma, kad alopoliploidai sudaro apie 70 % visų gaubtasėklių augalų, todėl dėl įvykusios hibridizacijos ir viso genomo dvigubėjimo, alopoliploidija laikoma vienu iš svarbiausių evoliucinių įvykių atsirandant gaubtasėklių augalų rūšinei įvairovei (Moreno-Aguilar ir kt., 2022). Viena polimorfiškiausių Poaceae šeimos augalų grupių yra *Festuca* gentis (Bivilienė, 2010). Šiai genčiai priklauso gamtinis alopoliploidas *Festuca gigantea* (Hand ir kt., 2010; Zwyrteková ir kt., 2020), kuris aptinkamas lapuočių miškų bendrijose ir parkuose (Chorlton ir kt., 1997). Beje, dėl tolerancijos užmirkimui ir maistinės vertės ši rūšis kartais pasirenkama kuriant *Lolium* spp. $\times$ *Festuca* spp. hibridus (Chorlton ir kt., 1997). Taip pat alopoliploidinė *F. gigantea* rūšis yra tinkamas objektas tiriant poliploidinės evoliucijos mechanizmus. Deja, vis dar trūksta tyrimų, išsamiai atskleidžiančių genomų rūšinės sudėties (toliau – genomo sudėties) komponentus natūraliuose alopoliploiduose, susidariusiuose gamtoje kryžminantis *Lolium* ir *Festuca* rūšims (Humphreys ir kt., 1995; Pašakinskienė ir kt., 1997).

Vienas dažniausiai citogenetikoje taikomų metodų poliploidinių rūšių genomo sudėčiai ir specifinių sekų persitvarkymams nustatyti yra diferencinis chromosomų spalvinimas taikant FISH/GISH metodus. Fluorescencinės *in situ* hibridizacijos (FISH) metodu naudojant fluorochromais žymėtas DNR sekas identifikuojami specifiniai chromosomų regionai (O'Connor, 2008). Tuo tarpu genomines *in situ* hibridizacijos (GISH) metodu, pasitelkiant fluorescencinių būdu paženklinatą genominę DNR (gDNR) kaip zondą, galima atskirti skirtingų rūšių chromosomas (Schwarzacher ir kt., 1989). *Festuca* rūšių ir *Festulolium* hibridų alopoliploidinei kilmei ir persitvarkymams nustatyti šie metodai pradėti taikyti dar 1994 metais (Thomas ir kt., 1994). Taikant šiuos metodus yra atskleisti gamtinio aloheksaploido *F. arundinacea* genomo sudėties komponentai (Humphreys ir kt., 1995; Pašakinskienė ir kt., 1997, 1998), nustatyti *Lolium perenne* $\times$ *Festuca pratensis* chromosomų rekombinacijos dažnis (Canter ir kt., 1999), *Lolium* chromosomų „trapios“ vietos per kurias įvyksta DNR grandinės trūkiai ir rekombinacija (Majka ir kt., 2018, 2019), *Lolium* genomo dominavimas *Festulolium* hibriduose (Canter ir kt., 1999; Glombik ir kt., 2021) ir *F. pratensis* subgenomo rediploidizacija (Pašakinskienė, 2023; Pašakinskienė ir Jones, 2005). Nors atlikti svidrių ir eraičinų molekuliniai filogenetiniai tyrimai rodo, kad *F. gigantea* yra artimai susijęs su *F. pratensis* ir *Lolium* genties rūšimis: *L. multiflorum*, *L. temulentum* bei *L. perenne* (Hand ir kt., 2010), tačiau didžiojo eraičino genomo kilmės citogenetiniai tyrimai FISH/GISH metodu iki šiol nedaryti.

Tyrimų duomenys rodo, kad beveik visi augalai turi simbiotinius ryšius su endofitiniais mikroorganizmais (Arnold, 2007), kurie padeda augalams prisitaikyti prie aplinkos (Maciá-Vicente ir kt., 2008). Beje, tai svarbaus evoliucijos metu susiformavusio abipusiai naudingo ryšio pavyzdys (Dimijian, 2000). Vis dėlto, ilgą laiką endofitų kolonizacijos vertinimas *Festuca* ir *Lolium* rūšyse apsiribojo antžemine šių augalų dalimi (Leyronas ir Raynal, 2001; Leuchtmann, 1994; Leuchtmann ir kt., 2000; Roberts, 2022; Siegel ir kt., 1990). Atsižvelgiant į šią tyrimų spragą, atlikome šaknų endofitų tyrimus *F. gigantea* ir artimai giminingose rūšyse. Šie tyrimai yra pirmieji tokio pobūdžio mūsų tiriamoje *Festuca* ir *Lolium* augalų grupėje.

Šis darbas susideda iš dviejų dalių. Pirmoje darbo dalyje siekta atskleisti gamtinio aloheksaploido *F. gigantea* genomo kilmę. Genetinės kilmės tyrimai buvo atlikti su *F. gigantea* ir jo galimų diploidinių *Lolium* ir *Festuca* rūšių bei *L. perenne* × *F. gigantea* chromosomų citologiniais preparatais naudojant FISH/GISH metodą, kuris leido diferencijuotai atskirti didžiojo eraičino genomo komponentus ir nustatyti centromerų ir telomerų pokyčius įvykusius *L. perenne* × *F. gigantea* hibriduose. Antroji darbo dalis skirta *F. gigantea* ir giminingų rūšių šaknų endofitų, grybų ir bakterijų, tyrimams. Didžiojo eraičino ryšiams su endofitiniais mikroorganizmais atskleisti buvo taikomas endofitų izoliavimas iš augalų šaknų audinio. Tyrimas išplėstas įtraukiant giminingas *Festuca* bei *Lolium* genčių rūšis. Be to, sėklų inokuliacijos endofitinių grybų sporų suspensijos eksperimentas leido geriau suprasti endofitų biologinį vaidmenį augalų augimui.

Darbo tikslas – atskleisti gamtinių *F. gigantea* ($2n = 6x = 42$) aloploidų filogenetinę kilmę ir jų ryšius su endofitais.

Uždaviniai:

1. Ištirti *F. gigantea* genominę sandarą pagal numanomų jo tėvinių rūšių, *F. pratensis*, *Lolium perenne*, *L. multiflorum*, *L. temulentum*, chromosomų santykį ir rekombinacijos dažnį taikant GISH metodą metafazinių chromosomų preparatuose.
2. Nustatyti specifinių DNR sekų – ribosominės DNR, centromerų ir telomerų – pokyčius *F. gigantea* × *Lolium* spp. hibriduose siekiant atskleisti genomų persitvarkymo dėsninumus taikant FISH metodą.
3. Išskirti šaknų endofitinių grybų ir bakterijų izoliatus iš *F. gigantea* rūšiai giminingų *Lolium* bei *Festuca* rūšių ir *L. perenne* × *F. gigantea* hibridų, palyginti endofitų rūšių pasiskirstymą ir paplitimo dažnį šaknyse.
4. Išbandyti sėklų inokuliacijos ir endofitinių grybų suspensijos poveikį žolinių augalų augimui.

MOKSLINIS NAUJUMAS

Pirmą kartą:

1. Nustatyta, kad du trečdalius *Festuca gigantea* ($2n = 6x = 42$) genomo sudaro *Lolium* spp. ir *F. pratensis* kilmės chromosominiai naujadarai.
2. *L. perenne* $\times$ *F. gigantea* hibriduose ($2n = 4x = 28$) nustatytas Fesreba RT centromerinės sekos difuzinis pasklidimas per septynias chromosomas, kurios gautos iš *L. perenne*.
3. Izoliuoti *F. gigantea* ir giminingų *Festuca* spp. ir *Lolium* spp. rūšių bei *L. perenne* $\times$ *F. gigantea* hibridų šaknų endofitai. Nustatytas augalų buveinės tipo ir endofitų bioįvairovės ryšys.
4. Tai pirmas tyrimas, kuriame *Cadophora fastigiata*, *Paraphoma fimeti* ir *Plectosphaerella cucumerina* endofitiniai grybai inokuliuoti į *L. multiflorum* sėklas ir parodytas jų teigiamas poveikis augalų augimui.

GINAMIEJI TEIGINIAI

1. *Festuca gigantea* genomas ($2n = 6x = 42$) susidarė dalyvaujant vienai iš *Lolium* rūšių (*L. perenne* arba *L. multiflorum*) ir *F. pratensis*; 28 *F. gigantea* chromosomos yra *Lolium* spp. ir *F. pratensis* chromosominiai naujadarai.
2. *L. perenne* × *F. gigantea* hibriduose ($2n = 4x = 28$) stebimas centromerinės Fesreba RT sekos dispersinis išplitimas chromosomose, kilusiose iš *L. perenne*.
3. *F. gigantea* ir *L. perenne* × *F. gigantea* hibriduose telomerinė seka aptinkama ir intersticinėse chromosomų vietose. Visi 5S ir 45S rDNR lokusai yra stabiliai perduodami *L. perenne* × *F. gigantea* hibridams.
4. Šaknų endofitinių mikroorganizmų įvairovė ir gausa skiriasi tirtose vienmetėse ir daugiametėse bei skirtingo ploidiskumo *Festuca* ir *Lolium* rūšyse.
5. Tarp *F. gigantea*, *L. perenne* ir jų *L. perenne* × *F. gigantea* hibridų nėra atitikimo pagal šaknų endofitinių mikroorganizmų rūšinę sudėtį.
6. Inokuliacija *Cadophora fastigiata*, *Paraphoma fimeti* ir *Plectosphaerella cucumerina* skatina *L. multiflorum* augalų ūglių ir šaknų augimą.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. *Festuca gigantea* biologija

Festuca gigantea (didysis eraičinas) yra daugiametis žolinis augalas, priklausantis vienaskilčiams, komelijienių klada, Poales eilei, Poaceae šeimai (The Angiosperm Phylogeny Group, 2016) ir labai polimorfinei *Festuca* genčiai (Vilkonis, 2001). Tai retakeris, 60–150 cm aukščio augalas, kuriam būdingi 7–15 mm pločio lapai, pjautuviškos, stiebą apkabinančios auselės. Jam būdingas žiedynas šluotelė, iki 12–30 cm, kartais 40 cm ilgio, išsiskėtusi ir nusvyranti (Bagdonaitė ir kt., 1963). Ši rūšis yra aloheksaploidas ($2n = 6x = 42$) (Hand ir kt., 2010; Zwyrtková ir kt., 2020). *F. gigantea* kartais apibūdinamas kaip alooktaploidas ($2n = 8x = 56$) (Leitch ir kt., 2019). Jo genomo dydis – 7,23 1C pgDNR alooktapoiduose iki 10,38 1C pgDNR aloheksaploiduose (Leitch ir kt., 2019). Beje, dėl tolerancijos abiotiniam stresui kartais pasirenkamas kuriant *Lolium* spp. × *Festuca* spp. hibridus (Chorlton ir kt., 1997), dalyvauja susidarant miškų bendrijoms (Bagdonaitė ir kt., 1963; Yamada, 2011).

Be to, Zwierzykowski teigia, kad dėl glaudaus *Festuca* ir *Lolium* genčių filogenetinio ryšio šios gentys lengvai kryžminasi (Zwierzykowski, 1996), o Hand su bendraautorais (2010) alikę evoliucinius svaidrių ir eraičinų tyrimus, atskleidė šių rūšių filogenetinius ryšius gautus iš rDNR ITS sričių sekų analizės. *Festuca* gentį jie suskirstytė į kelis pogenčius: *Schedonorus/Lolium*, *Festuca* bei *Drymanthele* ir *Scariosae*. *Schedonorus/Lolium* ir *Festuca* pogenčių atstovai panašūs morfologiškai, tačiau molekuliniai tyrimai rodo, kad *Schedonorus* pogenčio nariai yra artimesni *Lolium* genties nariams, nei kitoms *Festuca* rūšims, todėl buvo atskirti į atskirus pogenčius (Charmet ir kt., 1997; Hand ir kt., 2010).

1.2. Poliploidija augalų rūšių evoliucijoje

Poliploidija yra reiškinys, kurios metu diploidinis chromosomų rinkinys kartotinais padaugėja vieną ar kelis kartus, kuomet chromosomos neišsiskiria ir lieka tame pačiame branduolyje (Gernand ir kt., 2005, 2006; Soltis ir kt., 2007). Toks genomo padvigubėjimas sukuria naują rūšį, kuri yra gyvybingesnė ir geriau adaptuojasi, palyginti su tėvinėmis rūšimis (Carretero-Paulet ir de Peer, 2020; Kopecký ir kt., 2022). Duomenys rodo, kad poliploidija plačiai paplitusi tarp natūralių ir kultūrinių augalų, siekia iki 70 % (Chen ir kt., 2007), todėl didėja gaubtasėklių augalų rūšinė įvairovė (Kang ir kt., 2019; Soltis ir Soltis, 2009).

Ankstesni tyrimai parodė, kad dviskilčiai ir vienaskilčiai augalai atsiskyrė dėl viso genomo padvigubėjimo, kurį nulėmė augalų hibridizacija ir poliploidizacija. O miglinių (Poaceae) augalų genomo poliploidizacija įvyko net du kartus, prieš tai įvykus genomo dvigubėjimui vienaskilčiuose. Šie poliploidizacijos veiksmai susiję su geologinių epochų laikotarpiais, kurių metu adaptaciškai pranašesnės alopoliploidinės rūšys įsisavino naujas ekologines nišas (Schnable ir Lyons, 2015). Bulińska-Radomska ir Lester (1986) teigia, kad *Festuca* ir *Lolium* bei *Festuca* ir *Vulpia* yra monofiletinės kilmės. Taigi, *Festuca*, *Lolium* ir *Vulpia* yra kilę iš bendro protėvio, kuris buvo artimas *F. pratensis* ir *L. perenne*.

Literatūriniai duomenys rodo, kad vidurūšinė hibridizacija (tarp genetiškai skirtingų vienos rūšies populiacijų) ir tarprūšinė hibridizacija (tarp skirtingų rūšių) buvo labai svarbios susidarant alopoliploidinėms rūšims (Erickson ir Fenster, 2006; Kopecký ir kt., 2022; Selvarasu ir Kandhasamy, 2013). Selvarasu ir Kandhasamy (2013) kaip vieną iš vidurūšinės hibridizacijos padarinių įvardija autbrydinę depresiją, dėl kurios mažėja hibridų gyvybingumas ir prisitaikymas prie aplinkos. Tarpentinei hibridizacijai būdingos introgresinės linijos, atsirandančios selekcijoje kryžminant skirtingo ploidiskumo tėvines rūšis, o gauti hibridai naudojami atgaliniam kryžminimui (kryžminami su viena iš savo tėvinių rūšių kelis kartus) (Kopecký ir kt., 2022; Pašakinskienė, 2004). Taip įvyksta nealelinių genų sąveika ir sukuriama nauji kiekybiniai požymiai (Humphreys, 2003). Be to, būdingos heterozė (F1 kartos gyvybingumas) ir transgresyvi segregacija (tam tikro fenotipinio požymio susidarymas, jo pranašumo arba atvirkščiai) (Erickson ir Fenster, 2006; Kabas ir kt., 2023; Kopecký ir kt., 2022). Dėl susidariusios naujos genetinės kombinacijos, sujungiant abiejų rūšių ar genčių naudingus bruožus, ir įvykusios reprodukcinės izoliacijos hibridai yra atsparūs abiotiniam ir biotiniam stresui, produktyvesni ir patvaresni, todėl įgyja adaptacinį pranašumą kitokioje nei tėvų aplinkoje (Bivilienė, 2010; Yamada, 2011; Kopecký ir kt., 2008, 2022; Majka ir kt., 2020).

Poliploidiniai augalai skirstomi į alopoliploidus ir autopoliploidus. Alopoliploidai atsiranda susikryžminus skirtingų rūšių arba genčių individams, o autopoliploidai kilę iš vienos rūšies (Chen ir Ni., 2006; Soltis ir kt., 2007). Hibridizacija turi įtakos dominuojančio alelio virtimui į recesyvinio alelio formą, geno inaktyvinimui (dėl transpozono aktyvacijos hibridizacijos metu) ar geno nutildymui, todėl hibridai įgauna naują fenotipinį požymį. Taip pat hibridizacija turi įtakos genomo dydžio pokyčiams. Padidėjęs genomas skatina hibridus pereiti į nepalankias buveines (Bashir ir kt., 2018). Įdomu tai, kad tiek hibridai, tiek jų tėvai turi tiek pat chromosomų, tačiau jų genomai –

skirtingų dydžių, o chromosomų persitvarkymai veikia kaip kryžminimosi barjeras (Bashir ir kt., 2018). Nustatyta, kad DNR metilinimas (reguliuoja genų raišką) gali skatinti genų ekspresiją ir išsaugoti genomo vientisumą, o jo sutrikimai gali sukelti augalų vystymosi sutrikimų (Altaf ir kt., 2021; Gallego-Bartolomé, 2020). Be to, genų ekspresijos pokyčiuose dalyvauja transkripcijos reguliavimas ir chromatino modifikacija (Chen ir Ni., 2006).

Deja, vykstant tarpgentinei hibridizacijai susidarantys hibridai dažniausiai būna sterilūs (Kopecký ir kt., 2008; Majka ir kt., 2019). Aptikta, kad hibridų fertilumas priklauso nuo dominuojančio genomo, kai fenotipiniai poliploidinio genomo požymiai pranašesni už vieno iš tėvų ir yra paveldimi (Glombik ir kt., 2021).

Tarprūšinės hibridizacijos metu susikryžminus dviems skirtingoms rūšims, susiformuoja hibridas, turintis naują genominę sandarą, susijusią su genetinė ir epigenetinė pertvarka, kurios metu pašalinamos specifinės DNR sekos (Chen ir Ni., 2006; Gernand ir kt., 2005). Nustatyta, kad tėvų genomo reguliavimas, vienetinių chromosomų eliminavimas įvyksta ankstyvoje alopoliploidizacijos stadijoje, kuomet chromosomos nesusirenka metafazėje, o anafazėje atsilieka nuo kitų chromosomų. Taigi vienetinės chromosomos gali būti eliminuojamos mitozės metu, kai chromosomos dėl netinkamos kinetochoro (verpstės) skaidulų sąveikos, papildomos centromeros buvimo arba nebuvimo ne iki galo atsiskiria. Tai veda prie mikrobranduolių formavimosi, heterochromatizacijos ir DNR fragmentacijos ir galiausiai mikrobranduolys suyra. Antrasis kelias – chromatino pumpuravimas interfazėje, kai formuojasi chromatino „pumpurai“ ir atsiskyrimas. Susidaro mikrobranduolys, kuris taip pat heterochromatizuoja ir fragmentuoja, galiausiai toks mikrobranduolys suyra (Gernand ir kt., 2006).

Apibendrinant, alopoliploidinių rūšių susidarymą sukelia chromosomų, DNR metilinimo, chromatino ir genų ekspresijos pokyčiai, įskaitant sekos pašalinimą, dominuojantį genomą ir transponuojamų elementų aktyvaciją (Altaf ir kt., 2021; Bashir ir kt., 2018; Chen ir Ni., 2006; Gallego-Bartolomé, 2020; Gernand ir kt., 2005, 2006). Šie poliploidinio genomo pokyčiai gali apimti genetinius ar epigenetinius mechanizmus. Genetiniai pokyčiai (mutacijos) – tai DNR sekos ar chromosomų pakitimai (Henderson ir Salt, 2017), o epigenetiniai pokyčiai nekeičia DNR sekos, tačiau turi reikšmingą fenotipinį poveikį (Feng ir kt., 2010; Weinhold, 2006).

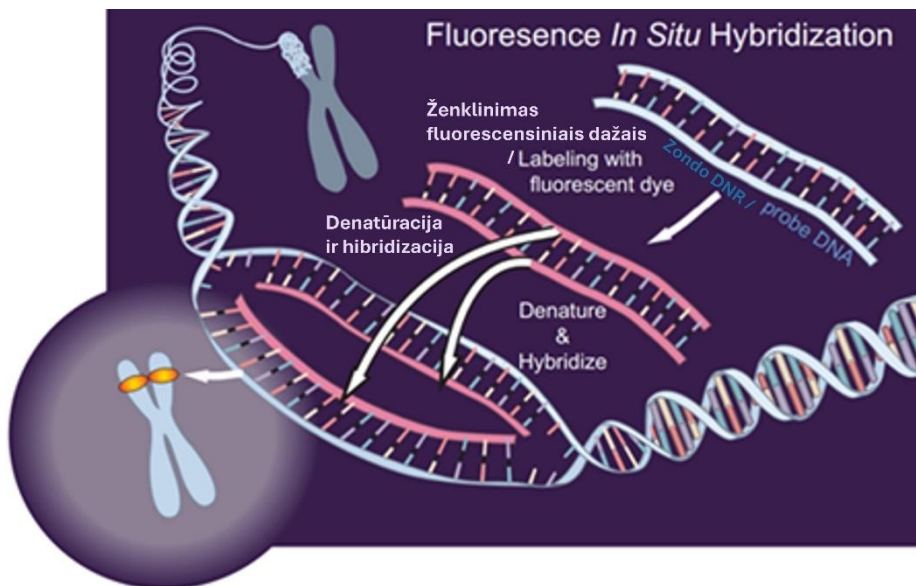
1.3. FISH/GISH metodo esmė

Susiformavę poliploidiniai hibridai dažnai pasižymi pranašesnėmis kokybinėmis savybėmis nei diploidiniai augalai, pavyzdžiui, jie būna aukštesni, didesniais žiedais ir lapais, storesniais stiebais. Šie požymiai laikyti svarbiais fenotipiniais pokyčiais, kuriais buvo grindžiama augalų taksonomija. Tik vėliau poliploidiškumas buvo patvirtintas chromosomų citologine analize (Ramsey ir Ramsey, 2014), taikant klasikinės citogenetikos metodus: chromosomų skaičiaus nustatymu ir jų morfologinėmis bei morfometrinėmis savybėmis – centromeros padėtimi, chromosomų ilgiais, antrinio susiaurėjimo buvimu ar nebuvimu. Po to chromosomų morfologinės savybės pradėtos analizuoti pirmaisiais zondų tipais – radioaktyviaisiais. Prasidėjo hibridizacijos *in situ* technikos eros pradžia (Gerlach ir Bedbrook, 1979; Schubert ir Wobus, 1985). Vėliau radioaktyvius zondus pakeitė neradioaktyvūs fluorescenciniai junginiai: biotinas, fluoresceinas, rodaminas ir kiti (Rayburn ir Gill, 1985).

In situ hibridizacijos metodui atlikti naudojami mitotiniai arba meiotiniai citologiniai preparatai ir zondai, kurių gamybai naudojamos tikslinės DNR sekos arba bendroji gDNR. Zondai sukuriama pagal dominančią seką, ženklinami fluorescuojančiais dažais, o ženklintos DNR dydis svyruoja nuo 25–250 bazių porų (bp) iki 1000 bp (Houben ir kt., 2006; Iwata-Otsubo ir kt., 2016; Lakatošová ir Holečková, 2007).

FISH technologija skirstoma į tiesioginę ir netiesioginę. Netiesioginis ženklinimas – kai zondai ženklinami digoksigeninu ar biotinu, prie vieno iš jų prijungiamas fluorescentiškai paženklintas atitinkamai antidigoksigeninas ir antibiotinas (Lakatošová ir Holečková, 2007).

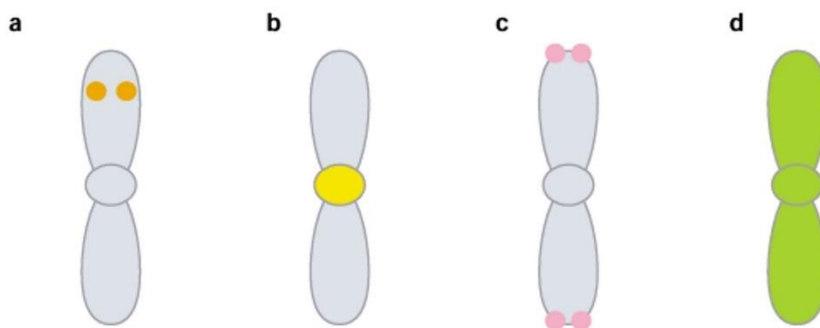
Tiesioginio FISH ženklinimo metu DNR ženklinama įterpiant į zondą nukleotidą, prie kurio prijungtas fluorochromas, pavyzdžiui, fluoresceinas, rodaminas ar kitas (1.1 pav.). Svarbu tai, kad galima vienu metu naudoti kelis zondus žymėtus skirtingais fluorochromais, kurie hibridizuojami tame pačiame citologiniame preparate (Anamthawat-Jónsson ir kt., 1990; Mukai ir kt., 1993; O'Connor, 2008; Sánchez-Morán ir kt., 1999).



1.1. pav. Fluorescencinės *in situ* hibridizacijos (FISH) veikimo schema. Modifikuota pagal Smeets, 2004.

Fig. 1.1 *Fluorescence in situ hybridization (FISH) diagram (modified from Smeets, 2004).*

FISH technologija naudoja fluorochromais ženklintus zondus, kurie hibridizuojasi su tomis chromosomomis arba jų dalimis, kurių sekos yra komplementarios (1.1 pav.). Fluorochromais ženklinti zondai gali būti: konkretaus lokuso zondas, pavyzdžiui, zondas, kuris ženklina rDNR sandėlis, dažniausiai 5S ir 45S rDNR; centromerinis zondas, sukurtas iš pasikartojančių sekų, randamų centromerose; telomerinis zondas, sukurtas iš pasikartojančios TTTAGGG sekos, esančios augalų telomerose; galimas atvejis kai ženklinama visa chromosoma (viso genomo zondas), tada naudojamas tos chromosomos sekų zondų rinkinys (1.2 pav.) (Ananiev ir kt., 1998; Cox ir kt., 1993; Jiang ir Gill, 1994; McNeil ir Ried, 2000; O'Connor, 2008; Thomas ir kt., 1996). Be to, viso genomo zondai naudojami atskiriems alopoliploidinių rūšių genomams tirti (Lideikytė ir kt., 2006; Silva ir Souza, 2013). Taigi FISH įrankis naudojamas trapiems regionams (5S ir 45S rDNR) ir chromosomų struktūros elementams (centromeroms ir telomeroms) identifikuoti, be to jis leidžia vizualizuoti specifinių sekų padėtis chromosomose arba identifikuoti konkrečią chromosomą.



1.2 pav. FISH/GISH metodui naudojami zondai: (a) specifinio geno zondas; (b) ir (c) struktūrinių chromosomų elementų – centromerų ir telomerų – zondai; (d) visą chromosomą ženklantis zondas. Pagal McNeil ir Ried, 2000.

Fig. 1.2 Probes used for the FISH/GISH method: (a) gene-specific probe; (b) and (c) repetitive-sequence probes – centromeric and telomeric; (d) chromosome-painting probe (from McNeil & Ried, 2000).

Pastaraisiais dešimtmečiais taikoma dirbtinių bakterinių chromosomų BAC-FISH (angl. *Bacterial Artificial Chromosome Fluorescence In Situ Hybridization*) technologija, pagrįsta didelėmis klonuotomis DNR sekomis (100–300 kilobazių (kb)), kitaip vadinamomis dirbtinėmis bakterijų chromosomomis (BAC) (angl. *Bacterial Artificial Chromosome*) (plazmidės tarpais), kurios yra ženkintos fluorochromais. Taigi BAC-FISH apima bakterijų kultivavimą, BAC zondo ženklinimą fluorochromais ir jo hibridizaciją citologiniuose preparatuose (Lakatošová ir Holečková, 2007; Roohi ir kt., 2008; Suzuki ir kt., 2001) atskiroms chromosomoms identifikuoti. BAC bibliotekos yra sukurtos mažus genomus turinčioms augalų rūšims (de Capdeville ir kt., 2009).

Vėliau FISH ir BAC-FISH metodus pakeitė oligo-FISH (Braz ir kt., 2020), gebantis identifikuoti tam tikrą vieną chromosomą. Naujas FISH etapas prasidėjo maždaug 2000 metais, ėmus naudoti specifinius trumpus oligonukleotidus (20–50 nukleotidų ilgio), kurie sukonstruojami programiškai, sintetinami ir ženklinami fluorochromais. Pavyzdžiui, zondai, sukurti iš pasikartojančių DNR elementų arba vienakopijinių DNR sekų, naudojami specifiniams chromosomų regionams ženklininti, o oligo zondu rinkinys – visai chromosomai ženklininti (Braz ir kt., 2020; Harun ir kt., 2023; Liu ir kt., 2020). 20–50 nukleotidų ilgio oligai, kurių tankis kas 2–10 kb, veikia kaip brūkšninis kodas, todėl galima paženklininti visą atskirų chromosomų rinkinį (Braz ir kt., 2020; Harun ir kt., 2023). Tyrimai rodo, kad

įprastai stipriam oligo zondo hibridizacijos signalui gauti metafazinėse chromosomose reikalingas 0,1–0,5 oligo/kb tankis (Harun ir kt., 2023; Jiang, 2019). Pastaruoju metu ši technologija keičia kai kuriuos plazmidėmis klonuotus zondus (Liu ir kt., 2020; Tang ir kt., 2014). Oligo zondai naudojami genolapiams kurti, genomo struktūrai tirti, rekombinacijai ar homologinėms ir homeologinėms chromosomoms atskirti, dideliems chromosomų persitvarkymams nustatyti (Braz ir kt., 2020; Harun ir kt., 2023; Liu ir kt., 2020; Zhang ir kt., 2021), todėl ši technika tinka poliploidinių rūšių genomui išaiškinti (Harun ir kt., 2023). Veiksmingi oligo zondai sukurti žemės ūkio ir pašariniams: agurkams, bananams, bulvėms, cukranendrėms, kukurūzams, kviečiams, ryžiams, liucernoms (Albert ir kt., 2019; Braz ir kt., 2018; Beránková ir kt., 2024; de Oliveira Bustamante ir kt., 2021; Harun ir kt., 2023; Liu ir kt., 2020; Lou ir kt., 2014; Tang ir kt., 2014, 2018; Meng ir kt., 2025) ir kitiems augalams.

FISH technika naudojama poliploidinių rūšių genomo sudėties ir kariotipo analizei: specifinėms sekoms (rDNR, centromeroms ir telomeroms) aptikti ir lokalizuoti, atskiroms chromosomoms identifikuoti, mutacijoms nustatyti (Lideikytė ir kt., 2006; O'Connor, 2008). Kombinuota FISH ir GISH, kuriai yra sukuriama zondai naudojant rūšies gDNR, ženklinimą fluorochromais, technika leidžia atskleisti aloploidinių rūšių genomo kilmę (Schwarzacher ir kt., 1989; Silva ir Souza, 2013). Panaudojus FISH/GISH derinį nustatyta poliploidinių: *Aster microcephalus* var. *ovatus* (Matoba ir kt., 2007), *Tragopogon* (Chester ir kt., 2012; Tate ir kt., 2005), *Saccharum* spp. (Piperidis ir kt., 2010), *Festuca arundinacea* (Humphreys ir kt., 1995, Pašakinskienė ir kt., 1997, 1998), *Camellia reticulata* (Liu ir Gu, 2011) ir kitų augalų kilmė.

1.3.1. *Lolium* ir *Festuca* rūšių genomo sandaros išaiškinimo, taikant GISH, pavyzdžiai

Genominė *in situ* hibridizacija (GISH) yra FISH technologijos atitikmuo, kuri pagrįsta bendra genomine rūšies DNR, ženklinimą fluorochromais (Schwarzacher ir kt., 1989; Silva ir Souza, 2013) ir hibridizuota chromosomų metafazinėse plokštelėse, todėl galima atskirti aloploidinės rūšies tėvų genomus ir įvertinti rekombinacijos laipsnį. Ši technika atskleidžia natūralių poliploidinių rūšių genomo kilmę ir leidžia nustatyti evoliucijos eigoje įvykusius genominius persitvarkymus (Younis ir kt., 2015; Silva ir Souza, 2013). Deja, pasitaiko, jog naudojant šią techniką įvyksta „kryžminė hibridizacija“ su netaikininėmis chromosomomis. Taikininė chromosomų

diferenciacijai nuo netaikinių didinti ir kryžminei hibridizacijai išvengti naudojama neženklinta fluorochromu artima giminingos rūšies gDNR, kurios pridedama 20–50 kartų daugiau nei taikininės rūšies bendros gDNR (Lee ir kt., 2011; Silva ir Souza, 2013). Poliploidinių rūšių genomo sudėties tyrimams dažniau naudojami tik taikinių rūšių DNR zondai, ženklinti fluorochromais, be blokuojančios DNR (Silva ir Souza, 2013).

Pasitelkiant GISH techniką tiriamos genominės gamtinių alopoliploidinių *Festuca* rūšių ir *Festulolium* hibridų rūšinės sudėtys ir rekombinacijos pobūdis (Kopecký ir kt., 2006, 2008, 2010; Majka ir kt., 2018; Pašakinskienė ir Jones, 2005). Pavyzdžiui, Humphreys su kolegomis (1995) nustatė, kad *F. arundinacea* yra gamtinis aloheksaploidas, kurio genomui susidarant dalyvavo dvi *Festuca* rūšys: diploidas *F. pratensis* ir tetraploidas *F. glaucescens*. Pašakinskienė su bendraautoriais (1997) nustatė, kad į *F. arundinacea* genomą įterpti *Lolium multiflorum* introgresinių sekų segmentai ir ši rūšis taip pat dalyvavo *F. arundinacea* genomo formavimosi procese. GISH taip pat padėjo atskleisti Brauno eraičinsvidrės, *L. perenne* × *F. pratensis* cv Prior, genomą. Nustatyta, kad didesnę jo genomo dalį sudaro rekombinantinio tipo chromosomos, sudarytos iš įvairaus dydžio svidrės ir eraičino fragmentų (Canter ir kt., 1999), o jo ir kitų *Festulolium* hibridų genome dominuoja *Lolium* genomas (Canter ir kt., 1999; Glombik ir kt., 2021). Taikant GISH atskleista, kad *L. multiflorum* × *F. arundinacea* ($2n = 6x = 42$) F2C1 kartos hibridų genomo komponentas *F. pratensis* rediploidizuojasi ir dominuoja, nes iš heksaploidinių hibridų spontaniškai iškilo diploidiniai augalai ($2n = 2x = 14$), o jų genomo pagrindą sudarė diploidiniai *F. pratensis* individai (Pašakinskienė, 2023). Anksčiau momentinė rediploidizacija aptikta ir somatinėse F1C0 *L. multiflorum* × *F. arundinacea* oktaploidinių ($2n = 8x = 56$) hibridų ląstelėse, veikiant kolchicinu (Pašakinskienė, 2023; Pašakinskienė ir Jones, 2005).

Apibendrinant, GISH metodas svarbus *Lolium* × *Festuca* tarpgentinių hibridų rekombinacijos pobūdžiui ir genomo stabilumui suprasti. Norint geriau suprasti šiuos veiksnius, kompleksiskai pasitelkiamas FISH metodas, kuomet kartu naudojami rDNR, ir telomeriniai zondai, leidžiantys nustatyti rekombinacijos dažnį „trapiose“ chromosomų vietose (Majka ir kt., 2018; Maravilla ir kt., 2021).

1.3.2. Trumpų pasikartojančių sekų pritaikymo FISH technologijai galimybės

Augalų genolapiams kurti ir filogenetinei analizei atlikti jau ilgą laiką naudojama FISH technologija. Ji leidžia atskirti chromosomas pagal formą ir struktūrą (rDNR, centromerų ir telomerų padėtį chromosomose) bei jas suporuoti, todėl galima aiškiai atskirti kariotipą ir rūšių genomą (Ansari ir kt., 2022). Taigi pasikartojančios sekos turi įtakos genomo struktūrai ir evoliucijai, nes perkeliami elementai (angl. *transposable elements*, TE) skatina genus persitvarkyti, dėl to didėja populiacijų įvairovė (Hassan ir kt., 2024). Nustatyta, kad perkeliami augalų genomo elementai kinta. Mažuose genomuose sudaro apie 3 % (Lee ir Kim, 2014), o dideliuose 50–80 % (Chen ir Ni, 2006), kartais siekia net 85 % genomo (Lee ir Kim, 2014).

Iš perkeliamų elementų augalams būdingi retrotranspozonai ir transpozonai, kurie skirstomi į 1 ir 2 klases (Lee ir Kim, 2014). Pirmajai priklauso retrotranspozonai, kurie veikia per iRNR kaip „kopijuok ir įterpk“ (procesas, kai RNR perrašoma į DNR ir perkeliama į kitą genomo vietą). 2 klasės žinomi kaip DNR transpozonai, kurie tiesiogiai veikia per DNR kaip „iškirpk ir įterpk“ (iš vienos genomo vietos elementas iškerpamas ir įterpiamas į kitą genomo vietą). Pagrindinės augalų retrotranspozonų grupės yra nekoduojanti ilgo terminalinio pasikartojimo (angl. *long terminal repeat*, LTR) ir atvirkštinės transkriptazės (angl. *reverse transcriptase*, RT) domeno sekos, kurios priklauso 1 klasei (Hassan ir kt., 2024; Lee ir Kim, 2014).

Augalų centromerų regionams būdingi LTR retrotranspozonai (Weber ir Schmidt, 2009), kurie būna nuo kelių šimtų bp iki kelių kb ilgio. Jie skirstomi į Ty1/copia ir Ty3/gypsy, kurie skiriasi koduojamų genų eiliškumu ir yra monofiletinės kilmės (Lee ir Kim, 2014). Ty3/gypsy kilmės retrotranspozonai kilę iš chromovirusų ir būdingi Poaceae šeimos augalams, pavyzdžiui, *Hordeum vulgare* nustatytas Cereba elementas, *Oryza sativa* nustatyti RIRE7, RIRE9, CRM ir CR elementai, *Triticum aestivum* CR, o *Zea mays* CRM elementas (Hassan ir kt., 2024; Jiang ir kt., 2003; Li ir kt., 2000; Neumann ir kt., 2011). Centromerinių pasikartojimų (angl. *centromeric repeat*, CR) elementas siejasi su centromeroms būdingu satDNR ir sąveikauja su CenH3 baltymu (Hassan ir kt., 2024), todėl jis dalyvauja centromerų funkcijoje ir veikia kaip taikininis centromeros motyvas (Hassan ir kt., 2024; Neumann ir kt., 2011). Duomenys rodo, kad dažniausiai satDNR ir TE lokalizuojasi heterochromatiniame regione, tačiau jie taip pat aktyviai dalyvauja centromerų struktūroje ir funkcijoje (Hassan ir kt., 2024). Nors centromerinės sekos nėra konservatyvios, tačiau dažnai yra specifinės genčiai ar net rūšiai ir

būna sudarytos iš tandeminių pasikartojimų (angl. *tandem repeats*, TRs) (Nagaki ir kt., 2015; Zwyrtková ir kt., 2020), pavyzdžiui, Ty3/gypsy elemento LTR domenai yra konservatyvūs (Nagaki ir kt., 2003) ir būdingi *Festuca* ir *Lolium* rūšims (Zwyrtková ir kt., 2020).

Kombinuodami FISH ir imunoflorescencijos metodus, Zwyrtková su kolegomis (2020) identifikavo ir patvirtino, kad Fesreba centromerinė seka būdinga *Lolium* ir *Festuca* rūšims ir priklauso Ty3/gypsy retrotranspozoniui, kuris artimas Cereba elementui. Fesreba seka FISH technologijoje naudojama kaip RT ir LRT domenų sekos. RT domeno seka, randama centromerose, o LTR – centromeriniame ir pericentromeriniame chromosomos regionuose (Zwyrtková ir kt., 2020).

Tiriant poliploidinių rūšių kariotipą, kitas svarbus struktūrinis chromosomos elementas yra telomeros. Telomeriniai pasikartojimai konservatyvūs ir randami visų gyvų organizmų chromosomų galuose. Juos sudaro TRs. Daugumai augalų rūšių būdinga *Arabidopsis* tipo telomerinė seka 5'-(TTTAGGG)_n-3' (Luo ir kt., 2022; Peska ir Garcia, 2020; Shakirov ir kt., 2022). Shakirov ir kt. (2022) apžvalgoje minima, kad smidriečių (*Asparagales*) chromosomų telomerinė seka yra stuburinių tipo, kurios formulė yra (TTAGGG)_n, o *Allium* genties augalams būdingi ilgi telomeriniai pasikartojimai (CTCGGTTATGGG)_n. Be to, įrodyta, kad augalų telomerose yra gausu *POT1* genų, pavyzdžiui *Arabidopsis thaliana* būdingi *AtPOT1a*, *AtPOT1b* ir *AtPOT1c*. *AtPOT1c* yra nefunkcionalus genas, o *AtPOT1a* jungiasi su telomerine DNR *in vitro* ir skatina telomerazės aktyvumą, *AtPOT1b* neleidžia chromosomų galams susijungti (Shakirov ir kt., 2022). Susintetintas telomerines sekas galima panaudoti augalų kariotipo savitumams tirti ir chromosomoms suskaičiuoti (Luo ir kt., 2022).

Ribosominės DNR (rDNR) sekos yra konservatyvios ir jas sudaro TRs, išsidėstę viename ar keliuose chromosomų lokusuose (Garcia ir kt., 2012). Eukariotuose yra du rDNR lokusai: 5S ir 45S rDNR. 5S genus transkribuoja III polimerazė, o 45S, suskaidytas į 18S, 5,8S ir 26S rDNR subvienetus, transkribuoja I polimerazė iš vieno operono. Taigi 45S rDNR koduoja gerokai didesnę prekursorių nei 5S rDNR (Garcia ir kt., 2012; Rosato ir kt., 2016). rDNR sekos, jų skaičius ir padėtis chromosomose, panaudojus FISH technologiją, tapo populiariu daugelio augalų, ypač poliploidų, filogenetinių tyrimų objektu (Garcia ir kt., 2012; Volkov ir kt., 2017). rDNR zondai, ženklinami skirtingais fluorescuojančiais dažais, naudojami nustatyti alopoliploidinių augalų genomų kilmę ir identifikuoti atskiras chromosomas, jas suporuoti, analizuoti kariotipui (Książczyk ir kt., 2010; Volkov ir kt., 2017).

Atlikta nemažai *Festuca* ir *Lolium* rūšių tyrimų panaudojant rDNR sekų zondus. Nustatyta, kad *F. pratensis* turi po vieną 45S ir 5S rDNR lokusą 3-ioje chromosomų poroje (Książczyk ir kt., 2010; Thomas ir kt., 1997). O aloheksaploidiniuose *F. arundinacea* ir *F. gigantea* ($2n = 6x = 42$) genotipuose randama po keturias 45S sritis (Lechowicz ir kt., 2020; Thomas ir kt., 1996, 1997), 5S rDNR sričių skaičius skyrėsi. *F. arundinacea* būdingos 6-ios 5S sritys (Lechowicz ir kt., 2020), *F. gigantea* – 8-ios 5S rDNR (Thomas ir kt., 1996, 1997).

Thomas su kolegomis (1996, 1997) nustatė ir *Lolium* rūšių rDNR lokusų skaičių ir padėtis chromosomose. *L. perenne* būdingi 45S rDNR lokusai pirmoje, antroje ir trečioje chromosomų porose ir papildoma viena 45S rDNR sritis septintoje chromosomoje (iš viso 7-ios 45S rDNR sritys). Taip pat būdingas vienas 5S rDNR lokusas 3-ioje chromosomoje (iš viso dvi 5S rDNR sritys) (Książczyk ir kt., 2010; Thomas ir kt., 1997). O *L. multiflorum* randami trys 45S rDNR lokusai pirmoje, antroje ir trečioje chromosomų porose ties antrinėmis persmaukomis ir 5S rDNR lokusas 3-ioje chromosomoje. Nustatyta, kad *L. temulentum* būdingos dvi chromosomų poros, turinčios 45S rDNR lokusus. Be to, šiai rūšiai taip pat būdingas 5S rDNR lokusas 3-ioje chromosomoje (Thomas ir kt., 1996).

Atlikti tyrimai su *Lolium* × *Festuca* hibridais rodo, kad 45S rDNR regiono padėtis chromosomose kinta (Książczyk ir kt., 2010), nes regionas yra trapus ir įtrūksta per chromosomų susiaurėjimus (Huang ir kt., 2012; Pikaard, 1999), o 5S rDNR sritis dažniausiai yra konservatyvi (Książczyk ir kt., 2010). Panaudodami FISH/GISH derinį, Książczyk su kolegomis (2010) nustatė, kad *L. perenne* × *F. pratensis* (*LpLpFp*) hibridai turi po vieną 5S rDNR sritį kiekviename *L. perenne* genome (viso 2 regionai) ir vieną regioną, kilusį iš *F. pratensis*. 5S rDNR skaičius buvo stabilus. O 45S rDNR sričių skaičius buvo nestabilus, kito nuo 7 iki 9 (Książczyk ir kt., 2010). Tirdami tetraploidinius *F. pratensis* × *L. perenne* (*FpFpLpLp*) hibridus, rado tokį pat 45S rDNR sričių skaičių, kaip ir triploidinių *L. perenne* × *F. pratensis* hibridų. Tetraploidinių hibridų chromosomose dažniausiai 5S rDNR sričių skaičius buvo stabilus. Viena chromosomų pora, turinti šią sritį, buvo kilusi iš *F. pratensis* ir viena pora iš – *L. perenne*, tačiau kai kuriuose individuose buvo rasta papildoma viena 5S rDNR vieta chromosomoje, kuri buvo kilusi iš *F. pratensis* tėvinės rūšies. Atlikti tyrimai su *L. multiflorum* augalais ir jų hibridais patvirtino 5S rDNR regiono stabilumą. O 45S rDNR sričių buvo daugiau nei tikėtasi, tai yra daugiau nei viena vieta toje pačioje chromosomoje, todėl vienas iš genotipų turėjo daugiau nei tikėtasi 45S rDNR sričių. Be to, net 95 % metafazinių ląstelių turėjo bent vieną chromosomos

lūžį ties 45S rDNR sritimi (Bustamante ir kt., 2014). Nustatyta, kad introgresinėse *Festulolium* linijose *Festuca* segmentai perkeliama į *Lolium* chromosomas ties rDNR sritimis (Lideikytė ir kt., 2006).

Šie tyrimai patvirtina, kad ties rDNR sritimis yra didelis rekombinacijos dažnis (Huang ir kt., 2008a; Lideikytė ir kt., 2006; Rosato ir kt., 2016). Kartu pasitelkus FISH/GISH derinį (rDNR arba telomerinį zondus su taikininės rūšies gDNR) galima nustatyti, kad rekombinacija dažnai įvyksta „trapiose“ chromosomų vietose (angl., *fragile sites*): rDNR ir intersticiniuose telomeriniuose pasikartojimuose (angl., *interstitial telomeric repeats*, ITR) (Majka ir kt., 2018; Maravilla ir kt., 2021).

1.4. Endofitai: apibrėžimas, paplitimas ir klasifikacija

Literatūriniai duomenys rodo, kad endofitai egzistavo jau prieš 400 milijonų metų (Chadha ir kt., 2015; Khairalla ir kt., 2016; Krings ir kt., 2007), o termino „endofitas“ pradininkas yra de Bary, kuris šiuos organizmus apibūdino kaip gyvenančius augalo viduje (Chadha ir kt., 2015; Khairalla ir kt., 2016). Deja, šis terminas taikomas tiek parazitiniams mikroorganizmams, tiek šaknų simbiotams (Petrini, 1991), apimantiems parazitizmą, komensalizmą ir mutualizmą (Stone ir kt., 2012), apibūdinti. Card su kolegomis (2016) siūlo šio termino netaikyti latentiniams patogenams, kurie patekę į organizmą nesukelia ligos simptomų, kol augalas nepatiria streso (Sinclair, 1991), ir saprofitams, kurie maisto medžiagas gauna iš negyvos organinės medžiagos. Dabar šis terminas taikomas mikroorganizmams, kurie kolonizuoja sveikus augalų audinius ir nekelia jiems žalos. Tačiau vėl susiduriama su termino taikymo problema, kuomet endofitas, sudarydamas su augalu simbiozę, pereina prie patogeninio gyvenimo būdo, kai jis priverčiamas prisitaikyti prie šeimininko ar aplinkos sąlygų pokyčių (Firáková ir kt., 2007; Limsuwan ir kt., 2009; Zhou ir kt., 2018). Taip pat simbiotiniai mikroorganizmai po šeimininko mirties priversti tapti saprotrofais (Zhou ir kt., 2018). Endofitiniai grybai skiriasi nuo mikorizinių tuo, kad kolonizuoja vidinius augalo audinius (šaknis, stiebus, lapus) ir neįauga į rizosferą (Khairalla ir kt., 2016).

Šiuo metu manoma, kad beveik visi augalai sudaro simbiozę su endofitiniais mikroorganizmais (Baron ir Rigobelo, 2022; Oono ir kt., 2014; Rajamanikam ir kt., 2017), nes jie paplitę įvairiose sausumos ir vandens ekosistemose: pievose, pasėliuose, dykumose, tundrose, vidutinio klimato ir atogrąžų miškuose, vandens telkiniuose (Arnold, 2007; Arnold ir Lutzoni, 2007; Deutsch ir kt., 2021; Khairalla ir kt., 2016; Renugadevi ir kt., 2021; Riva ir kt., 2022). Endofitiniai mikroorganizmai svarbūs augalų bendrijoms.

Jie padeda augalams prisitaikyti prie aplinkos (Maciá-Vicente ir kt., 2008), toleruoti biotines ir abiotines sąlygas (Bhunjun ir kt., 2024; Jiang ir kt., 2013; Rodriguez ir kt., 2008) mainais į maistines medžiagas (Bamisile ir kt., 2018).

1.4.1 Endofitinių grybų klasifikacija

Manoma, kad pasaulyje yra apie 5 milijonus grybų rūšių, tačiau mažiau kaip 5 % jų aprašyti (Paterson ir kt., 2023). Daugiausia žinomų rūšių priklauso aukšliagrybūnų (Ascomycota; apie 65 000 rūšių) (Taylor ir kt., 2015) ir papėdgrybių (Basidiomycota; apie 41 270 rūšių) (He ir kt., 2022) skyriams.

Endofitiniai grybai skirstomi į dvi funkcines grupes: Clavicipitaceae (klavicipitiniai) ir Nonclavicipitaceae (ne klavicipitiniai) (Purahong ir Hyde, 2011; Rodriguez ir kt., 2008, 2009). Clavicipitaceae grupės endofitai nėra plačiai paplitę tarp augalų, o Nonclavicipitaceae randami platesniame augalų diapazone (Purahong ir Hyde, 2011). Rodriguez su kolegomis (2008, 2009) Clavicipitaceae priskyrė pirmai klasei, o Nonclavicipitaceae grybus – trims klasėms (2, 3 ir 4 klasės). Šias klases sugrupavo pagal šešis kriterijus: augalų bioįvairovę, diapazoną, kolonizuojamus augalo dalių audinius, kolonizuotą plotą, perdavimo būdą (vertikalus ir (arba) horizontalus) ir naudą šeiminkui. Vertikalų endofitų perdavimą įvardiję kaip perdavimą per sėklas, o horizontalų – per vegetatyvines augalo dalis (ūglius), kai endofitų sporos patenka per orą arba per tam tikrą vektorių (Rodriguez ir kt., 2009).

Endofitiniai grybai taip pat gali būti klasifikuojami pagal lytinių ir nelytinių sporų reprodukcijos būdą, kuris gali būti perduodamas vertikaliai arba horizontaliai, arba pagal: 1) infekcijos pasireiškimą (simptomis arba besimptomis); 2) kolonizuotas augalo dalis (šaknų arba ūglių endofitai); 3) mitybos būdą (biotrofiniai arba nekrotrofiniai) (Baron ir Rigobelo, 2022). Vandegrift su bendraautorais (2015) išskyrė tris simbiotų grupes *Agrostis capillaris* audiniuose: 1) *Epichloë* genties, kurie randami augalų antžeminiuose audiniuose; 2) arbuskulinius mikorizinius (AM) grybus, gyvenančius sausumos augalų šaknyse; 3) tamsiuosius septuotuosius (angl. *dark septate endophytes*), kolonizuojančius augalų šaknis.

1.4.2. Endofitinių bakterijų klasifikacija

Manoma, kad mūsų planetoje yra milijardas bakterijų rūšių, iš kurių filogenetiškai žinoma apie 30 000 (Dykhuizen, 2005), priskirtų skirtingoms grupėms pagal G+C kiekį – DNR molekulėje, kuris svyruoja 25–75 % (Baron, 1996; Mesbah ir kt., 2011), ir morfologinius, fiziologinius skirtumus.

Bakterijos pradėtos klasifikuoti dar XIX a. pabaigoje pagal morfologiją, patogeninį potencialą ir augimui reikalingas sąlygas. XX a. pradžioje, be morfologijos, pradėta taikyti skaitmeninė taksonomija: fiziologiniai ir biocheminiai duomenys. To paties amžiaus pabaigoje taikyti chemotaksonominiai ir genotipiniai metodai. Iki šių dienų bakterijos klasifikuojamos taikant genotipinę, viso genomo ir sekų analizės bei nukleotidų tapatumą (Schleifer, 2009).

Fenotipinė klasifikacija. Grupuoiant bakterijas pagal jų morfologiją pirmiausia galima išskirti dvi grupes, pagal sienelės storį. Gramteigiamoms bakterijoms būdinga stora sienelė, o gramneigiamoms – plona (Tetteh ir kt., 2020). Šios grupės atskiriamos pagal Gramo metodą. Gramteigiamos bakterijų sienelės absorbuoja kristalinį violetinį dažą ir įgauna violetinį pigmentą, o gramneigiamos negeba absorbuoti dažo, todėl įgauna rožinį pigmentą (Jurat-Fuentes ir Jackson, 2012).

Taip pat bakterijas galima atskirti į 7 grupes pagal ląstelės formą: 1) ovalios; 2) lazdelės; 3) lenktos; 4) spiralės; 5) lanksčios spiralės; 6) išsišakojusios siūlinės; ir 7) neturinčios stabilios formos (Dye ir kt., 2005; Huang ir kt., 2008b; Yuang, 2007; Zapun ir kt., 2008). Dominuojančios yra 3 formos: kokai, bacilos ir spiralės (Cabeen ir Jacobs-Wagner, 2005).

Genotipinė klasifikacija. Deja, remiantis vien tik bakterijų morfologija negalima tiksliai nustatyti bakterijų rūšies, nes dauguma jų yra fenotipiškai panašios, tačiau genetiškai labai skirtingos (Schleifer, 2009). Šiuolaikiniai metodai bakterijas skirsto į ortologines genų grupes (angl. *Clusters of Orthologous Genes*) pagal filogenetinį visų baltymų komponentų klasifikavimą (Galperin ir kt., 2025), o skaitmeninė operatyvinių taksonominių vienetų (angl. *operational taxonomic units*, OTU) taksonomija bakterijas suskirsto į kategorijas pagal sekos panašumą naudojant 16S rRNR geno seką (Fernández ir kt., 2018; Lundberg ir kt., 2012).

1.5. Endofitinių mikroorganizmų identifikavimo metodai

Pirmas endofitinių mikroorganizmų identifikavimo žingsnis surinkti augalų, kurių audiniai naudojami padermių taksonams nustatyti, pavyzdžius. Dėl skirtingų buveinių biotinių ir abiotinių veiksnių rekomenduojama imti 8 mėginius vienam individui (Yao ir kt., 2019) ir juos sterilinti naudojant fizikinį arba cheminį būdus (Burgdolf ir kt., 2014). O sterilius augalų audinius perkeliant ant grybų kultūroms izoliuoti skirtos terpės, pavyzdžiui, bulvių dekstrozės agaro (PDA) (Cagnano ir kt., 2019; Burgdolf ir kt., 2014), salyklo agaro ekstrakto (MEA) (Li ir kt., 2016), Melin-Norkrans (MMN) (Napitupulu

ir kt., 2022), bakterijoms izoliuoti – ant Murashige Skoog (MS) (Lundberg ir kt., 2012), Luria–Bertani (LB) (Sezonov ir kt., 2007) ar kitos terpės.

Endofitų kolonijos apibūdinamos pagal būdingas savybes: kolonijos augimo greitį, pigmentą, tekstūrą ir formą bei dauginimosi struktūras (Ilyas ir kt., 2019).

Endofitų klasifikacija, grįsta vien tik makro- ir mikrostruktūrų analize, negalima. Toppo su kolegomis (2024) rekomenduoja izoliatam apibūdinti kartu taikyti ir molekulinis metodus. Jie yra labai jautrūs ir specifiški identifikuojant padermes (Sette ir kt., 2006). Molekulinis padermių identifikavimas susideda iš kelių žingsnių: 1) izoliatų gDNR išskyrimo; 2) amplifikacijos, naudojant rDNR vidinį traskribuojamą genų tarpiklį (ITS), taip pat *RPB2*, *TEF-1*, *LSU* ir *SSU*; 3) PGR produkto gryninimo; 4) sekos nustatymo; 5) sekoskaitos rezultatų lyginimo su taksonų sekomis pagrindiniu vietos lygiavimo paieškos įrankiu (BLAST); 6) izoliatų hierarchinio grupavimo (Awad ir kt., 2023; Brown ir kt., 2014; Fischer ir Palmer, 2005; Li ir kt., 2016; Lundberg ir kt., 2012; Toppo ir kt., 2024; Větrovský ir kt., 2016). Vu su kolegomis (2019) rekomenduoja izoliatų sekas klasifikuoti rūšies lygmeniu, jei ITS sekos panašumas yra 99,6 %, o *LSU* – 99,8 %.

Molekuliniame endofitinių mikroorganizmų identifikavimui dažniausiai naudojamas branduolio rDNR genų ITS (Bellemain ir kt., 2010; Schoch ir kt., 2009). ITS regionas sudarytas iš ITS1 ir ITS2 regionų, atskirtų 5.8S genu. Šis regionas yra tarp *LSU* ir *SSU* genų (Bellemain ir kt., 2010; Toju ir kt., 2012). DNR brūkšninio kodo sekos yra universalios (Kiss, 2012), 450–700 bp ilgio, naudojamos kaip grybų atskirų taksonų brūkšninių kodų žymuo (Bellemain ir kt., 2010). Deja, dėl didelio ITS sekų kopijų skaičiaus vienoje ląstelėje, jų nepastovumo ir artimo rūšių filogenetinio giminingumo, kurių ITS sritis skiriasi nuo vienos iki kelių nukleotidų pozicijų (Brown ir kt., 2014; Kiss, 2012), todėl komplikauta ITS seką naudoti grybų klasifikacijai. Įprastai amplifikacijai pasirenkama ITS1 arba ITS2 seka (Bellemain ir kt., 2010), o kad ITS sekų duomenys būtų patikimesni, jos lyginamos poromis, sukuriant sekų porai atstumo matricą (Brown ir kt., 2014). Schoch su kolegomis (2009) patikimai grybų identifikacijai siūlo naudoti alternatyvius DNR regionus, antrinius brūkšninius kodus. Jiems priskiriami baltymus koduojantys genai, pavyzdžiui, β -tubulino II genas (*TUB2*), DNR nukreiptos RNR polimerazės II didysis subvienetas (*RPB1*) ir antras pagal dydį subvienetas (*RPB2*), transliacijos elongacijos faktorius 1 α (*TEF1- α*). Šie genai patikimiau nei ITS regionas identifikuoja rūšis žemesniu taksonominiu lygiu, filogenetiškai labai artimose rūšyse (Schoch ir kt., 2009), kadangi *TEF1- α* yra mažai kintantis genome ir turi didelį sekų polimorfizmą tarp grybų rūšių (Gnat ir kt., 2019), o

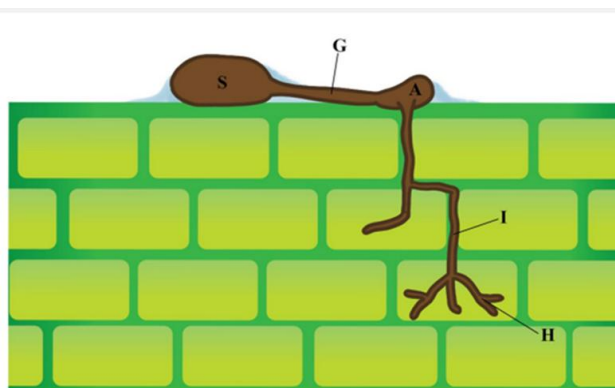
RNR polimerazė atsakinga už baltymus koduojančių genų transkripciją į informacinių ribonukleorūgščių (iRNR) pirmtakus (Matheny ir kt., 2002). Vu su kolegomis (2019) kaip brūkšninį kodų žymenį grybų taksonominiam identifikavimui siūlo ITS, 5.8S geno ir 26S didžiojo subvieneto (*LSU*) D1/D2 domeną.

Kiti plačiai skirtingų taksonų molekulinuose tyrimuose naudojami genai yra branduolio rRNR *LSU* (prokariotuose 23S, eukariotuose 26S didžiojo subvieneto) ir *SSU* (prokariotuose 16S, eukariotuose 18S mažojo subvieneto) genai (Brown ir kt., 2014; Mitchell ir Zuccaro, 2006). *LSU* genas yra šalia ITS2 regiono, o *SSU* – ITS1 (Bellemain ir kt., 2010). Šios sekos yra konservatyvesnės nei ITS regionas, todėl tinkamesnės rūšių taksonomijai tirti. *LSU* geno regionas yra ganėtinai trumpas, o panaudojus 454-pirosekvenavimą galima analizuoti ilgas sekas (Brown ir kt., 2014). *SSU* genas (16S rRNR genas yra *SSU* dalis) sudarytas iš devynių hipervariacinių regionų (V1–V9), kurie tarpusavyje reikšmingai skiriasi, todėl leidžia identifikuoti rūšis pagal kompensacinių bazių pokyčių (angl. *compensatory base change*) analizę, nustatant antrinės spiralės pokyčius, susijusius su nukleotidų bazių pokyčiais (Wardani ir kt., 2025). Šis genas yra 1500 bp ilgio, randamas beveik visose bakterijose ir nekintančios funkcijos (Janda ir Abbott, 2007). Panaudojus OTU, bakterijos skirstomos į grupes pagal sekos panašumą (Fernández ir kt., 2018; Lundberg ir kt., 2012).

1.6. Kolonizacija ir gynybos mechanizmas

Endofitai gali kolonizuoti visas augalų dalis: šaknis, stiebus, lapus, pumpurus, žiedus, vaisius ir sėklas (Cocking, 2003; Ding ir kt., 2017; Gouda ir kt., 2016; Kandel ir kt., 2017a, 2017b; Riseh ir kt., 2025), patekdami į augalų audinius per žioteles, hidatodes, lenticelas, šaknų įtrūkimus, pirmines šakneles, šaknų gumbelius ir žaizdas (Lu ir kt., 2021; Wippel, 2023). Prilipdamos prie šaknų paviršiaus, bakterijos sudaro ląstelių mikrokolonijas ir bioplėveles. Taip kolonizuoja šaknies paviršių. Kolonizuotas plotas gali kisti pagal bakterijos savybes: trūkčiojantį judėjimą, prisitvirtinimą ir augimo greitį. Bakterijos prisitvirtina prie augalo audinių paviršiaus pilėmis, sukibimu, taip pat tarpininkauja polisacharidai. Įsiskverbimas gali būti dviejų tipų: 1) aktyvus, kai bakterijos naudoja prisitvirtinimo ir proliferacijos (populiacijos augimo) mechanizmus ir sienelę ardančius fermentus; 2) pasyvus, kai bakterijos patenka į šaknies audinius per įtrūkimus, žaizdas ar dygstančias šakneles (Ali ir kt., 2023). O endofitiniai grybai įsiskverbia į augalų šaknų audinius išskirdami degradacinius fermentus ir turgoro slėgį (Ji ir kt., 2022). Sąlyčio su

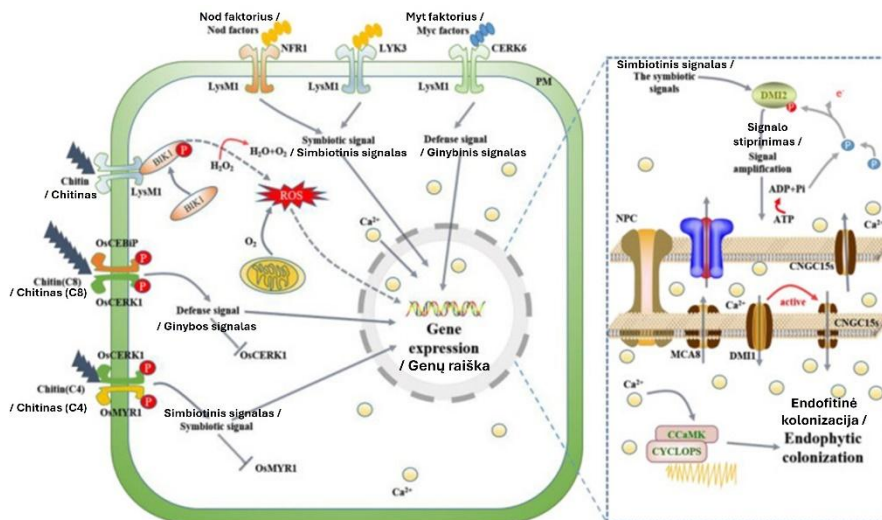
endofitu vietoje augalo ląstelės sienelė modifikuojama, o plazminė membrana sudaro ertmę, per kurią į vidų patenka endofitas, todėl būdami tarp plazminės membranos sluoksnių jie nesiliečia su augalų citoplazma (Lu ir kt., 2021). Grybai į augalo audinius įsiskverbia apresorijumi, esant hifui jo dygimo stadijoje, arba hyphopodia, kai hifai nėra pirminėje dygimo stadijoje ir formuoja micelį (hifo vegetatyvinės struktūros). Apresorijus apibūdinamas kaip organas, panašus į sporą, susiformavęs gemalinių vamzdelių gale, skirtas sukibti ir įsiskverbti. Hyphopodia apibūdinama kaip ląstelinė hifų struktūra, kuri gali neatlikti jokios funkcijos arba tarnauti prisitvirtinimui ir siurbimui (Chethana ir kt., 2021).



1.3 pav. Augalo antžeminės dalies audinių kolonizacijos schema. A – apresorijus, G – gemalo vamzdelis, H – haustorija, I – infekcijos hifai, S – sporos. Pagal Chethana ir kt., 2021.

Fig. 1.3. The above ground part of the plant colonization diagram. A – appressorium, G – germ tube, H – haustoria, I – infection hyphae, S – spores (from Chethana et al., 2021).

Endofitiniai grybai gali patekti į augalo antžeminius audinius per žioteles ar kitas atviras vietas, suardyti augalo ląstelės sienelę ir pakeisti jos struktūrą. Pirmiausia jie išskiria tarpląstelinę medžiagą iš angliavandenių ir polipeptidų, skirtą prisitvirtinti prie augalo paviršiaus. Susidarius sukibimo paviršiui, sporos pradeda dygti. Jos dygsta sudarydamos 3–4 gemalo poras, kurios suformuoja apresorijus. Vėliau iš apresorijų išauga prasiskverbimo daigas, kuris prasiskverbia pro žiotelės angą (Chethana ir kt., 2021) (1.3 pav.). O bakterijos lieka arti savo patekimo taško arba sistemingai išplinta visame augale. Išskirdamos sienelės ardančius fermentus (celiulazę ir pektinazę), juda ląstelių tarpląstelinėje erdvėje žiuželiais (Ali ir kt., 2023).



1.4 pav. Molekulinių mechanizmų schema, kuri rodo augalų simbiotinį arba imuninį atsaką į signalines molekules mikorizinės sąveikos metu. Modifikuota pagal Li ir kt., 2023.

Fig. 1.4 The scheme of molecular mechanisms, which demonstrate the plant's symbiotic or immune response to signaling molecules during mycorrhizal interactions (modified from Li et al., 2023).

Tyrimai rodo, kad mikorizinėje sąveikoje dalyvauja LysM receptoriaus (1.4 pav.), kurį turi daugumos augalų antžeminės dalies audiniai. Jo paviršiuje yra molekulinės struktūros, kurios prisijungdamos prie skirtingų baltymų sudaro specifinius receptorius, kurie siunčia gynybinius arba simbiotinius signalus, todėl LysM receptoriai dalyvauja atpažįstant grybo chitiną ir sukelia imuninį atsaką. Tuo tarpu OsMYR receptoriaus nustato ar tai patogeninis, ar simbiotinis endofitas, tokiu būdu pritraukia naudingus grybus, kurie dalyvauja simbiozėje (Li ir kt., 2023).

1.7. Endofitų biologinis vaidmuo

Endofitiniai mikroorganizmai dažniausiai sudaro simbiotinius ryšius su augalais, suteikdami ilgalaikės naudos šeimininkui ir kurdami šiuos santykius su tam tikra augalų rūšimi (Hardoim ir kt., 2015), o augalai gali būti vieno ar kelių endofitų šeimininkai (Huang ir kt., 2007; Petrini, 1991; Strobel ir Daisy, 2003). Tyrimai rodo, kad endofitai gali skatinti augalų augimą tiesiogiai arba netiesiogiai. Tiesiogiai – didindami maistinių medžiagų prieinamumą, chlorofilo koncentraciją, reguliuodami fitohormonus, aktyvuodami antrinius metabolitus (El-Mahdy ir kt., 2021; Ma ir kt., 2015). Netiesiogiai – mažindami

etileno kiekį augaluose, gamindami antibiotinius junginius ir didindami atsparumą biotiniam ir abiotiniam stresui (Miliute ir kt., 2015).

1.7.1. Endofitų vaidmuo mineralinėje mityboje

Atlikta daug endofitų vaidmens įsisavinant chemines medžiagas tyrimų, nes tai yra viena iš svarbiausių endofitų funkcijų. Tai ypač būdinga endofitiniams šaknų grybams. Palengvindami maistinių medžiagų įsisavinimą, jie skatina augalų šaknis augti (šakniaplaukių ir šoninių šaknų formavimąsi). Dėl to augalas pasisavina daugiau maistinių medžiagų iš dirvožemio, didėja atsparumas biotiniam ir abiotiniam stresui (Kageyama ir kt., 2008; Vergara ir kt., 2018). Nustatyta, kad endofitiniai grybai didina maistinių medžiagų (García-Latorre ir kt., 2021) kaip organinės medžiagos ir angliavandeniai (Newsham, 2011; Vergara ir kt., 2017, 2018) prieinumą, aktyvina tirpių baltymų sintezę (Sun ir kt., 2022). Taip pat didina kalio, fosforo, azoto įsisavinimą ir absorbciją (Ma ir kt., 2024; Wang ir kt., 2022), padeda šeimininkui fiksuoti atmosferos azotą (Ivleva ir kt., 2016), gerina azoto regeneravimą iš amonio sulfato indukuojant OsA5 ir OsA8 izoformas ir stimuliuojant plazminės membranos H-ATPazę ir vakuolės H-pirofosfatazę (Vergara ir kt., 2019). Tyrimai rodo, kad endofitai geba perkelti fosforą iš augalo šaknų į ūglius (Hiruma ir kt., 2016) ir gali veikti kaip geležies donorai (de Santiago ir kt., 2009). Buvo bandyta suprasti, kaip *Piriformospora indica* veikia PiPT geną transportuojant fosforą. Nustatyta, kad PiPT transkriptų yra gausiau išoriniuose endofitinių grybų hifuose nei vidiniuose, todėl fosforas yra gausiai pernešamas iš išorinių hifų į augalo šaknį (Kumar ir kt., 2011).

1.7.2. Endofitų vaidmuo apsaugant augalus nuo žalingo biotinių ir abiotinių veiksnių poveikio

Aplinkos stresas, veikiantis augalus, yra dviejų tipų: biotinis ir abiotinis. Biotinis stresas reiškia žalą, kurią sukelia vabzdžiai, augalai, mikroorganizmai, žolėdžiai, nematodai ir kiti gyviai. O abiotinis stresas apima aplinkos faktorius: dirvožemio, oro ir vandens taršą, sausrą, druskingumą ir šaltį. Aplinkos stresas augalus gali veikti atskirai, kartu vienu metu arba po vieno tipo streso augalas gali patirti kito tipo (Georgieva ir Vassileva, 2023; Tiwari ir kt., 2020).

Endofitai augalus apsaugo nuo biotinių veiksnių gamindami bioaktyvius junginius (antrinius metabolitus, lizinius fermentus, sideraforus), skatindami fitohormonų gamybą, taip sukeldami imuninį atsparumą, taip pat mažindami

patogenui prieinamų maistinių medžiagų įsisavinimą (Chaudhary ir kt., 2022; Devi ir kt., 2020).

Bandyta suprasti endofitų poveikį biotiniam stresui. Endofitų poveikis biotiniams veiksniams įvertintas atlikus, *Epichloë* endofito poveikį prieš miltligę esant skirtingam dirvožemio drėgnumui, vertinimą. Xia su kolegomis (2016) įrodė, kad *Epichloë* endofitas didino chlorofilo kiekį visais dirvožemio drėgmės atvejais, taigi jis gali sumažinti miltligės patogeno *Blumeria graminis* daromą žalą *Achnatherum inebrians* (Poaceae) augalams ir apsaugoti nuo chlorofilo praradimo esant patogeno užkratui. Endofitiniai grybai taip pat didina atsparumą vabzdžiams per du skirtingus mechanizmus: 1) jie gali gaminti alkaloidus prieš vabzdžius – fitofagus; 2) gali skatinti augale susidaryti veiksmingą jazmono rūgštį (JA) prieš fitofagus (Bastias ir kt., 2017). Keisdami su salicilo rūgštimi (SA) susijusių genų ekspresiją, endofitiniai grybai didina augalų atsparumą nematodams (Atia ir kt., 2020). O prieš patogenus gamindami bioaktyvius junginius, pavyzdžiui, *Pseudomonas fluorescence* išskirti 2,4-diacetilflorogliucinolis ir pioluteorinas slopina *Thielaviopsis basicola*, sukeliantį tabako šaknų puvinį (Morales-Cedeño ir kt., 2021). Taip pat išskirdami fermentus, kurie suardo patogeninių mikroorganizmų ląstelių sienelės (Jacob ir kt., 2020), arba aktyvuodami antrinius metabolitus (auksinus, flavonoidus, fitoaleksinus ir gliukozinolatus) mažina patogenų virulentiškumą (Kannoja ir kt., 2019).

Apsaugodami augalus nuo žalingo abiotinių veiksnių poveikio, endofitai skatina augalų fitohormonų gamybą, didina šaknų biomasę ir gerina įsišaknijimą (Li ir kt., 2022; Kyozyuka, 2023; Yuan ir kt., 2025; Nombamba ir kt., 2024). Taip pat aktyvuoja akvaporinus (baltymus), kurie veikia kaip vandens transportavimo kanalai (Adeoye ir kt., 2022). Abu faktoriai didina vandens absorbciją. Taip apsaugo nuo neigiamo sausros poveikio. Salvi su kolegomis (2022) įrodė, kad transkripcijos reguliacija, genų ekspresija ir fitohormonų signalai skatina žioteles užsidaryti, todėl mažėja transpiracija, neutralizuojamos reaktyviosios deguonies rūšys, koreguojama medžiagų apykaita. Nustatyti AM grybų akvaporino genai, atsakingi už vandens absorbciją ir osmosinio slėgio toleranciją ir veikiantys augalų sausros toleranciją (Li ir kt., 2013). Be to, endofitai mažina elektrolitų nuotėkį, taip mažindami neigiamą šilumos streso poveikį augalams (Khan ir kt., 2013). Nustatyta, kad endofitinis grybas *Piriformospora indica* padeda išgyventi *Hordeum vulgare* augalams, esant dideliui druskos stresui (Baltruschat ir kt., 2008).

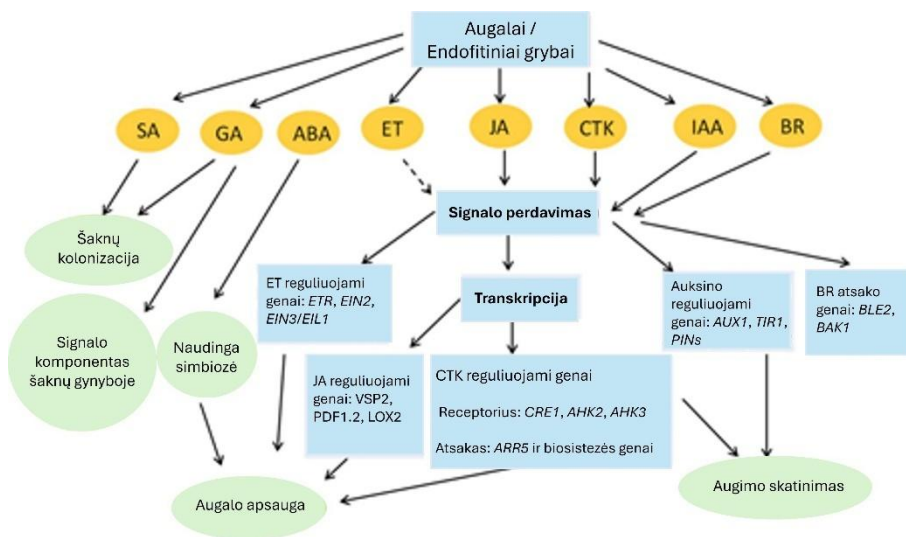
1.7.3. Endofitų vaidmuo augalų fotosintezėi

Endofitiniai grybai gali teigiamai arba neigiamai veikti įvairius fotosintezės parametrus. Pavyzdžiui, Atia su bendraautoriais (2020) nustatė, kad *P. indica* didina chlorofilo koncentraciją, fotosintezės greitį ir vandens įsisavinimą, tačiau mažina transpiracijos greitį. Taip pat yra duomenų, kad endofitai neigiamai veikia fotosintezės efektyvumą: mažėja deguonies koncentracijos pokyčio priklausomybė nuo fotonų srauto tankio; mažėja chlorofilo koncentracija ir maksimalus kvantinis našumas; mažėjant žiotelių varžai didėja transpiracija (Costa Pinto ir kt., 2000). Tirdami *Neotyphodium* grybų įtaką Arizonos eraičinų žiotelių laidumui, Morse su kolegomis (2002) nustatė, kad *Neotyphodium* endofitai mažina žiotelių laidumą, kai mažas vandens prieinamumas, tačiau jie yra žalingi, kai vandens prieinamumas yra pakankamas.

1.7.4 Endofitų poveikis fitohormonų veiklai

Augalų augimą, vystymąsi, žydėjimą, vaisių formavimąsi ir dauginimąsi reguliuoja hormonai, dar vadinami fitohormonais. Pagrindiniai augalų hormonai yra: auksinai, citokininai, giberelinai, etilenas, abscizo rūgštis. Augalų hormonai suskirstyti į tris pagrindines grupes pagal fiziologinį poveikį augalams: 1) vegetatyvinio augimo kontrolė (auksinai (IAA), brasinosteroidai (BR), citokininai (CTK), giberelinai (GA), strigolaktonas (SL)); 2) reprodukcijos kontrolė (abscizo rūgštis (ABA) ir etilenas (ET)); 3) streso reakcija (jazmono (JA) ir salicilo (SA) rūgštys) (Sezgin ir Kahya, 2018).

Fitohormonų gamybą skatina simbiotinis augalų ir endofitinių grybų ryšys, todėl spartėja augalų augimas, šoninių šaknų formavimasis, keičiasi augalų metabolizmas, gerėja augalų apsauga nuo streso. Aktyvuodami atitinkamus genus, viena streso hormonų dalis perduoda signalą, o kita aktyvuoja ir reguliuoja daugialypį atsaką į stresorius (1.5 pav.). Taigi endofitai skatina fitohormonų gamybą, apsaugodami nuo neigiamo streso poveikio (Xu ir kt., 2018).



1.5 pav. Su fitohormonais susijusių procesų, kuriems įtakos turi endofitiniai grybai augaluose, schema. Modifikuota pagal Xu ir kt., 2018.

Fig. 1.5 The processes diagram related to phytohormones which influenced by endophytic fungi in plants (modified from Xu et al., 2018).

Remiantis Sezgin ir Kahya (2018) apžvalga, Turkijoje pirmą kartą fitohormonai panaudoti 1960 metais, kai giberelinu didintas besėklių vynuogių derlius. Taip pat reaguodami į stresą endofitai gali didinti giberelinų ir auksinų koncentraciją, augalų biomasę ir mažinti abscizo rūgšties, JA ir SA koncentraciją (Wu ir kt., 2020) arba gerindami azoto panaudojimą reguliuojant auksino, citokinino ir etileno kiekį (Li ir kt., 2018). Daugelis tyrimų parodė, kad endofitai skatina auksino gamybą skirtingomis koncentracijomis skatindami augalų augimą (Shahzad ir kt., 2017; Suebrasri ir kt., 2020; Watts ir kt., 2023; Zhao ir kt., 2020), citokinino – aktyvindami ląstelių dalijimąsi augalo šaknyse ir ūgliuose (Ortíz-Castro ir kt., 2009), giberelinų – skatindami augalų ūglių (Liao ir kt., 2019) ir šaknų (Tan ir kt., 2019) augimą, abscizo rūgšties – aktyvindami augalų apsaugos mechanizmus nuo streso veiksnių (sausros, druskingumo) įtakos augalams (Cohen ir kt., 2009; Khan ir kt., 2020).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

Reagentai / Reagents:

- Agaras – *Agar-Agar, plant* (Carl Roche, Karlsrühė, Vokietija)
- Agarozė – *Agarose* (Thermo Fisher Scientific Baltics, Vilnius, Lietuva)
- Amonio fosfatas – *Ammonium phosphate, dibasic* 99+% $\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_4\text{P}$ (Thermo Fisher Scientific Baltics, Vilnius, Lietuva)
- Ampicilinas – *Ampicillin* BP1760-25 (Thermo Fisher Scientific Baltics, Vilnius, Lietuva)
- Citrinos rūgštis – *Citric acid* $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ 192,124 g/mol (Thermo Fisher Scientific Baltics, Vilnius, Lietuva)
- Celiuliazė – *Cellulase* R-10 (Duchefa Biochemie, Haarlemas, Nyderlandai)
- DAPI – 4,6-diamidino-2-fenilindolas – *4,6-diamidino-2-phenylindole* (Carl Roche, Karlsrühė, Vokietija)
- Dekstrano sulfato natrio druska – *Dextran sulfate* 500 sodium salt M~500000 g/mol (Carl Roche, Karlsrühė, Vokietija)
- Dekstroze – *Dextrose Anhydrous* (Thermo Fisher Scientific Baltics, Vilnius, Lietuva)
- dNTP mišinys – *dNTP Mix* (Thermo Fisher Scientific Baltics, Vilnius, Lietuva)
- DNR 6X užnešimo dažas – *DNA Loading Dye* (Thermo Fisher Scientific Baltics, Vilnius, Lietuva)
- DNR polimerazė I – *DNA polymerase I* (Thermo Fisher Scientific Baltics, Vilnius, Lietuva)
- DreamTaq DNR polimerazė – *Dream Taq DNA polymerase* (Thermo Fisher Scientific Baltics, Vilnius, Lietuva)
- EcoRI restriktazės fermentas – *EcoRI restriction enzyme* (Thermo Fisher Scientific Baltics, Vilnius, Lietuva)
- Floresceinas – *Fluorescein-12-dUTP* (Thermo Fisher Scientific Baltics, Vilnius, Lietuva)
- Formaldehidai – *Formaldehyde* CH_2O (Thermo Fisher Scientific Baltics, Vilnius, Lietuva)
- Formamidai – *Formamide* 99+% CH_3NO (Thermo Fisher Scientific Baltics, Vilnius, Lietuva)
- Glicerolis – *Glycerol* 99+% $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ (Thermo Fisher Scientific Baltics, Vilnius, Lietuva)

- Gliukozė – D(+) – *Glucose* $C_6H_{12}O_6$ (*Thermo Fisher Scientific Baltics*, Vilnius, Lietuva)
- Indolo-3-sviesto rūgštis – *Indole-3-butyric acid* $C_{12}H_{13}NO_2$ (*Sigma-Aldrich*, Darmštatas, Vokietija)
- Įkėpamosios transliacijos mišinys – *Nick Translation Mix* (*Carl Roche*, Karlsruhė, Vokietija)
- Lizogeninis sultinys (terpė) – *Luria Broth* (*Miller's LB broth*) (*Thermo Fisher Scientific Baltics*, Vilnius, Lietuva)
- Ledinė acto rūgštis – *Acetic acid glacial*, $\geq 99\%$ $C_2H_4O_2$ (*Sigma-Aldrich*, Darmštatas, Vokietija)
- Maceroenzimas – *Macerozyme R-10* (*Duchefa Biochemie*, Haarlemas, Nyderlandai)
- Mount – *Roti®-Mount FlourCare* (*Carl Roche*, Karlsruhė, Vokietija)
- MS terpė – *Murashige & Skoog* (*Duchefa Biochemie*, Haarlemas, Nyderlandai)
- Natrio acetatas – *Sodium acetate* $\geq 99\%$ $C_2H_3NaO_2$ (*Thermo Fisher Scientific Baltics*, Vilnius, Lietuva)
- Natrio chloridas – *Sodium chloride* 99,85 % NaCl (*Thermo Fisher Scientific Baltics*, Vilnius, Lietuva)
- Natrio hidroksidas – *Sodium hydroxide* NaOH (*Thermo Fisher Scientific Baltics*, Vilnius, Lietuva)
- Natrio hipochloritas – *Sodium hypochlorite* NaOCl (*Thermo Fisher Scientific Baltics*, Vilnius, Lietuva)
- Nedenatūruotas etilo alkoholis $\geq 99,8\%$ – *Undenatured ethyl alcohol* (*Mavis*, Vilnius, Lietuva)
- Pektoliazė – *Pektoliazė Y-23* (*Duchefa Biochemie*, Haarlemas, NL)
- Pieno rūgštis – L(+) – *Lactic acid* 90 % $C_3H_6O_3$ 90,08 g/mol (*Thermo Fisher Scientific Baltics*, Vilnius, Lietuva)
- Rodaminas – *Tetramethyl-rhodamine-5-dUTP* (*Carl Roche*, Karlsruhė, Vokietija)
- Sacharozė – D(+) – *Saccharose* $C_{12}H_{22}O_{11}$ 342,30 g/mol (*Carl Roche*, Karlsruhė, Vokietija)
- Natrio dodecilsulfatas – *Sodium Dodecylsulfate*, $C_{12}H_{25}NaO_4S$ 99+% (*Thermo Fisher Scientific Baltics*, Vilnius, Lietuva)
- Sieros rūgštis – *Sulfuric acid* 96 %, H_2SO_4 (*Thermo Fisher Scientific Baltics*, Vilnius, Lietuva)
- Streptomocinas – *Streptomycin Sulfate* BP910-50 (*Thermo Fisher Scientific Baltics*, Vilnius, Lietuva)

- Tri-natrio citrato dihidratas – *Citric acid, trisodium salt hydrate* 99,8 % $C_6H_5NaO_7 \times H_2O$ (*Thermo Fisher Scientific Baltics*, Vilnius, Lietuva)
- Etilendiamintetraacto rūgštis – *ethylenediaminetetraacetic acid, UltraPure™ EDTA*, $C_{10}H_{18}N_2Na_2O_{10}$ (*Thermo Fisher Scientific Baltics*, Vilnius, Lietuva)
- Vektašildas - *VECTASHIELD®* (*Thermo Fisher Scientific Baltics*, Vilnius, Lietuva)
- 6-benzilaminopurinas – *6-Benzylaminopurine* $C_{12}H_{11}N_5$ 225,25 g/mol (*Sigma-Aldrich*, Darmštatas, Vokietija)

Tirpalai / Solutions:

- Fosfatinis buferinis fiziologinis tirpalas / *Phosphate Buffered Saline 10X Solution* (*Thermo Fisher Scientific Baltics*, Vilnius, Lietuva)
- Tris-acetatas-EDTA (TAE) (50×) / *Tris-acetate-EDTA* (*Thermo Fisher Scientific Baltics*, Vilnius, Lietuva)
- Tripano mėlis / *Tryptanblaulösung* 0,4 % (*Carl Roche*, Karlsruhė, Vokietija)

Rinkiniai / Kits:

- Augalų DNR skyrimui / *DNA isolation from plant samples* – DNeasy® Plant Mini Kit (*QIAGEN*, Hildenas, Vokietija)
- Bakterijų ir grybų DNR skyrimui / *DNA isolation from bacteria and fungi samples* – Quick-DNA™ HMW MagBead Kit (*Zymo Research Europe*, Freiburgas, Vokietija)
- PGR valymui / *for PCR purification* – GeneJET PCR Purification Kit (*Thermo Fisher Scientific Baltics*, Vilnius, Lietuva)
- Plazmidės skyrimui / *for plasmid isolation* – GeneJET Plasmid Miniprep Kit (*Thermo Fisher Scientific Baltics*, Vilnius, Lietuva)

Bakterijų kamienai / Bacterial strains:

pTA71 buvo transformuota į *Escherichia coli* kamieną DH5a / *pTA71 was transformed into Escherichia coli strain DH5a* (*Thermo Fisher Scientific Baltics*, Vilnius, Lietuva)

2.1 lentelė. Naudoti pradmenys: Fesreba domenai ir 5S rDNR susintetinti *Thermo Fisher Scientific Baltics*, Vilnius, Lietuva. Telomeros, grybų (ITS, *TEF*, *SSU*, *RPB2*) ir bakterijų (16S rDNR) pradmenys susintetinti *Metabion*, Planegas, Vokietija.

Table 2.1. Primers used: Fesreba domains and 5S rDNA were synthesized by *Thermo Fisher Scientific Baltics*, Vilnius, Lithuania. Telomere, fungal (ITS, *TEF*, *SSU*, *RPB2*) and bacterial (16S rDNA) primers were synthesized by *Metabion*, Planegg, Germany.

Sekos sritis / <i>Locus</i>	Pradmenų pora / <i>Primers</i>	Pradmenų poros seka 5‘-3‘ / <i>Primer Sequences (5’–3’)</i>	T / <i>Tm</i> °C
Trumpų pasikartojančių sekų pradmenų pora / <i>Short repetitive sequence primers</i>			
Telomeros	TEL7 F	TTAGGGTTTAGGGTTTAGGGTTTAGGGTTTAGGGTTTA	55-60
	TEL7 R	CCCTAAACCCTAAACCCTAAACCCTAAACCCTAAACCCT	
Fesreba RT domenas	FES 1.1 F	GGCGCATGTGTGTAGATTGT	55
	FES 1.2 R	ATCACGCAACACTTGCAAAA	
5S rDNR	5S F	GGATGGGTGACCTCCCGGGAAGTCC	55
	5S R	CGCTTAAC TGCGGAGTTCTGATGGG	
Grybų pradmenų pora / <i>Primers for fungal DNA</i>			
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	54
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
<i>TEF</i>	EF1–728F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	54
	EF–2	GGARGTACCAGTSATCATGTT	
<i>SSU</i>	NS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC	49
	NS4	CTTCCGTCAATTCCTTTAAG	
<i>RPB2</i>	RPB2-5F2	GGGGWGAYCAGAAGAAGGC	58
	fRPB2-7cR	CCCATRGCTTGYYTTRCCCAT	

2.1 lentelės tęsinys

Table 2.1 Cont.

Sekos sritis / Locus	Pradmenų pora / Primers	Pradmenų poros seka 5'-3' / Primer Sequences (5'-3')	T / T_m °C
Bakterijų pradmenų pora / Primers for bacterial DNA			
16S rDNR	27f CM 1492R	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG TACGGYTACCTTGTTACGACTT	52
16S rDNR	704F 765R	GTAGCGGTGAAATGCGTAGA CTGTTTGCTCCCCACGCTTTC	56
16S rDNR	S-D-Bact-0341-b-S-17 S-D-Bact-0785-a-A-21	CCTACGGGNGGCWGCAG GACTACHVGGGTATCTAATCC	56

Tiriamieji objektai / *Research objects*:

- Diploidiniai augalai / *Diploid plants* ($2n = 2x = 14$):
 - *Lolium multiflorum* (IPK Leibniz Institute, Gaterslebenas, Vokietija) – augalų kryžminimui / *for plants crossbreeding*
 - *L. multiflorum* ‘Druva’ (State Priekuli Plant Breeding Institute, Priekulė, Latvija) – sėklų inokuliacijai / *for seeds inoculation*
 - *L. multiflorum* ‘Grazer’ (Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centras, Žemdirbystės institutas (LAMMC, ŽI) Akademija, Kėdainių raj., Lietuva) – FISH/GISH ir endofitų tyrimams / *for FISH/GISH and endophytic microorganisms research*
 - *L. perenne* EV (Vilniaus universiteto botanikos sodas, Vilnius, Lietuva) – augalų kryžminimui / *for plants crossbreeding*
 - *L. perenne* ‘Veja’ (LAMMC, ŽI, Akademija, Kėdainių raj., Lietuva) – FISH/GISH ir endofitų tyrimams / *for FISH/GISH and endophytic microorganisms research*
 - *L. temulentum* (IPK Leibniz Institute, Gaterslebenas, Vokietija) – naudota augalų kryžminimui, FISH/GISH ir endofitų tyrimams / *for plants crossbreeding, FISH/GISH and endophytic microorganisms research*
 - *Festuca pratensis* ‘Alanta’ ($2n = 2x = 14$) (LAMMC, ŽI, Akademija, Kėdainių raj., Lietuva) – FISH/GISH ir endofitų tyrimams / *for plants crossbreeding, FISH/GISH and endophytic microorganisms research*
- Heksaploidiniai augalai / *Hexaploid plants* ($2n = 6x = 42$):
 - *F. arundinacea* ‘Monas’ (LAMMC, ŽI, Akademija, Kėdainių raj., Lietuva) – endofitų tyrimams / *for endophytic microorganisms research*
 - *F. gigantea* (Vilniaus universiteto botanikos sodas, Vilnius, Lietuva) – augalų kryžminimui, FISH/GISH ir endofitų tyrimams / *for plants crossbreeding, FISH/GISH and endophytic microorganisms research*
- Autorės sukurti tetraploidiniai ($2n = 4x = 28$) hibridai / *Tetraploid hybrids created by the author* (Vilniaus universiteto botanikos sodas, Vilnius, Lietuva):

- *L. perenne* × *F. gigantea* – naudota FISH/GISH ir endofitų tyrimams / for FISH/GISH and endophytic microorganisms research
- *L. multiflorum* × *F. gigantea*
- *L. temulentum* × *F. gigantea*

2.1. *Festulolium* hibridų kūrimas

Augalų vyriškasis sterilizavimas. Tarpgentiniais hibridams sukurti kaip motininiai buvo naudoti diploidiniai ($2n = 2x = 14$) augalai: *L. temulentum*, *L. perenne* Ev ir *L. multiflorum*. Dalis *Lolium* augalų varpos žiedų buvo pašalinta, atsargiai juos nukerpant nuo viršūnės ir žiedyno apačios. Iš kiekvieno žiedo pašalinta po 3 kuokelius. Toks žiedynas buvo pamerktas į kolbą su vandentiekio vandeniu. Į kiekvieną kolbą merkta po 10–15 žiedynų, kurie apdulkinti heksaploido *F. gigantea* ($2n = 6x = 42$) žiedadulkėmis, prieš tai nukerpant žiedynus ir pamerkiant į aukštesnę kolbą. Kolbos uždengtos popieriniu maišeliu, o apačioje užrištos juostele, kad nepatektų kitų augalų žiedadulkių. Paruoštos kolbos laikytos ant palangės ir kas 1–2 valandas maišelis purtytas. Po dešimties dienų užsimezergusios, nesubrendusios sėklos buvo izoliuotos, atsargiai jas išėmus preparavimo adata, ir laikytos dejonizuotame vandenyje per naktį 2–4 °C temperatūroje.

Murashige & Skoog Medium (MS) terpės gamyba. Gemalams auginti buvo paruošta MS terpė (1 L): 30 g sacharozės, 6 g agarą, 500 ml dejonizuoto vandens, autoklavuota 121 °C 20 min. Į 400 ml MS (3 g MS ir 400 ml dejonizuoto vandens) terpės (pH 5,5) įpilta 400 µl IBA (50 mg IBA, ištirpinta keliuose lašuose 100 % etilo alkoholio, po to įpilta 50 ml dejonizuoto vandens) ir 100 µl BAP (50 mg BAP, ištirpinta keliuose lašuose 1N NaOH, po to įpilta 50 ml dejonizuoto vandens) ir 50 ml dejonizuoto vandens. Į autoklavuotą 500 ml agarą supiltas 500 ml MS ir hormonų tirpalas. Tirpalai išmaišyti. Paruošta MS terpė dozatoriumi išpilstyta po 15 ml į stiklinius mėgintuvėlius. Mėgintuvėliai su terpe uždaryti kamščiais, autoklavuoti 121 °C 20 min., vėliau laikyti 2–4 °C temperatūroje iki panaudojimo.

Nesubrendusių sėklų sterilinimas. Po nakties dejonizuotame vandenyje ir šaldytuve laikytos sėklos buvo sterilinamos 5 % NaOCl ir steriliame vandenyje (1:1) 5 min. ir du kartus skalautos steriliu vandeniu.

Gemalų auginimas *in vitro* MS terpėje. Sterilių nesubrendusių sėklų luobelė pašalinta sterilia preparavimo adata, o gemalai perkelti į paruoštą MS terpę. Hibridai kiekvieną mėnesį buvo persodinami į MS agarą terpę. Kai turėjo 3 lapus, perkelti į puodus, pripildytus komposto ir durpių mišinio,

santykiu 3:1. Sukurti tetraploidiniai *Lolium* spp. $\times$ *F. gigantea* hibridai po pirmos žiemos pasodinti Vilniaus universiteto botanikos sodo eksperimentinį lauką: *L. perenne* $\times$ *F. gigantea* trys hibridai, *L. multiflorum* $\times$ *F. gigantea* – dvidešimt trys ir *L. temulentum* $\times$ *F. gigantea* vienas hibridas. FISH/GISH ir endofitų tyrimams naudoti trys *L. perenne* $\times$ *F. gigantea* hibridai.

2.2. Morfologiniai matavimai

Morfologiniams tyrimams buvo naudojami daugiamečiai *F. gigantea* ir *L. perenne* 'Veja' bei trys *L. perenne* $\times$ *F. gigantea* hibridai, kurie Vilniaus universiteto botanikos sodo eksperimentiniame lauke peržiemojo vieną žiemą. Morfologiniai matavimai atlikti du kartus: augalams esant vegetatyvinėje ir generatyvinėje stadijose. Vertinti hibridų ir jų tėvinių rūšių morfologinių požymių skirtumai.

Analizė atlikta vertinant augalų kiekybinius ir kokybinius požymius. Kiekybiniai požymiai: a) augalo aukštis vegetatyvinėje stadijoje, cm; b) augalo aukštis generatyvinėje stadijoje, cm; c) žiedyno ilgis, cm; d) auselių ilgis, cm; e) centrinio lapo ilgis, cm; f) to paties lapo pamatinės ir centrinės dalies plotis, cm. Kokybiniai požymiai: 1) žiedyno tipas (varpa, stati ar svyranti šluotelė) (2.1 pav.); 2) auselių išreikštumas (neapgaubiančios stiebo, apgaubiančios stiebą ar apgaubiančios stiebą ir susikryžiuojančios) (2.2 pav.); 3) dulkėjimas (silpnai ar gerai dulka).

Žiedynai sugrupuoti pagal tipą: 1) svyranti šluotelė – eraičiniškas; 2) varpa – svidriškas; 3) stati šluotelė – tarpinis tipas.

Matavimai atlikti: 1) pasirinkus stiebo centrinio lapo auseles: matuotos nuo jos galo iki lapo makšties pagrindo; 2) pasirinkus stiebo centrinį lapą: išmatuotas jo ilgis ir plotis; 3) pasirinkus ilgiausią augalo stiebą: išmatuotas augalo aukštis.



2.1. pav. Žiedynų tipai: (A) *L. perenne* varpa, (B) *L. perenne* × *F. gigantea* šluotelė, (C) *F. gigantea* svyranti šluotelė.

Fig. 2.1. Types of inflorescences: (A) *L. perenne* spike, (B) *L. perenne* × *F. gigantea* panicle, (C) *F. gigantea* drooping panicle.

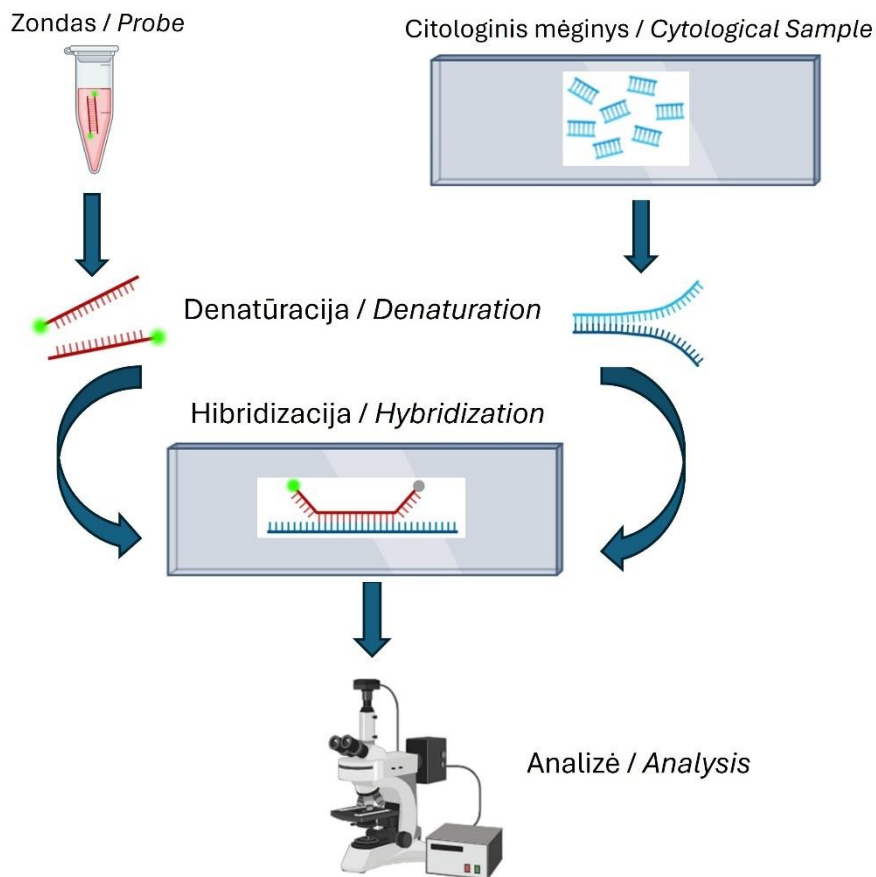


2.2 pav. Lapo auselių tipai: (A) *L. perenne* neapgaubiančios stiebo auselės, (B) *L. perenne* × *F. gigantea* apgaubiančios stiebą auselės, (C) *F. gigantea* apgaubiančios stiebą ir susikryžiuojančios lapo auselės.

Fig. 2.2. Types of leaf auricles: (A) *L. perenne* auricles non-enveloping the leaf, (B) *L. perenne* × *F. gigantea* auricles enveloping the leaf, (C) *F. gigantea* auricles fully enveloping the leaf.

2.3. FISH/GISH metodas

FISH/GISH tyrimams naudoti daugiamečių *F. gigantea*, *F. pratensis* ‘Alanta’, *L. perenne* ‘Veja’, *L. perenne* × *F. gigantea* ir vienmečių *L. multiflorum* ‘Grazer’ bei *L. temulentum* šaknų citologiniai preparatai, kurie buvo hibridizuoti gDNR ir (arba) specifinių sekų zondais. Eksperimento eiga pavaizduota 2.3 pav.



2.3 pav. Fluorescensinės *in situ* hibridizacijos eigos schema.

Fig. 2.3. The diagram of fluorescence *in situ* hybridisation.

2.3.1. Citologinių preparatų ruošimas iš šaknų meristemos

Naujų šaknų gavimas. Buvo pašalintos augalų ūglių šaknys. Ūgliai be šaknų pamerkti į mėgintuvėlius su vandentiekio vandeniu. Kai pasiekė 1–2 cm ilgį, naujos šaknys buvo nukirptos, padėtos ant ledo ir laikytos per naktį 2–4 °C temperatūroje.

Šaknų fiksavimas. Šaknų fiksatorius paruoštas sumaišius ledinę acto rūgštį ir 100 % nedenatūruotą etilo alkoholį (santykiu 1:9). Po 1 ml fiksatoriaus išpilstyta į 1,5 ml Eppendorfo mėgintuvėlius. Tuomet per naktį šaldytuve ant ledo laikytos šaknys, trumpai nusaustos filtriniu popieriumi ir perkeltos į fiksatorių, santykiu viena dalis šaknų ir trys dalys fiksatoriaus. Šaknys fiksatoriuje laikytos 24 valandas kambario temperatūroje (KT), po to 2–4 °C temperatūroje iki panaudojimo.

Buferio gaminimas. Citrinos rūgšties trinatricio citrato dehidrato motininio tirpalo (pH 4,8) gamybai (angl. *citric acid-sodium citrate*) naudoti A ir B tirpalai. A tirpalas: 0,84 g citrinos rūgšties (0,1 M) ištirpinta 40 ml steriliame vandenyje. B tirpalas: 1,74 g trinatricio citrato dehidrato (0,1 M) ištirpinta 60 ml steriliame vandenyje.

Citrinos rūgšties trinatricio citrato dehidrato motininiam tirpalui paruošti sumaišyti A ir B tirpalai (40 ml citrinos rūgšties ir 60 ml trinatricio citrato dehidratas). Sumaišyti tirpalai laikyti šaldytuve 2–4 °C temperatūroje.

Fermentų tirpinimas. Tirpinimui pasverta 0,05 g maceroenzimo R-10, 0,1 g pektoliazės Y-23 ir 0,1 g celiuliazės R-10. Kiekvienas fermentas tirpintas 5 ml citrinos rūgšties trinatricio citrato dehidrato buferyje (1 dalis motininio tirpalo, 9 dalys sterilaus vandens). Ištirpinti pektoliazės ir celiuliazės fermentai sujungti. Po to išpilstyti į 1,5 ml Eppendorfo mėgintuvėlius po 0,5 ml ir laikyti –20 °C temperatūroje iki panaudojimo.

Šaknų minkštinimas fermentais. Šaknys išimtos iš fiksatoriaus ir nusaustos filtriniu popieriumi. Šaknų minkštinimas atliktas naudojant termopurtyklę „Thermo-Shaker TS-100C“ (*Thermo Fisher Scientific Baltics*, Vilnius, Lietuva). Nusaustos šaknys nuplautos 1 ml citrinos rūgšties trinatricio citrato dehidrato buferiu (1 dalis motininio tirpalo, 9 dalys sterilaus vandens) 2 kartus po 10 min. KT 350 rpm greičiu. Po to šaknys perkeltos į 1 ml 0,5 % fermentų mišinį (1 dalis 1 % celiuliazės ir pektoliazės mišinio atskiesta 9 dalimis citrinos rūgšties trinatricio citrato dehidrato buferio) 10 min. arba 0,5 % maceroenzimą (1 dalis 1 % maceroenzimo atskiesta 9 dalimis citrinos rūgšties trinatricio citrato dehidrato buferio) 25 min., 37 °C temperatūroje, 350 rpm greičiu.

Po veikimo fermentais šaknys plautos 1 ml citrinos rūgšties trinatricio citrato dehidrato buferiu 5 min. KT, 350 rpm greičiu, 2 kartus. Nuplautos šaknys užpildos nauju 1 ml citrinos rūgšties trinatricio citrato dehidrato buferiu. Fermentais paveiktos šaknys tą pačią dieną naudotos citologiniam preparatam ruošti.

Citologinių preparatų paruošimas. Objektiniai stikleliai prieš naudojimą trumpam pamerkti į Koplino stiklinę su 100 % etanolio ir išdžiovinti pasvirai

KT. Fermentais paveikta šaknis perkelta ant objekcinio stiklelio. Skutimosi peiliuku labai plonai atpjauta šaknies galo meristema, ant kurios užlašintas lašas 45 % ledinės acto rūgšties ir uždengta 24×24 mm dengiamuoju stikleliu. Preparavimo adatos rankenėlės galu pastuksenta šaknies audinio pjovimo vietoje, kad ląstelės išsisklaidytų. Tuomet stiklelis padėtas tarp dviejų filtrinio popieriaus lapelių ir dar kartą patuksenta preparavimo adatos rankenėlės galu. Galiausiai plačiąją pinceto puse sukamaisiais judesiais švelniai spaudžiant sugertas acto rūgšties perteklius. Taip pat pincetu stipriau paspausta centrinė preparato dalis. Dengiamojo stiklelio ribos pažymėtos deimantiniu pieštuko galu.

Preparatai patikrinti fazokontrastiniu mikroskopu „Nikon ECLIPSE Ci-L“ (*Nikon*, Tokijas, Japonija) $\times 400$ ir $\times 1000$ didinimu. Aptikus geras metafazines chromosomų plokšteles (yra visos chromosomos, vaizdas vienoje plokštumoje, chromosomos nepersidengia), preparatui suteiktas numeris ir užfiksuotos koordinatės. Tinkamos kokybės preparatai laikyti kelias dienas $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tada perkelti 30 minučių $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ šaldiklį. Išėmus iš $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ šaldiklio, perkelti ant šalto metalinio stovelio ir staigiu judesiu skalpeliu nuplėšti dengiamieji stikleliai. Preparatai sustatyti pasvirai nudžiovinti KT. Nudžiūvę preparatai laikyti $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje iki panaudojimo. Prieš naudojant FISH/GISH, preparatai patikrinti fazokontrastiniu mikroskopu, ar išliko geros metafazinės chromosomų plokštelės.

2.3.2. Telomerinių, centromerinių ir 5S rDNR sekų gausinimas

Telomerinės sekos pagausintos naudojant dvi telomerinių sekų pradmenų poras METABION (2.1 lentelė). Jie yra vienas kitam komplementarūs, todėl kaip matrica genomine DNR nenaudota. Fesreba ir 5S rDNR sekoms pagausinti kaip matricos naudotos *F. gigantea*, *F. pratensis*, *L. multiflorum*, *L. perenne* ir *L. temulentum* bendros gDNR, o pradmenų sintezė atlikta METABION (2.1 lentelė). Augalų gDNR išskirta naudojant rinkinį „DNeasy Plant Mini Kit“ pagal gamintojo protokolą su vienu pakeitimu. Paskutiniame žingsnyje eliacija atlikta ne vieną kartą pilant 100 μl , o du kartus: pilant 60 μl ir 30 μl eliacijos buferio. DNR koncentracija patikrinta spektrofotometru „NanoDrop™ One/OneC“ (*Thermo Fisher Scientific Baltics*, Vilnius, Lietuva).

PGR reakcija vykdyta 50 μl tūryje. Telomerinėms sekoms pagausinti naudotas reakcijos mišinys: po 5 μl dNTP mišinio (2,0 mM) ir DreamTaq polimerazės buferio (10 $\times$), po 10 μl pradmens F ir R (2,5 mM), 19,6 μl dejonizuoto, sterilaus vandens ir 0,4 μl DreamTaq polimerazės (5 U/ μl).

Fesreba ir 5S sekoms pagausinti naudotas reakcijos mišinys: 7,5 µl gDNR (10 ng/µl), po 5 µl dNTP mišinio (2,0 mM), DreamTaq polimerazės buferio (10×), pradmenys F ir R (2,5 mM), 22,1 µl dejonizuoto, sterilaus vandens ir 0,4 µl DreamTaq polimerazės (5 U/µl). Reagentų koncentracija ir kiekis parinkti pagal gamintojo rekomendacijas. PGR reakcija atlikta termocikleriu „ProFlex™ PCR System, 3 x 32-well“ (*Thermo Fisher Scientific Baltics*, Vilnius, Lietuva).

Naudota telomerinių sekų PGR programa: 3 min./94 °C pirminė DNR denatūracija; 15 ciklų: 1 min./94 °C DNR denatūracija, 30 sek./55 °C pradmenų prijungimas, 1 min./72 °C DNR sintezė; 40 ciklų: 1 min./94 °C DNR denatūracija, 30 sek./60 °C pradmenų prijungimas, 1 min./72 °C DNR sintezė; 4 min./72 °C galutinis grandinės ilginimas.

Naudota Fesreba ir 5S rDNR sekų PGR programa: 3 min./94 °C pirminė DNR denatūracija; 35 ciklai: 1 min./94 °C DNR denatūracija, 30 sek./55 °C pradmenų prijungimas, 1 min./72 °C DNR sintezė; 4 min./72 °C galutinis grandinės ilginimas.

Po PGR reakcijos atlikta elektroforezė 1 % agarozės gelyje 1×TAE buferyje, kad patikrintume, ar susidarė reikiamo ilgio produktas. Į gelio šulinėlius pilta po 3 µL mėginio. Elektroforezė atliekama 90 V įtampoje 30 min. Po amplifikacijos PGR produktai laikyti 2–4 °C temperatūroje.

Zondams gaminti naudotas PGR mišinys, išgrynintas „GeneJET PCR Purification Kit“ pagal gamintojo nurodymus su vienu pakeitimu. Paskutiniame žingsnyje eliacija atlikta ne vieną kartą pilant 50 µl, o du kartus pilant po 17 µl eliacijos buferio.

2.3.3. pTA71 plazmidės panaudojimas 18S-5.8S-26S rDNR žymėti

Plazmidė pTA71 yra pAC184 plazmidė, į kurią per restriktazės *EcoRI* kirpimo saitą įterptas 9 kb dydžio kviečių rDNR fragmentas (Gerlach ir Bedbrook, 1979). Ši plazmidė laboratorijoje saugota –80 °C glicerolyje užšaldytose *Escherichia coli* DH5α bakterijose. Kultūra buvo atnaujinta ją užsėjant ant lizogeninio sultinio (LB) terpės, pagamintos naudojant 25 g LB, 15 g agarą ir 1 L dejonizuoto vandens, autoklavuota 121 °C temperatūroje 15 min., po to papildyta ampicilinu (~50 µg/ml). Kultūra auginta apie 16 val. 37 °C. Viena diskreti kolonija buvo persėta į 5 ml LB terpę, nepapildytą agarą, su ampicilinu (~50 µg/ml) ir auginta purtyklėje „Eppendorf New Brunswick Innova® 42/42R“ (*Thermo Fisher Scientific Baltics*, Vilnius, Lietuva) 16 val. 37 °C. Iš šių bakterijų išskirta plazmidinė DNR naudojant rinkinį „GeneJet Plasmid Miniprep Kit“, pagal gamintojo nurodytą protokolą.

Zondo gamybai naudota pTA71 plazmidė, perkirpta *EcoRI* restriktaze. Plazmidės perkirpimui naudota 10 µl plazmidės DNR, 5 µl *EcoRI* buferio, 3 µl *EcoRI* restriktazės, 32 µl dejonizuoto vandens. Laikyta 37 °C termostate apie 1 val. Plazmidės perkirpimas tikrintas leidžiant 3 µl restrikcijos produkto elektroforeze (1×TAE) 1 % agarozės gelyje. DNR dažyta ~1 µl 6x DNR užnešimo dažų DNA Loading Dye.

2.3.4. Zondų ženklimas fluorochromais

Genominiai ir specifinių sekų zondai buvo ženklinami įkėrpamosios transliacijos (angl. *nick translation*) būdu. Naudoti du fluorescuojantys nukleotidai: tetramethyl-rhodamine-5-dUTP – raudonai ir fluorescein-12-dUTP – žaliai. Gaminant genominius zondus, žymėjimui imta *L. multiflorum*, *L. perenne*, *L. temulentum*, *F. pratensis* ir *F. gigantea* DNR.

gDNR mechaninis smulkinimas. DNR, kurios koncentracija buvo daugiau nei 400 ng/µl, įpilta į tuščią Eppendorfo mėgintuvėlį po 20 µl. Mėgintuvėliai įdėti į plaustą ir puodą su verdančiu vandeniu 10 minučių. Susmulkinta DNR buvo patikrinama atliekant elektroforezę 1 % agarozės gelyje. Zondams žymėti parinkta 300–2500 bp DNR frakcija.

Dezoksinukleotidų mišinio paruošimas (5×dNTP mix). Buvo sumaišyti du dNTP mix su skirtingais fluoroforais (bendras tūris 50 µl), vienam naudojant rodaminą, kitam, fluoresceiną. Rodamino dNTP mišiniui paruošti į Eppendorfo mėgintuvėlį dėta 4 µl tetramethyl-rhodamine-5-dUTP (1 mM), po 5 µl dATP (2,5 mM), dCTP (2,5 mM) ir dGTP (2,5 mM), 3,4 µl dTTP ir 19 µl sterilaus, dejonizuoto vandens. Fluoresceino dNTP mišiniui paruošti į Eppendorfo mėgintuvėlį dėta 10 µl fluorescein-12-dUTP (1 mM), po 5 µl dATP (2,5 mM), dCTP (2,5 mM) ir dGTP (2,5 mM), 1 µl dTTP ir 9 µl sterilaus, dejonizuoto vandens. Mišiniai laikyti –20 °C.

Zondų ženklimas fluorochromais. Paruošti du reakcijos mišiniai. Tetramethyl-rhodamine-5-dUTP ženklintas mišinys: 5 µl skaldyta DNR arba PGR produktas (Fesreba, 5S rDNR arba telomerinė seka) arba 45S rDNR, 8 µl 5×dNTP mix, 8 µl įkėrpamosios transliacijos mišinys ir 19 µl sterilus, dejonizuotas vanduo. Fluorescein-12-dUTP ženklintas mišinys: 10 µl skaldyta DNR arba PGR produktas (Fesreba, 5S rDNR arba telomerinė seka) arba 45S rDNR, 12 µl 5×dNTP mix, 8 µl įkėrpamosios transliacijos mišinys, 1 µl DNR polimerazė I ir 9 µl sterilus, dejonizuotas vanduo.

Ženklinti zondų mišiniai inkubuoti 3 val. 15 °C. Po inkubacijos reakcija stabdyta pilant 2 µl EDTA (0,5M pH 8,0) ir inkubuojant vandens vonelėje 5 minutes 65 °C. DNR išsodinta pilant 4 µl (3M) natrio acetato ir 120 µl 100 %

–20 °C nedematūruoto etilo alkoholio. Mišinys laikytas per naktį –20 °C. Tuomet mėginiai centrifuguoti 13000×g greičiu 20 min. naudojant „Eppendorf centrifuge 5425“ (*Thermo Fisher Scientific Baltics*, Vilnius, Lietuva). Eppendorfo automatinė pipetė (*Thermo Fisher Scientific Baltics*, kat. Nr. P005-03, Vilnius, Lietuva) supernatantas atsargiai nusiurbtas, o jo likučiai išgarinti laikant 37 °C temperatūroje. Išgaravus supernatantui, lėtai užpilta 400 µl šalto 70 % –20 °C etanolio ir laikyta 30 min. Vėliau centrifuguota 13000×g greičiu „Eppendorf centrifuge 5425“ (*Thermo Fisher Scientific Baltics*, Vilnius, Lietuva) 15 min. Supernatantas nusiurbtas, o jo likučiai nugarinti 37 °C temperatūroje. Nuosėdos ištirpintos 20–25 µl steriliame dejonizuotame vandenyje.

Ženklintos DNR tikrinimas. Buvo paruoštas 1 litras 20×natrio chlorido-natrio citrato (20×SSC) (angl. *saline-sodium citrate*, SSC) tirpalas (pH 7,0). Jam paruošti buvo pagaminti du tirpalai, kurie kaitinti, kol ištirpo medžiagos. Kai atvėso, tirpalai sumaišyti. A tirpalas: 600 ml dejonizuotas vanduo ir 175,4 g 3M natrio chloridas. B tirpalas: 200 ml dejonizuotas vanduo ir 77,42 g 0,3M trinatricio citrato dihidratas. Sumaišius tirpalus, pripilta dejonizuoto vandens iki 1 litro. Tirpalo pH reguliuoti naudotas tirpalas (10 ml dejonizuoto vandens ir 10 ml HCl). pH matuotas su „METTLER TOLEDO S220-Uni-Kit SevenCompact™“ (*Carl Roche*, Karlsruhe, Vokietija). Paruoštas tirpalas laikytas KT.

Paženklinta DNR buvo tikrinama ant nailono membranos fluorescensiniu mikroskopu „Nikon ECLIPSE Ci-L“ (*Nikon*, Tokijas, Japonija), pasirinkus ×600 didinimą. Nailono membranos gabalėlis (24 × 50 mm dydžio) merktas į Koplino stiklinę 1 min. 60 °C 2×SSC buferį (skiestas dejonizuotu vandeniu 20×SSC tirpalas). Po to membrana buvo dedama ant objekcinio stiklelio ir užlašinta 0,6 µl žymėtos DNR (zondo). Membrana su stikleliu grąžinta atgal į Koplino stiklinę 60 °C 2×SSC 10 min. DNR lašo fluorescencija įverta naudojant atitinkamą filtrą. Hibridizacijai pasirinkta geriausiai fluorescuojanti DNR.

2.3.5. Fluorescencinė *in situ* hibridizacija

Metafazinių chromosomų preparatai su nuplėštais dengiamaisiais stikleliais buvo išimti iš –20 °C ir laikyti pasvirai KT, kol nudžius. Po to perplauti du kartus 2×SSC (20×SSC ir dejonizuotas vanduo) po 5 min. 37 °C ir išdžiovinti KT. Perplauti preparatai buvo pamerkti į Koplino stiklinę su 70 % formamidu (42 ml formamido ir 18 ml 2×SSC) ir denatūruoti 70 °C vandens vonelėje

2 min., perplauti šalto etanolio (–20 °C) serija po 2 min.: 70 %, 90 % ir 100 %. Po to išdžiovinti laikant pasvirai KT.

Kol preparatai buvo džiovinami, paruoštas hibridizacijos mišinys. Į tuščią Eppendorfo mėgintuvėlį įpilta 25 µl FISH hibridizacijos mišinio (25 ml 100 % formamido, 5 g 10 % dekstrano sulfato (2,5 g dekstrano sulfatas ir 5 ml dejonizuotas vanduo), 5 ml 20×SSC ir 0,13 g natrio dodecilsulfato; V = 50 ml) ir 2 µl zondo, ženklinto rodaminu arba fluoresceinu. Paruoštas hibridizacijos mišinys denatūruotas 73 °C vandens vonelėje 10 min. Po to perkeltas ant ledo 5 min.

Ant išdžiūvusio metafazinių chromosomų preparato buvo dedamas visas paruoštas hibridizacijos mišinys, 27 µl, ir uždėtas 22 × 22 mm dengiamasis stiklelis. Toks preparatas inkubuotas 37 °C drėgnoje aplinkoje per naktį. Po inkubacijos preparatas buvo plaunamas 37 °C 2×SSC du kartus po 5 min. ir du kartus trumpai perplautas dejonizuotu vandeniu. Galiausiai išdžiovintas KT. Ant išdžiūvusio preparato buvo lašinama 35 µl Mount, DAPI ir Vectashield mišinio (1:1:1) ir uždengta 24 × 50 mm dengiamuoju stikleliu.

Fluorescensija įvertinta fluorescenciniu mikroskopu „Nikon ECLIPSE Ci-L“ (*Nikon*, Tokijas, Japonija) naudojant ×600 ir ×1000 didinimą. Fluorescensija vertinta trimis šviesos filtrais („Semrock“): DAPI (sužadinimas – 330–380 nm, emisija – 400 nm, beržeras – 410 nm); fluoresceino (sužadinimas – 470–500 nm, emisija – 505 nm, beržeras – 510 nm); rodamino (sužadinimas – 540–570 nm, emisija – 575 nm, beržeras – 580 nm).

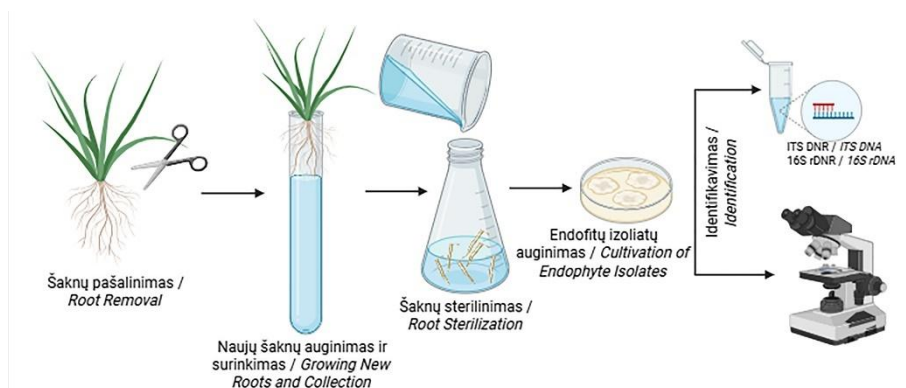
gDNR zondams sukurti buvo naudojama rūšių bendra gDNR, ženklinta raudonai fluoresuojančiu rodaminu arba žaliai fluoresuojančiu floresceinu. Po gDNR zondų hibridizacijos buvo atlikta alopoliploidinių rūšių citologinių preparatų analizė: 1) suskaičiuotos vientisos chromosomos, paveldėtos iš svidrės ir/arba eraičino; 2) suskaičiuotos rekombinantinės chromosomos, turinčios *Lolium* ir *Festuca* chromosomų segmentų; 3) nustatytas gDNR hibridizacijos signalo intensyvumas; 4) apskaičiuotos alopoliploidinių rūšių genomo komponentų dalys.

Festuca, *Lolium* ir *L. perenne* × *F. gigantea* citologiniai preparatai buvo hibridizuoti centromeriniu RT, telomeriniu, 5S ir 45S rDNR zondais, ženklintais skirtingais fluorochromais. Fesreba centromeriniai zondai buvo gaminti naudojant pradmenų porą (lentelė 2.1), amplifikuotą naudojant retrotranspozono atvirkštinės transkriptazės (RT) geną ir gDNR matricą. Telomeriniai sekai pagausinti buvo naudojama *Arabidopsis* tipo telomerinė seka (lentelė 2.1). Analizei atlikti buvo: 1) suskaičiuoti centromeriniai signalai ir įvertintas jų intensyvumas; 2) įvertinta telomerų padėtis chromosomose;

3) suskaičiuoti 5S ir 45S rDNR fragmentai; 4) nustatytas centromerų ir telomerų išsidėstymas interfaziniuose branduoliuose.

2.4. Endofitų identifikavimas

Endofitinių mikroorganizmų izoliavimo ir identifikavimo tyrimo eiga pateikta 2.4 pav. Tyrimo kiekvienas etapas aprašytas tolesniuose poskyriuose.



2.4 pav. Endofitų izoliavimo ir identifikavimo eigos schema.

Fig. 2.4. The diagram of endophyte isolation and identification.

2.4.1. Šaknų surinkimas ir sterilinimas

Endofitiniams mikroorganizmams išskirti buvo naudojami jaunų augalų ūgliai (2.2 lentelė), kurie auginti Vilniaus universiteto botanikos sodo eksperimentiniame lauke. Šaknų mėginiai buvo renkami gegužės–birželio mėnesiais iš eksperimentinio lauko augalų. Buvo paimti 25–30 kiekvienos rūšies augalų šaknų mėginiai, paimant iš kiekvieno po tris ūglius su šaknimis. Augalų ūgliai nuplauti po tekančiu vandentiekio vandeniu ir pašalintos visos senos šaknys. Tokie ūgliai buvo merkami į stiklinius mėgintuvėlius, pripildytus vandentiekio vandeniu.

Naujos 1–2 cm ilgio šaknys buvo surinktos į sterilius indus ir sterilintas jų paviršius tokia eiga: 90 s 50 % etanolyje, 90 s 1,25 % NaOCl, 3 kartus po 3 min. plautos steriliu vandeniu. Trečiojo plovimo vanduo buvo pilamas į tris Petri lėkštes su PDA arba LB terpe po 200 µl, kurios buvo naudojamos kaip neigiama kontrolė, siekiant patvirtinti, kad šaknys tinkamai sterilintos.

2.2 lentelė. Tiriamų augalų rūšių sąrašas.

Table 2.2. List of plant species assessed.

Tiriamos rūšys / <i>Species</i>	Ploidiškumas / <i>Ploidy Level</i>	Augimo tipas / <i>Growth Type</i>	Buveinė / <i>Habitat Type</i>
<i>F. gigantea</i> <i>N</i> = 25	2n = 6x = 42	Daugiametis / <i>Perennial</i>	Miškų bendrijos / <i>Forest communities</i>
<i>F. arundinacea</i> ‘Monas’ <i>N</i> = 30	2n = 6x = 42	Daugiametis / <i>Perennial</i>	Pievų bendrijos / <i>Meadow communities</i>
<i>F. pratensis</i> ‘Alanta’ <i>N</i> = 25	2n = 2x = 14	Daugiametis / <i>Perennial</i>	Pievų bendrijos / <i>Meadow communities</i>
<i>L. multiflorum</i> ‘Grazer’ <i>N</i> = 25	2n = 2x = 14	Vienmetis / <i>Annual</i>	Pievų bendrijos / <i>Meadow communities</i>
<i>L. temulentum</i> <i>N</i> = 25	2n = 2x = 14	Vienmetis / <i>Annual</i>	Pasėliai / <i>Agricultural fields</i>
<i>L. perenne</i> ‘Veja’ <i>N</i> = 25	2n = 2x = 14	Daugiametis / <i>Perennial</i>	Pievų bendrijos / <i>Meadow communities</i>
<i>L. perenne</i> × <i>F. gigantea</i> <i>N</i> = 25	2n = 4x = 28	Daugiametis / <i>Perennial</i>	Pievų bendrijos / <i>Meadow communities</i>

2.4.2. Endofitinių grybų dažnio skaičiavimas

Endofitinių grybų dažniui nustatyti naudotos naujos augalų šaknys, aprašytos 2.4.1 skyriuje, praleidžiant sterilizavimo etapą. Šaknų mėginiai buvo dedami į 1,5 ml Eppendorfo mėgintuvėlius su etanolio ir ledinės acto rūgšties fiksatoriumi (3:1), laikyti 2–3 °C iki panaudojimo. Prieš mikroskopavimą šaknys buvo suminkštintos fermentu tokia eiga: du kartus plautos citrinų rūgšties ir natrio citrato buferiu (0,1 M, pH 4,8) praskiestu dejonizuotu vandeniu santykiu 1:9 27–28 °C temperatūroje 10 minučių ir veiktos 0,5 % maceroenzimo R-10 37 °C temperatūroje 25 min.

Vėliau šaknys buvo plaunamos citrinų rūgšties ir natrio citrato buferiu du kartus po 5 min. ir nudažytos 0,025 % Tripano mėliu 90 °C 30 min., po to tris kartus balintos pieno rūgšties ir glicerolio mišiniu (1:1). Pirmus du kartus šaknys balintos 37 °C temperatūroje 30 min., o trečią kartą – KT 24 val.

Nustatant tiriamų rūšių endofitų kolonizacijos dažnį, mikroskopinei analizei, buvo naudojami ploni šaknų galų pjūviai ($N = 120$ kiekvienai rūšiai), kurie dėti ant objektinių stiklelių, užlašinta glicerolio ir pieno rūgšties mišinio (1:4). Vertinta fazokontrastiniu mikroskopu „Nikon ECLIPSE Ci-L“ (*Nikon*, Tokijas, Japonija) vertinant 10 matymo laukų kiekvienai šakniai (buvo grybinių struktūrų arba nebuvo) esant $\times 400$ didinimui.

2.4.3. Endofitinių grybų izoliavimas

Bulvių dekstrozės agarą (PDA) terpei gaminti naudota 200 g nuskustų, supjaustytų bulvių, kurios buvo virtos 1 l dejonizuotame vandenyje 30 min. Išvirusios bulvės filtruotos per medicininę marlę, taupant skystį. Bulvių nuoviras supiltas į kūgines kolbas po 200 ml, įpilant po 4 g dekstrozės ir 4 g agaro, autoklavuota 121 °C temperatūroje 20 min. Po autoklavavimo terpė buvo papildyta ampicilino natrio druska (galutinė koncentracija – 100 µg/ml) ir streptomicino sulfatu (galutinė koncentracija – 100 µg/ml), kad būtų selektyviai slopintas bakterijų augimas.

Endofitiniam grybam auginti naudota po $N = 200$ –250 kiekvienos rūšies šaknų mėginių, kurie paimti iš 25–30 augalų (2.4.1 skyrius). Į kiekvieną Petri lėkštelę su PDA terpe buvo dedama po penkis sterilių šaknų mėginius, kurių paviršius buvo pažeistas sterilia adata, kad lengviau dauginėtusi endofitiniai grybai, ir inkubuota tamsoje 27 °C temperatūroje. Po 7–14 dienų inkubavimo pastebėtos ant šaknų mėginių augančios grybų kolonijos.

2.4.4. Endofitinių bakterijų izoliavimas

Bakterijų kultūroms užauginti naudota 25 g Luria Broth (Miller's LB broth) (LB) miltelių, ištirpintų 1 litre dejonizuoto vandens ir autoklavuotų 121 °C temperatūroje 15 min. Paruošti sterilūs šaknų mėginiai, kaip aprašyta 2.4.1 skyriuje, $N = 100$ kiekvienos rūšies, paimta iš 25–30 augalų. Mėginiai inkubuoti Petri lėkštelėse su LB terpe 37 °C temperatūroje tamsoje. Po 1–2 dienų inkubavimo ant šaknų mėginių pastebėtos bakterijų kolonijos.

2.4.5. Endofitinių grybų ir bakterijų DNR išskyrimas

Grybų ir bakterijų gDNR išskirta naudojant rinkinį „Quick-DNA™ HMW MagBead Kit“ vadovaujantis gamintojo gairėmis.

Grybų gDNR išskirti naudotos 10 dienų izoliatų kolonijos, kurios užaugintos ant PDA terpės, paimant 100 mg jų biomasės, o bakterijoms – 1–

2 dienų kultūros, kurios prieš DNR išskyrimą buvo auginamos skystoje LB terpėje, kitą dieną išskiriant jų gDNR.

2.4.6. PGR reakcija ir sekoskaita

Standartinei DNR amplifikacijai naudotų pradmenų poros išvardytos 2.1 lentelėje. DNR amplifikacijai buvo naudotas 50 µl bendro PGR mišinio tūris. PGR reakcija buvo atlikta 94 °C temperatūroje 3 min., 35 ciklai 94 °C temperatūroje 30 sek., 49–61 °C [apskaičiuota pagal pradmenų $T_a = T_m - (0-4\text{ °C})$] 30 sek. ir 72 °C 1 min. ir 72 °C temperatūroje 5 min. esant galutinei fazei.

PGR reakcijos produktai buvo išgryninti naudojant rinkinį „GeneJET PCR Purification Kit“. Sekoskaitą atliko „BaseClear B. V.“, Leidenas, Nyderlandai. Endofitinių mikroorganizmų izoliatų sekos buvo analizuojamos pagal NCBI nurodytus duomenis naudojant įrankį BLAST (versija 2.16.0) <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (prieiga 2024 m. rugpjūčio 26 d.).

2.4.7. Endofitinių mikroorganizmų morfologinis apibūdinimas

Izoliavus endofitinių mikroorganizmų kolonijas ir jas taksonomiškai patvirtinus, kolonijos buvo apibūdintos pagal morfologines savybes. Grybų kolonijos buvo vertinamos pagal formą, spalvą, kolonijos kraštą, o mikroskopiškai – pagal hifų pigmentaciją ir segmentaciją, sporų dydį ir formą ir kitus požymius. Grybų kolonijų nuotraukos padarytos fotoaparatu „Sony Alpha a6300“ (*Sony Corporation*, Tokijas, Japonija) su objektyvu „Sigma 56 mm f/1.4“ (*Sony Corporation*, Tokijas, Japonija). Bakterijų kolonijos buvo apibūdinamos pagal spalvą, formą ir kolonijos kraštą. Grybų micelio mėginiams analizuoti ir fotografuoti buvo naudojamas glicerolio ir pieno rūgšties mišinys (1:4) ir fazokontrastinis mikroskopas „Nikon ECLIPSE Ci-L“ (*Nikon*, Tokijas, Japonija).

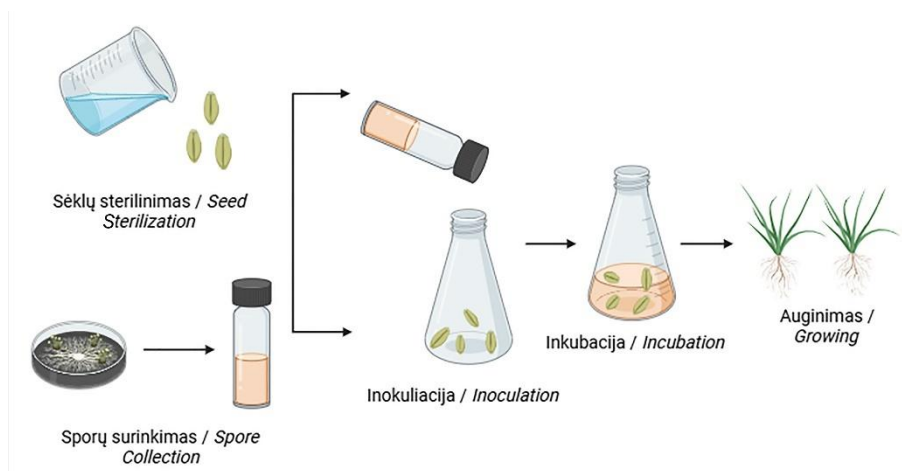
2.4.8. Statistinė analizė

Izoliatų dažnis (IF) buvo apskaičiuotas išskirtų endofitinių grybų ar bakterijų padermių skaičių padalinus iš bendro izoliatų skaičiaus ir padauginus iš 100 %. Parametras naudotas endofitinių rūšių dominavimui nustatyti.

Margalefo indeksas $D = (S - 1)/\ln N$ buvo naudojamas taksonų turtingumui analizuoti. Kai S yra bendras taksonų skaičius, o N – bendras izoliatų skaičius. Parametrai buvo apskaičiuoti pagal formulę, kurią naudojo Song su bendraautoriais (2023).

2.5. *L. multiflorum* sėklų inokuliavimas endofitiniais grybais

Lolium multiflorum 'Druva' sėklų inokuliacijai buvo naudojami mūsų laboratorijos kolekcijos endofitiniai grybai: *Cadophora fastigiata* BSG003, izoliuotas iš *F. gigantea*, *Paraphoma fimeti* BSG010 ir *Plectosphaerella cucumerina* BSG006, izoliuoti iš *L. perenne* × *F. gigantea*, 14 dienų izoliatų kultūros, augintos PDA terpėje. *P. cucumerina* pasirinktas kaip potogeninis (Carlucci ir kt., 2012; Uecker, 1993), *P. fimeti* kaip patogeninis ir endofitinis grybas (Moslemi ir kt., 2018; Roustaei ir kt., 2000), o *C. fastigiata* kaip endofitinis, kuris randamas daugelyje augalų šaknų (Knapp ir kt., 2012). Inokuliacijos eksperimento eiga iliustruota 2.5 pav., kurio etapai aprašyti tolesniuose poskyriuose.



2.5 pav. *L. multiflorum* sėklų inokuliavimo endofitiniais grybais schema.

Fig. 2.5. Diagram for inoculation of *L. multiflorum* seeds with endophytic fungi.

2.5.1. *C. fastigiata*, *P. fimeti*, *P. cucumerina* sporų suspensijos paruošimas

Kiekvienai grybo padermei buvo paruošta po penkiolika Petri lėkštelių, ant kurių užpilta po 4 ml sterilaus vandens; sporos paskleistos ir surinktos į sterilius mėgintuvėlius, švelniai braukiant jas Eppendorf automatinės pipetės antgaliu (*Thermo Fisher Scientific Baltics*, kat. Nr. P005-03, Vilnius, Lietuva). Sporų tankis buvo apskaičiuotas hemocitometru (*Precicolor HBG*, Gysenas, Vokietija) pagal Avin (2019) rekomendacijas ir nudažytas Tripano mėliu ($N = 3$). Sporų koncentracijos apskaičiuotos sporų skaičius viename mililitre (sporos/ml). Sporų koncentracijos buvo sulygtintos iki $\sim 3,5\text{--}4 \times 10^5$ /ml tankio. Trijų endofitinių grybų padermių mišinys buvo paruoštas

santykiu 1:1:1. Kiekvienam inokuliacijos veikimui buvo pagaminta apie 50 ml sporų suspensijos.

2.5.2. *L. multiflorum* sėklų sterilinimas ir inokuliuavimas

Kontrolinei grupei ir kiekvienam veikimo būdai buvo naudota po $N = 120$ gausiažiedės svidrės sėklų. Sėklos luobelei suardyti ir inokuliacijos efektyvumui padidinti sėklos buvo veikiamos 50 % sieros rūgštimi (atskiesta vandeniu) 10 min., du kartus perplautos steriliu vandeniu po 30 sek., po to paviršius sterilintas 70 % etanolyje 2 min. Vėl perplautos steriliu vandeniu ir veiktos 5 % NaOCl 10 min. Dar kartą plautos steriliu vandeniu tris kartus, iš kurių paskutinį kartą – 10 min.

Po sterilinimo sėklos buvo sumaišytos su endofitinių grybų sporų suspensija ir mėgintuvėliai patalpinti į rotorinio purtytuvo inkubatorių (*Eppendorf SE*, Hamburgas, Vokietija) 30 minučių esant 140 aps./min. Po inokuliuavimo sėklos trumpai nuplautos steriliu vandeniu. Kaip kontrolinė grupė naudotos sterilios sėklos, neveiktos sporų suspensija.

2.5.3. Inokuliuotų *L. multiflorum* augalų auginimas ir morfologinių parametrų matavimai

Inokuliuotos sėklos buvo daiginamos laminare KT (22–24 °C) Petri lėkštelėse ant steriliu vandeniu suvilgyto sterilaus popieriaus. Septynių dienų sudygusių sėklų ($N = 50$) šaknų mėginiai buvo surinkti į 1,5 ml Eppendorfo mėgintuvėlius su ledinės acto rūgšties ir etanolio fiksatoriumi (1:9) ir naudoti mikroskopavimui pagal 2.4.2 skyriaus aprašymą. Kita daigų ($N = 30$) dalis auginta dvi savaites šiltnamyje kontroliuojamomis sąlygomis, 6,5 × 6,5 × 6,2 cm 28 ertmių padėkluose, užpildytuose autoklavuotu (121 °C 30 min.) durpių ir kompostinio dirvožemio mišiniu santykiu 1:4; fotoperiodas 16/8 valandos (200–220 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$), temperatūra 24–26 °C/16–18 °C (diena/naktis). Durpių sudėtis: aukštapelkės durpės, dolomitas, kiminai; drėgmė iki 70 %, pH 5,5–6,5, maistinės medžiagos, mg/l: N 100–400, P 50–200, K 100–500. Kompostinio dirvožemio sudėtis: drėgmė iki 60 %, pH 5,5–6,5 ir 93 % organinės medžiagos; N – 0,2, P₂O₅ – 0,007 %, K – 0,05 %.

Po dviejų savaičių inokuliuoti augalai perkelti į h50 × Ø11 cm plastikines cilindrinės sistemas, pripildytas durpių, kompostinio dirvožemio ir perlito mišiniu, 1:4:1, susodinant po du augalus į cilindrą. Kiekviename konteineryje (35 × 65 × h30 cm) patalpinta po 15 cilindrinų sistemų, iš viso 5 konteineriai. Į konteinerio dugną buvo dedamos plastikinės korio plokštelės prieš pilant substrato mišinį, į vamzdžius buvo įdėtas agrotekstilės audinys, kurio dugne

padarytos skylės vandeniui išbėgti. Dvi savaites augalai buvo laistomi 2 kartus per savaitę po 115 ml vandentiekio vandeniu, du kartus per savaitę – 330 ml, paskutines tris savaites – du kartus per savaitę po 370 ml vandens. Augalai auginti rugsėjo–spalio mėnesiais polipropilenu dengtame šiltnamyje natūralios šviesos sąlygomis, 24–28 °C/12–16 °C (diena/naktis) temperatūroje.

Praėjus 63 dienoms po inokuliacijos, įvertinta ūglių ir šaknų biomasė: suskaičiuotas ūglių skaičius, išmatuotas šaknų ilgis ir ūglių aukštis, iš karto pasverta antžeminė dalis. Antrą kartą ūgliai ir šaknys, nuo kurių nuplautos dirvožemis, sverti džiovinant augalus 48 valandas ~35 °C temperatūroje.

2.5.4. Grybų gausumo *L. multiflorum* augalų šaknyse po inokuliacijos vertinimas

Endofitinių grybų dažniui ir gausumui nustatyti po inokuliacijos naudotos 7 dienų *L. multiflorum* daigų šaknys, paruoštos mikroskopinei analizei pagal 2.4.2 skyrių, praleidžiant naujų šaknų užauginimo etapą. Mikroskopinei analizei, endofitų kolonizacijos dažnio ir grybų gausumo įverčiui nustatyti, buvo naudojami ploni šaknų galų pjūviai ($N = 50$ kiekvieno inokuliacijos varianto), kurių kiekvieno vertinimas atliktas fazokonstrastiniu mikroskopu „Nikon ECLIPSE Ci-L“ (*Nikon*, Tokijas, Japonija) $\times 400$ didinimu. Dažniui nustatyti vertinta buvo grybinių struktūrų arba nebuvo. Vertinant grybų gausumą gausiažiedės svidrės šaknyse po inokuliacijos, buvo skaičiuotas jų dažnis matymo laukeliuose, kur iki 10 % endofitų dažnis – negausus, 11–20 % – vidutiniškai gausus ir 21–30 % – labai gausus.

2.6. Programinė įranga

2.6.1. Mikroskopinių vaizdų analizė ir bioinformatikos programinė įranga

FISH/GISH analizė. Metafazinių plokštelių preparatai, hibridizuoti gDNR ir trumpų pasikartojančių sekų zondais, analizuoti fluorescensiniu mikroskopu „Nikon ECLIPSE Ci-L“ (*Nikon*, Tokijas, Japonija). Programinė įranga „NIS-Elements D“ (6.02.01 versija) buvo naudojama mikroskopinės fotografijos analizei.

Endofitų analizė. Endofitinių grybų micelio mikroskopinės fotografijos analizė atlikta naudojant fazokonstrastinį mikroskopą „Nikon ECLIPSE Ci-L“ (*Nikon*, Tokijas, Japonija) ir programinę įrangą „NIS-Elements D“ (6.02.01 versija). Programinė įranga „Image Focus Alpha Properties“ (1.3.7.2444.6.20240114 versija) naudota grybų sporų suspensijoms skaičiuoti.

BLAST (angl. *Basic Local Alignment Search Too*) įrankis naudotas endofitinių grybų ir bakterijų kolonijų DNR sekoms analizuoti pagal NCBI duomenų bazės duomenis.

2.6.2. Statistinė analizė ir vizualizacija

FISH/GISH analizė. *Lolium* ir *Festuca* rūšių ir *L. perenne* × *F. gigantea* hibridų morfologinių požymių duomenų skirstinių normalumas patikrintas taikant Shapiro-Wilk testą ($p \geq 0,05$). Visi duomenys buvo normaliai pasiskirstę, todėl skirtumų patikimumas buvo vertinamas taikant Stjudento testą ($p \leq 0,05$).

Endofitų analizė. Endofitinių grybų dažnio šaknų mėginiai, endofitų bioįvairovės ir inokuliacijos skirtumai tarp grupių vertinti išmatavus duomenų vienuosį dispersiją (ANOVA). Kai ANOVA rodė reikšmingus skirtumus ($p \leq 0,05$), grupės buvo atskirtos taikant post-hoc Turkey testą (HSD).

Statistinė analizė atlikta naudojant STATISTICA 12 ir MS Excel. Diagramos braižytos naudojant MS Excel programinę įrangą.

FISH/GISH, endofitų izoliavimo ir jų identifikavimo bei *L. multiflorum* sėklų inokuliacijos endofitiniais grybais metodinės schemos braižytos BioRender.com programa.

Pastaba / *Note*: endofitinių mikroorganizmų identifikavimo ir inokuliacijos metodinės dalys yra publikuotos autorės publikacijose, kurios atspindi jos pagrindinį indelį. Šios publikacijos yra įtrauktos į literatūros sąrašą. Publikacijos, kurios buvo naudotos 2.4. metodinės dalies aprašymui / *the methodology sections of endophytic microorganisms identification and inoculation were published in the author's articles which demonstrate the author's main contribution and are mentioned in the reference list in the description of the 2.4 methodological section*: 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, 453; 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): 799. 2.5. metodinės dalies aprašymui naudota publikacija / *the article used for the description of the 2.5 methodological section*: Pašakinskienė, I., Stakelienė, V., Matijošiūtė, S., Martūnas, J., Rimkevičius, M., Būdienė, J., Aučina, A., & Skridaila, A. (2024). Growth-Promoting Effects of Grass Root-Derived Fungi *Cadophora fastigiata*, *Paraphoma fimeti* and *Plectosphaerella cucumerina* on Spring Barley (*Hordeum vulgare*) and Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum*). *Microorganisms*, 13, 25.

3. REZULTATAI

Šiame darbe buvo nagrinėjama gamtinio *Festuca gigantea* alopoliploido genomo kilmė. Iš pradžių, buvo sukurti *Lolium perenne* × *Festuca gigantea* hibridai, kurių morfologiniai parametrai buvo lyginami su tėvinėmis *L. perenne* ir *F. gigantea* rūšimis. Antrajame etape buvo nustatyti alopoliploido *F. gigantea* genomo sudėties komponentai. Tyrimo pabaigoje buvo įvertinti specifinių sekų (rDNR, centromerų ir telomerų) pokyčiai *F. gigantea* ir *L. perenne* × *F. gigantea* metafazinėse plokštelėse ir interfaziniuose branduoliuose.

3.1. Tarpgentinių *L. perenne* × *F. gigantea* hibridų gavimas ir jų įvertinimas

Buvo atliktas bandymas sukryžminti diploidą *L. perenne* ($2n = 2x = 14$) su heksaploidu *F. gigantea* ($2n = 6x = 42$), naudojant *L. perenne* kaip motininį augalą (piesteles) ir heksaploidą *F. gigantea* kaip tėvinę rūšį (kuokelius). Gauti rezultatai rodo, kad *L. perenne*, kaip motininis augalas, formavo nesubrendusias sėklas, 21,05 % iš 171 iškastruotų ir apdulkintų žiedų. *In vitro* būdu pavyko gauti tris *L. perenne* × *F. gigantea* ($2n = 4x = 28$) hibridus.

Gauti duomenys patvirtina, kad *L. perenne* mezginės buvo efektyviai stimuliuojamos jas apdulkinus *F. gigantea* žiedadulkėmis, tai rodo, kad šios rūšys yra tarpusavyje suderinamos.

Atlikus *F. gigantea*, *L. perenne* bei *L. perenne* × *F. gigantea* F1 kartos hibridų kokybinių ir kiekybinių morfologinių parametrų vertinimus (3.1 ir 3.2 lentelės) nustatyta, kad *L. perenne* × *F. gigantea* hibridams yra būdingas tarpinio tipo žiedynas – stati šluotelė (2.1 B pav.). Nors pavyko sukurti *L. perenne* × *F. gigantea* F1 kartos hibridus, tačiau visi F1 kartos hibridai buvo vyriškai sterilūs ir nemezgė sėklų (3.1 lentelė). Pagal lapų auselių išreikštumą *F. gigantea* individai pasižymi stiebą apgaubiančiomis ir susikryžiuojančiomis auselėmis (2.2 C pav.), priešingai nei *L. perenne* (2.2 A pav.). *L. perenne* × *F. gigantea* individams būdingas tarpinis auselių tipas – stiebą apgaubiančios auselės (2.2 B pav.).

3.1 lentelė. *F. gigantea*, *L. perenne* bei jų hibridų kokybiniai morfologiniai požymiai (– nėra būdingas požymis, + būdingas požymis).

Table 3.1. *Qualitative morphological characteristics of F. gigantea, L. perenne and their hybrids (– not a typical feature, + a typical feature).*

Rūšys / hibridai <i>Species / Hybrids</i>	Žiedynas / Inflorescence			Lapo auselės / Leaf Auricles			Dulkėjimas / Pollen Dispersal	
	Varpa <i>/ Spike</i>	Šluotelė <i>/ Panicle</i>	Svyranti šluotelė <i>/ Drooping Panicle</i>	Neapbaugiančios <i>/ Non-enveloping</i>	Apbaubiančios <i>/ Enveloping</i>	Apgaubiančios ir susikryžiuojančios <i>/ Fully Enveloping</i>	Silpnas <i>/ Poor</i>	Geras <i>/ Good</i>
<i>F. gigantea</i> <i>N = 20</i>	–	–	+	–	–	+	–	+
<i>L. perenne</i> <i>N = 6</i>	+	–	–	+	–	–	–	+
Lp × Fg N1* <i>N = 6</i>	–	+	–	–	+	–	+	–
Lp × Fg N2 <i>N = 6</i>	–	+	–	–	+	–	+	–
Lp × Fg N3 <i>N = 6</i>	–	+	–	–	+	–	+	–

* *L. perenne* × *F. gigantea* numeris 1, *L. perenne* × *F. gigantea* numeris 2, *L. perenne* × *F. gigantea* numeris 3

* *L. perenne* × *F. gigantea* Number 1, *L. perenne* × *F. gigantea* Number 2, *L. perenne* × *F. gigantea* Number 3

3.2 lentelė. *F. gigantea*, *L. perenne* bei jų hibridų kiekybinių morfologinių požymių matavimai, cm ($\pm$ SD, $p \leq 0,05$ – reikšmingas skirtumas tarp grupės individų, * – hibridas reikšmingai skyrėsi tarp tėvinių rūšių, kai $p \leq 0,05$).

Table 3.2. *Quantitative morphological characteristics measurements of F. gigantea, L. perenne and their hybrids, cm ($\pm$ SD, $p \leq 0.05$ – significant difference between plants in a group, * – hybrid significantly different between parents, $p \leq 0.05$).*

Rūšys / hibridai <i>Species</i> <i>/ Hybrids</i>	Auselių ilgis / <i>Auricles</i> <i>Length</i>	Vegetatyvini s aukštis / <i>Vegetative</i> <i>Height</i>	Generatyvinis aukštis / <i>Generative</i> <i>Height</i>	Žiedyno ilgis / <i>Inflorescence</i> <i>Length</i>	Lapo ilgis / <i>Leaf Length</i>	Lapo pamatinės dalies plotis / <i>Area of the</i> <i>Base of the Leaf</i>	Lapo centrinės dalies plotis / <i>Area of the</i> <i>Central Part of</i> <i>the Leaf</i>
	<i>N</i> = 10	<i>N</i> = 20 / 6	<i>N</i> = 20 / 6	<i>N</i> = 5	<i>N</i> = 10	<i>N</i> = 10	<i>N</i> = 10
<i>F. gigantea</i> <i>N</i> = 20	0,90$\pm$0,13	44,70 $\pm$ 9,65	78,00 $\pm$ 14,85	34,43$\pm$6,39	39,58$\pm$7,44	1,32$\pm$0,24	1,92$\pm$2,31
<i>L. perenne</i> <i>N</i> = 6	0,36 $\pm$ 0,08	48,79 $\pm$ 6,58	74,83 $\pm$ 5,34	21,48 $\pm$ 3,32	18,79 $\pm$ 3,88	0,60 $\pm$ 0,11	0,62 $\pm$ 1,05
Lp $\times$ Fg N1* <i>N</i> = 6	0,69$\pm$0,11*	60,19 $\pm$ 8,11*	84,44 $\pm$ 4,18*	24,62$\pm$2,08*	32,62 $\pm$ 4,13*	0,81 $\pm$ 0,07*	1,17 $\pm$ 0,82*
Lp $\times$ Fg N2 <i>N</i> = 6	0,60 $\pm$ 0,10*	56,20 $\pm$ 7,47*	84,92 $\pm$ 5,95*	29,83 $\pm$ 2,34*	27,47$\pm$3,11*	0,87 $\pm$ 0,09*	1,16 $\pm$ 1,00*
Lp $\times$ Fg N3 <i>N</i> = 6	0,62 $\pm$ 0,08*	55,27 $\pm$ 5,60*	80,64 $\pm$ 6,88	30,41 $\pm$ 3,08*	31,23 $\pm$ 3,64*	0,83 $\pm$ 0,07*	1,17 $\pm$ 0,99*

**L. perenne* $\times$ *F. gigantea* hibridai Nr. 1, 2 ir 3.

* *L. perenne* $\times$ *F. gigantea* hybrids No. 1, 2 and 3.

Vertinant kiekybinius parametrus nustatyta, kad *F. gigantea* statistiškai reikšmingai skyrėsi nuo *L. perenne* žiedyno, auselių ir lapo ilgiais bei lapo pločiu (3.2 lentelė). Pagal šiuos požymius jis yra pranašesnis už *L. perenne*. Kaip nurodyta 3.2 lentelėje, *L. perenne* × *F. gigantea* hibridai turėjo tarpinio tipo lapus pagal plotį, auselių, žiedyno ir lapų ilgį, tačiau pagal šiuos požymius buvo artimesni *F. gigantea* tėvinei rūšiai ir įvertinti kaip tarpinio tipo požymiai.

Lolium perenne × *Festuca gigantea* N1 individų auselių ir žiedynų ilgiai reikšmingai skyrėsi nuo N2 ir N3 individų grupės, o *L. perenne* × *F. gigantea* N2 skyrėsi lapo ilgiu. Visi gauti tarpagentiniai hibridai buvo reikšmingai aukštesni už *F. gigantea* ir *L. perenne*, tik *L. perenne* × *F. gigantea* N3 hibridas generatyvinėje stadijoje reikšmingai nesiskyrė aukščiau nuo tėvinių rūšių, bet buvo artimesnis *F. gigantea* tėvinei rūšiai (3.2 lentelė). Tai rodo, kad *L. perenne* × *F. gigantea* N1 ir N2 hibridai pagal šį požymį buvo pranašesni už tėvines rūšis nei *L. perenne* × *F. gigantea* N3 hibridas.

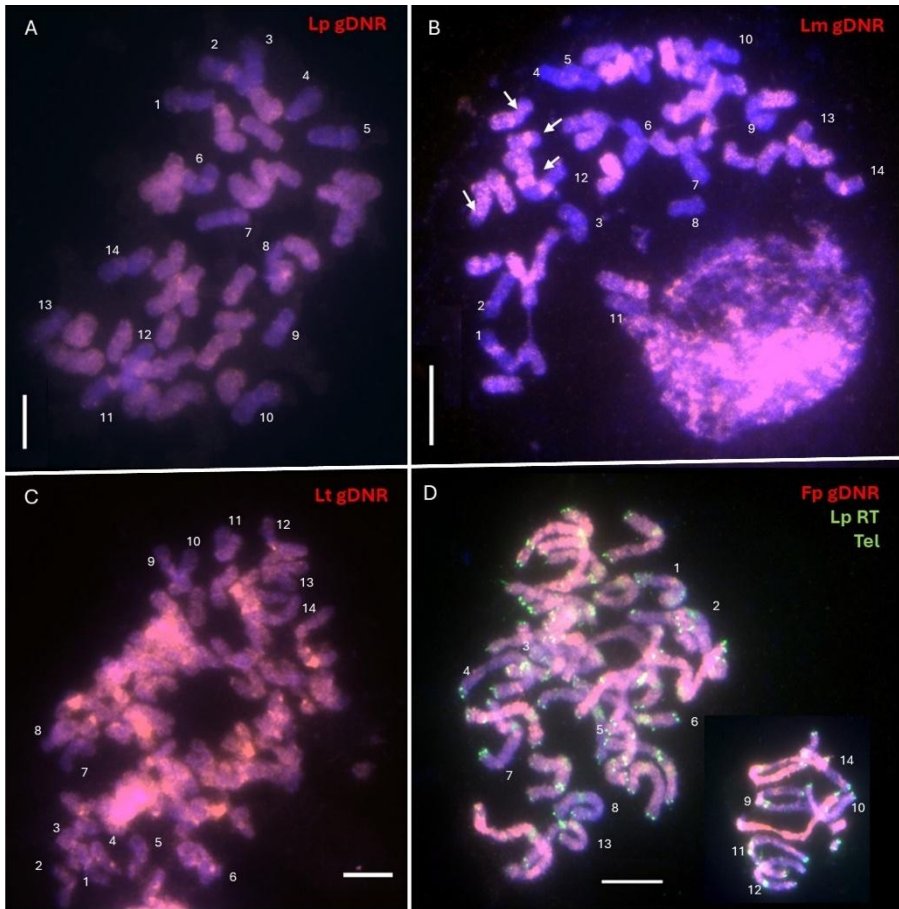
Apibendrinant visais atvejais natūralus hibridas alopoliploidas *F. gigantea* turėjo didesnius kiekybinius morfologinius parametrus už *L. perenne* pagal lapo auselių, žiedyno ir lapų ilgį bei lapų plotį. Rezultatai rodo, kad *L. perenne* × *F. gigantea* F1 kartos hibridai fenotipiškai buvo panašesni į *F. gigantea* tėvinę rūšį, pagal šluotelės tipo žiedyną, auselių išreikštumą, žiedyno ir lapo ilgį bei lapų plotį.

3.2. *F. gigantea* ir giminingų *Lolium* bei *Festuca* rūšių citogenetiniai ypatumai, nustatyti fluorescencinės *in situ* hibridizacijos (FISH) metodu

Siekiant ištirti alopoliploido *F. gigantea* genomo kilmę buvo naudojami *F. gigantea* ir mūsų sukurtų *L. perenne* × *F. gigantea* F1 hibridų citologiniai preparatai, kurie buvo hibridizuoti *F. gigantea* giminingų rūšių genominiiais zondais (gDNR) pasitelkiant GISH metodą. gDNR zondams sukurti buvo naudojama rūšių bendroji gDNR, ženklinta raudonai fluorescuojančiu rodaminu arba žaliai fluorescuojančiu fluoresceinu.

3.2.1. *F. gigantea* alopoliploidinės kilmės tyrimas GISH metodu ir galimi ryšiai su diploidinėmis *Lolium* ir *Festuca* rūšimis

Festuca gigantea heksaploidinio genomo sandaros nustatymui buvo naudojami *L. perenne*, *L. multiflorum*, *L. temulentum* ir *F. pratensis* gDNR zondai, ženklinti skirtingais fluorochromais ir hibridizuoti ant didžiojo eraičino metafazinių plokštelių ($N = 453$) ir interfazinių branduolių ($N = 120$).



3.1 pav. Genominė / fluorescencinė *in situ* hibridizacija *F. gigantea* metafazinėse plokštelėse su (A) *L. perenne*, (B) *L. multiflorum*, (C) *L. temulentum* ir (D) *F. pratensis* genominiiais zondais (raudona spalva) ir centromeriniu bei telomeriniu zondais (žalia spalva). Skaičiai (1–14) rodo chromosomas neturinčias signalo; rodyklės – rekombinantines chromosomas. Skalė = 10 μm.

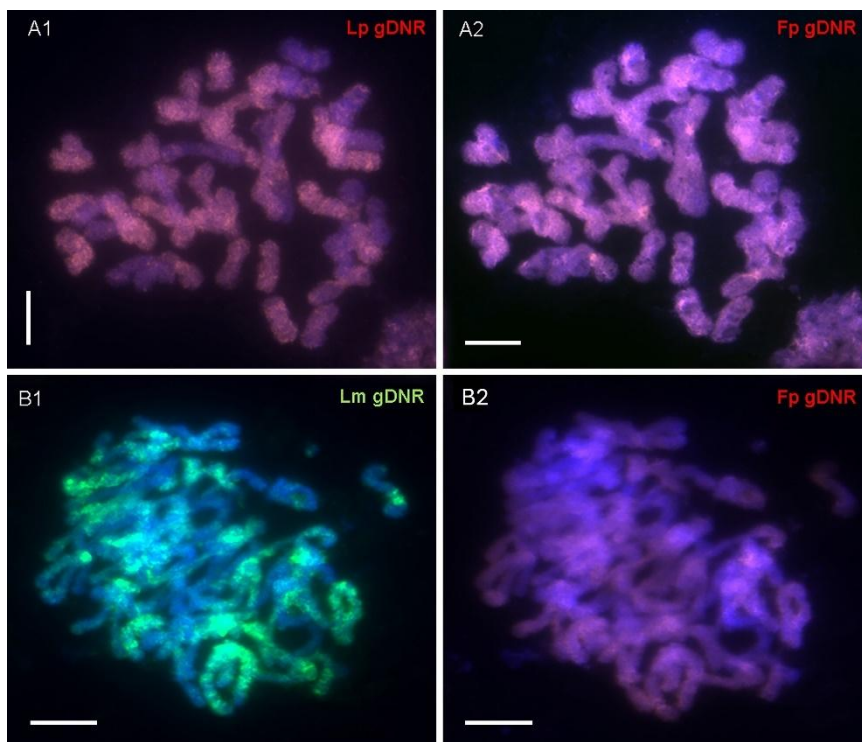
Fig. 3.1. Genomic / fluorescence *in situ* hybridization in metaphase plates of *F. gigantea*. The (A) *L. perenne*, (B) *L. multiflorum*, (C) *L. temulentum* and (D) *F. pratensis* genomic probes (red) and centromeric and telomeric probes (green). The numbers (1–14) – chromosomes without signal; arrows – recombinant chromosomes. Scale bar = 10 μm.

3.3 lentelė. Diploidinių *Lolium* ir *Festuca* rūšių gDNR zondų hibridizacijos signalo intensyvumas *F. gigantea* metafazinėse plokštelėse.

Table 3.3. The hybridization signal intensity of gDNA probes of diploid *Lolium* and *Festuca* species in metaphase plates of *F. gigantea*.

gDNR zondas / gDNA Probes	Pakartojimų skaičius / Number of Repetitions	Metafazinių plokštelių skaičius / Number of Metaphase Plates	Signal intensyvumas chromosomose, vnt. / Signal Intensity in Chromosomes, No.		
			Stiprus / Strong	Vidutinis / Middle	Nėra / Non
<i>L. perenne</i>	14	123	14	14	14
<i>L. multiflorum</i>	34	156	14	14	14
<i>L. temulentum</i>	10	64	14	14	14
<i>F. pratensis</i>	19	110	14	14	14

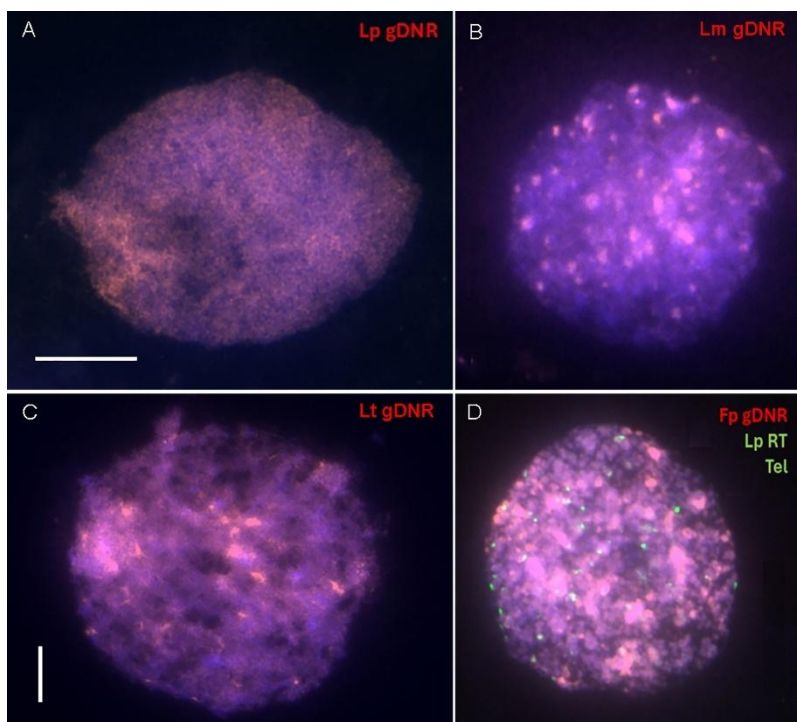
Lolium perenne, *L. multiflorum* ir *L. temulentum* gDNR zondai hibridizavosi 28 didžiojo eraičino chromosomose, iš jų 14 chromosomų turėjo intensyvią hibridizacijos signalą ir 14 – vidutinį. GISH parodė, kad *L. perenne* hibridizacija buvo tolygi per visą chromosomų ilgį (3.1 A pav., 3.3 lentelė). *L. multiflorum* gDNR hibridizacijos pobūdis buvo skirtingas negu *L. perenne* (3.1 B pav.). Trejose chromosomų porose stebėtas rekombinantinių chromosomų vaizdas. Taip pat išsiskyrė intensyvių hibridizacijos signalai ties keturių chromosomų centromerinėmis sritimis (3.1 B pav.). Ženklinant *L. temulentum* gDNR zondų buvo stebima 14 intensyvesnių signalų centromerinėse srityse, vidutinį hibridizacijos stiprumą turinčiose chromosomose (3.1 C pav). Panaudojus *F. pratensis* gDNR zondą buvo matomos 4 poros chromosomų, turinčių intensyvius signalus centromerinėse srityse (3.1 D pav.). Visais atvejais svidrių ir tikrojo eraičino zondai rodė signalą 28 chromosomose ir nerodė signalo 14 didžiojo eraičino chromosomų.



3.2 pav. *F. gigantea* ($2n = 6x = 42$) metafazinės plokštelės pakaitomis hibridizuotos skirtingais gDNR zondais. (A1) *L. perenne*, (B1) *L. multiflorum* ir (A2, B2) *F. pratensis* gDNR zondai. Skalė = 10 μ m. A1 ir B1 – pirmoji hibridizacija, A2 ir B2 – antroji hibridizacija.

Fig 3.2. The *F. gigantea* metaphase ($2n = 6x = 42$) plates hybridized with different gDNA probes. The (A1) *L. perenne*, (B1) *L. multiflorum* and (A2, B2) *F. pratensis* gDNR probes. Scale bar = 10 μ m. A1 and A2 – first hybridization, A2 and B2 – second hybridization.

Norint išsiaiškinti, kad galbūt 14 nepasiženklintų chromosomų yra kilusios iš *F. pratensis*, *F. gigantea* citologiniai preparatai buvo hibridizuoti pakartotinai. Pirmą kartą buvo naudoti *L. perenne* ir *L. multiflorum* gDNR zondai, ženklinti skirtingais fluorochromais, $N = 50$ metafazinių plokštelių kiekvienam zondui (3.2 A1, B1 pav.). Atlikus pirminės hibridizacijos analizę, citologiniai preparatai buvo nuplauti $2\times$ SSC tirpalu ir pakartotinai hibridizuoti panaudojus *F. pratensis* gDNR zondą. GISH analizė atskleidė, jog *F. pratensis* gDNR zondo hibridizacija įvyko tose pačiose 28 *F. gigantea* chromosomose (3.2 A2, B2 pav.), kaip ir *L. perenne* ir *L. multiflorum* zondų.



3.3 pav. *F. gigantea* interfaziniai branduoliai hibridizuoti skirtingais gDNR zondais. (A) *L. perenne*, (B) *L. multiflorum*, (C) *L. temulentum* ir (D) *F. pratensis* gDNR zondai (raudona spalva) ir *L. perenne* RT centromerinis bei telomerinis zondai (žalia spalva). Skalė = 10 μ m.

Fig. 3.3. The *F. gigantea* interphase nuclei hybridized with different gDNA probes. The (A) *L. perenne*, (B) *L. multiflorum*, (C) *L. temulentum*,

(D) *F. pratensis* gDNA probes (red), *L. perenne* RT centromeric and telomeric probes are green. Scale bar = 10 μ m.

Papildomai buvo įvertintas didžiojo eraičino interfazinių branduolių hibridizacijos intensyvumas. Nustatyta, kad iš *Lolium* spp. ir *F. pratensis* kilusios chromosomos yra pasklidusios po visą *F. gigantea* interfazinį branduolį (3.3 pav.). Didžiojo eraičino 2/3 genomo yra glaudžiai susijęs su *L. perenne* (3.3 A pav.), *L. multiflorum* (3.3 B pav.), *L. temulentum* (3.3 C pav.) ir *F. pratensis* (3.3 D pav.), o likusi 1/3 yra genetiškai nutolusi.

Atlikus metafazinių plokštelių ir interfazinių branduolių hibridizacijos intensyvumo palyginimą, nustatyta, kad interfaziniuose branduoliuose genominių zondų signalo pasiskirstymo apimtis atitiko santykį stebimą didžiojo eraičino hibridizuotose metafazininėse chromosomose.

Apibendrinant gautus rezultatus nustatyta, kad *F. gigantea* genome yra 28 chromosomos, kurios rodo hibridizacijos signalą hibridizuojant su *L. perenne*, *L. multiflorum*, *L. temulentum* ir *F. pratensis* gDNR zondais. Interfaziniuose branduoliuose šių rūšių chromosomos nesitelkia į tam tikras sritis, o yra pasklidusios po branduolį. Metafazinių chromosomų ir interfazinių branduolių palyginimo analizė rodo, kad *F. gigantea* 2/3 genomo yra glaudžiai susiję su viena iš trijų *Lolium* (*L. perenne*, *L. multiflorum* arba *L. temulentum*) ir *F. pratensis* rūšimis. Kadangi *F. pratensis* gDNR zondo hibridizacija vyksta tose pačiose 28 *F. gigantea* chromosomose, kur ir *Lolium* gDNR zondo, galima teigti, kad šios 28 *F. gigantea* chromosomos yra tam tikri subgenominiai naujadarai.

3.2.2. *L. perenne* $\times$ *F. gigantea* hibridų citogenetiniai ypatumai

Buvo naudoti tetraploidinių *L. perenne* $\times$ *F. gigantea* F1 kartos hibridų citologiniai preparatai ($N = 228$ metafazinės plokštelės ir $N = 150$ interfaziniai branduoliai), kurie hibridizuoti *Lolium* spp. ir *Festuca* spp. gDNR zondais, pasitelkiant GISH metodą.

Atlikus *L. perenne* $\times$ *F. gigantea* hibridų metafazinių chromosomų ir interfazinių branduolių hibridizaciją, *L. perenne* gDNR zondo stipri hibridizacija buvo aptikta septyniose chromosomose, kilusiose iš *L. perenne*, o 21 chromosoma neturėjo signalo (3.4 lentelė, 3.4 A pav.). Taip pat iš *L. perenne* kilusios chromosomos parodė atskirą lokalizaciją interfaziniuose branduoliuose (3.5 A pav.).

Panaudojus *F. gigantea* gDNR zondą hibridizacija įvyko 21 chromosomoje (3.4 lentelė, 3.4 B pav.), o interfaziniuose branduoliuose chromosomos buvo pasklidusios po visą branduolį (3.5 B pav.).

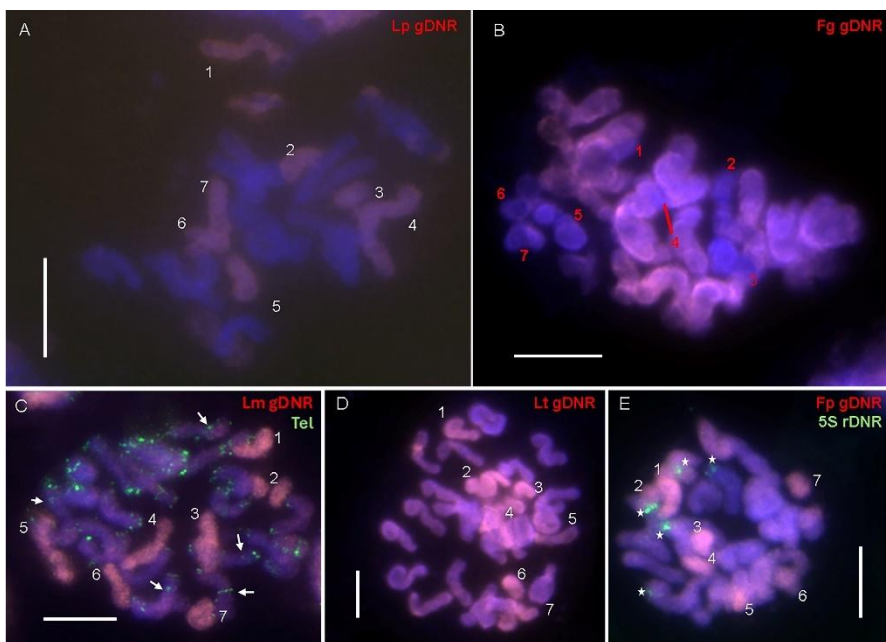
3.4 lentelė. gDNR zondo hibridizacijos intensyvumas *L. perenne* × *F. gigantea* metafazinėse plokštelėse (paryškinti skaičiai – chromosomų skaičius, kilusių iš tėvinių rūšių).

Table 3.4. The hybridization intensity of gDNA probes in metaphase plates of *L. perenne* × *F. gigantea* (bold numbers – number of chromosomes originating from the parental).

gDNR zondai / gDNA Probes	Pakartojimų skaičius / Number of Repetitions	Metafazinių plokštelių sk. / No. of Metaphase Plates	Signal intensyvumas chromosomose, vnt. / Signal Intensity in Chromosomes, No.		
			Stiprus / Strong	Vidutinis / Middle	Nėra / Non
<i>F. gigantea</i> *	10	21	21	–	7
<i>L. perenne</i> *	17	64	7	–	21
<i>L. multiflorum</i> **	10	36	7	–	21
<i>L. temulentum</i> **	10	59	7	–	21
<i>F. pratensis</i> **	11	48	7	–	21

* – hibrido tėvinių rūšių zondai; ** – giminingų rūšių zondai

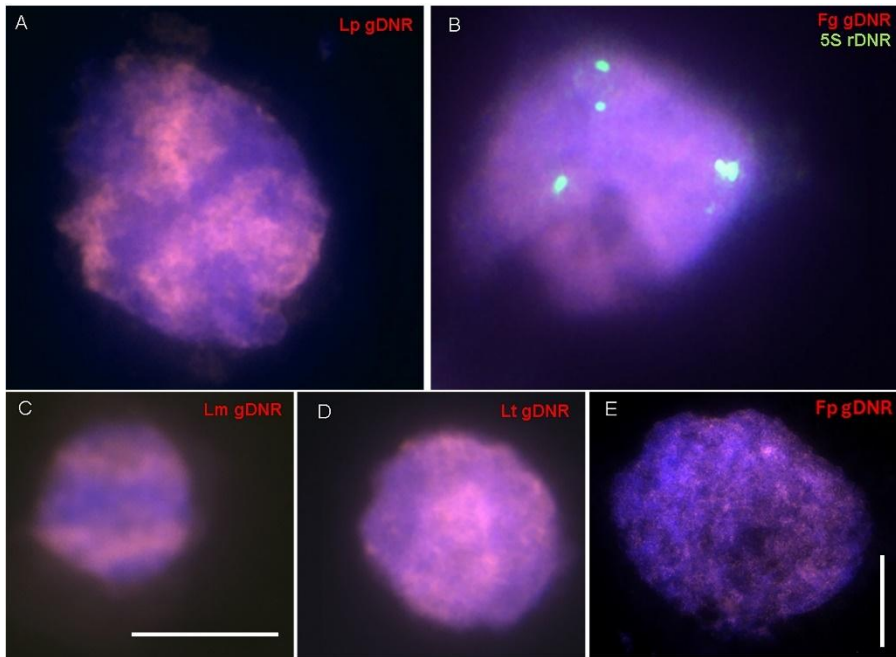
* – probes of the hybrid's parental species; ** – probes of the related species



3.4 pav. Genominė / fluorescensinė *in situ* hibridizacija (GISH/FISH) *L. perenne* × *F. gigantea* metafazinėse plokštelėse. (A) *L. perenne*, (B) *F. gigantea*, (C) *L. multiflorum*, (D) *L. temulentum* ir (E) *F. pratensis* gDNR zondai (raudona spalva). (C) telomerinis ir (E) 5S rDNR zondai (žalia spalva). Balti skaičiai (1–7) – chromosomos turinčios stiprų signalą; raudoni skaičiai (1–7) – chromosomos neturinčios signalo; rodyklės – intersticinės telomerinės sritys; žvaigždės – 5S rDNR signalai. Skalė = 10 μm.

Fig. 3.4. Genomic / fluorescence *in situ* hybridization (GISH/FISH) in *L. perenne* × *F. gigantea* metaphase plates. The (A) *L. perenne*, (B) *F. gigantea*, (C) *L. multiflorum*, (D) *L. temulentum* and (E) *F. pratensis* gDNA probes (red). (C) telomeric and (E) 5S rDNA probes (green). The white number (1–7) – chromosomes have strong signals. The red number (1–7) – chromosomes have no signal. The arrows showed – interstitial telomeric region, the stars – signals 5S rDNA. Scale bar = 10 μm.

Eksperimento metu, panaudojus kitų *Lolium* ir *F. pratensis* giminingų rūšių gDNR zondus, visais atvejais hibridizacijos stiprus signalas buvo stebimas 7 chromosomose (3.4 lentelė, 3.4 C–E pav.). Interfaziniuose branduoliuose *Lolium* zondo signalą turinčios chromosomos telkėsi į tam tikrą sritį (3.5 C ir D pav.), o *F. pratensis* signalą turinčios chromosomos buvo pasklidusios branduolyje (3.5 E pav.).



3.5 pav. Genominė / fluorescensinė *in situ* hibridizacija (GISH/FISH) *L. perenne* × *F. gigantea* interfaziniuose branduoliuose. (A) *L. perenne*, (B) *F. gigantea*, (C) *L. multiflorum*, (D) *L. temulentum* ir (E) *F. pratensis* gDNR zondai (raudona spalva) ir (B) 5S rDNR zondas (žalia spalva). Skalė = 20 μm.

Fig. 3.5. Genomic / fluorescence *in situ* hybridization (GISH/FISH) in interphase nuclei of *L. perenne* × *F. gigantea*. The (A) *L. perenne*, (B) *F. gigantea*, (C) *L. multiflorum*, (D) *L. temulentum* and (E) *F. pratensis* gDNA probes (red). (B) 5S rDNA probe (green). Scale bar = 20 μm.

Apibendrinant gauti rezultatai parodė, kad $\frac{3}{4}$ hibridų genomo sudarė *F. gigantea*, o likusi $\frac{1}{4}$ *L. perenne*, todėl jo genominė formulė, kaip ir buvo tikėtina, yra *LpFgFgFg*. Hibridų interfaziniuose branduoliuose iš svidrių kilusios chromosomos telkėsi į tam tikras sritis, o iš eraičino – nebuvo sutelktos tam tikroje interfazinių branduolių srityje.

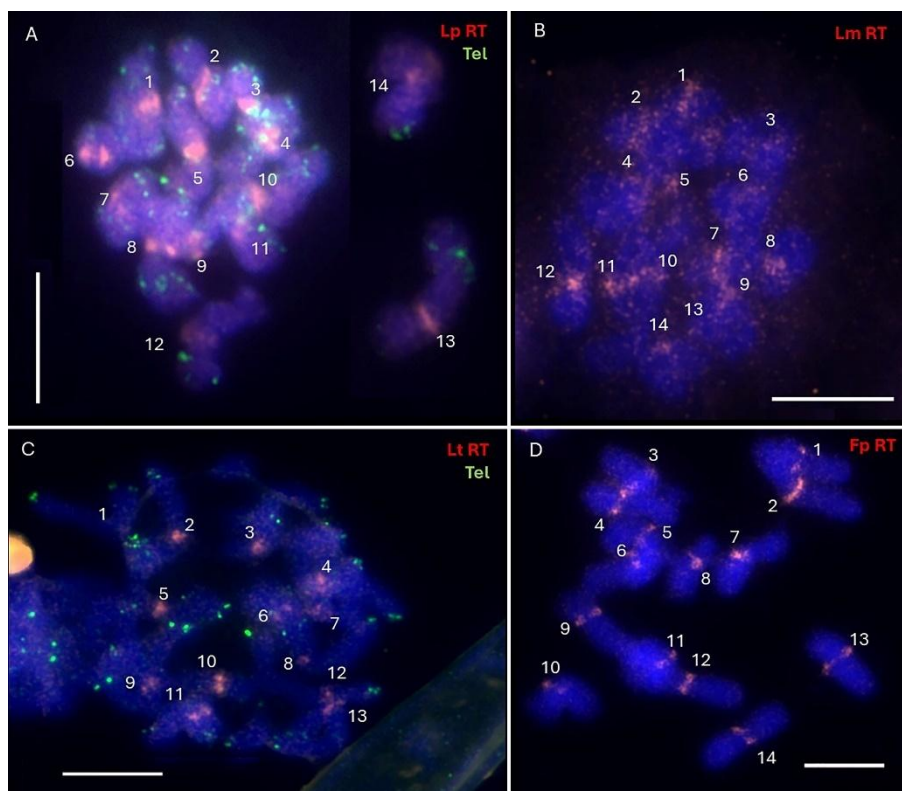
3.3. Specifinių chromosominių sekų FISH *F. gigantea* ir artimose rūšyse

FISH metodas buvo naudojamas atskleisti chromosomų persitvarkymo ypatumus. Buvo naudojami *F. gigantea*, *L. perenne* 'Veja', *L. multiflorum* 'Grazer', *L. temulentum*, *F. pratensis* 'Alanta' ir *L. perenne* × *F. gigantea* F1 hibridų citologiniai preparatai, kurie buvo hibridizuoti Fesreba centromeriniu

RT, telomeriniu, 5S ir 45S rDNR zondais, ženklintais skirtingais fluorochromais.

3.3.1. Centromerinių Fesreba sekų FISH diploidinėse *Lolium* ir *Festuca* rūšyse, susijusiose su alopoliploidinės *F. gigantea* formavimusi

Atlikta *F. gigantea* galimų diploidinių protėvinių rūšių *L. perenne*, *L. multiflorum*, *L. temulentum* ir *F. pratensis* centromerinių Fesreba RT sekų zondų analizė parodė, kad *L. perenne* metafazinėse chromosomose buvo stebimi stiprūs hibridizacijos signalai centromerinėse srityse, o taip pat mažiau intensyvūs signalai per visą chromosomos ilgį (3.6 A pav.). *L. multiflorum* chromosomose stebimi silpni signalai centromerinėse srityse ir silpni signalai pasklidę per visą chromosomų ilgį (3.6 B pav.).



3.6 pav. Fesreba sekų hibridizacija diploidinių rūšių metafazinėse plokštelėse. (A) *L. perenne* RT bei telomerinis zondai *L. perenne* chromosomose; (B) *L. multiflorum* RT zondas *L. multiflorum* chromosomose; (C) *L. temulentum* RT bei telomerinis zondai *L. temulentum* chromosomose; (D) *F. pratensis* RT zondas *F. pratensis* chromosomose. Raudona spalva –

centromeros, žalia – telomeros. Skaičiai (1–14) – centromeriniai signalai. Skalė = 10 µm.

Fig. 3.6. *Fesreba* sequences hybridization in metaphase plates of diploid species. The (A) *L. perenne* RT and telomeric probes in *L. perenne* chromosomes; (B) *L. multiflorum* RT probe in *L. multiflorum* chromosomes; (C) *L. temulentum* RT and telomeric probes in *L. temulentum* chromosomes; (D) *F. pratensis* RT probe in *F. pratensis* chromosomes. Red – centromeres, green – telomeres. Number 1–14 – centromeric signals. Scale bar = 10 µm.

Ties centromerinėmis sritimis *L. temulentum* metafazinėse chromosomose buvo matomi silpnesni signalai negu *L. perenne* ir silpni signalai per visą chromosomų ilgį (3.6 C pav.). RT zondo intensyvūs hibridizacijos signalai *F. pratensis* chromosomose buvo matomi tik centromerinėse srityse (3.6 D pav.).

Rezultatai rodo, kad *Fesreba* retrotranspozoninės sekos diploidinių *Lolium* rūšių genome yra gausesnės nei *F. pratensis*, nes *Fesreba* RT zondas parodė stipresnius ir gausesnius hibridizacijos signalus *L. perenne*, *L. multiflorum* ir *L. temulentum* rūšyse.

3.3.2. Centromerinių ir telomerinių sekų FISH palyginimas *F. gigantea* ir *L. perenne* × *F. gigantea* hibriduose

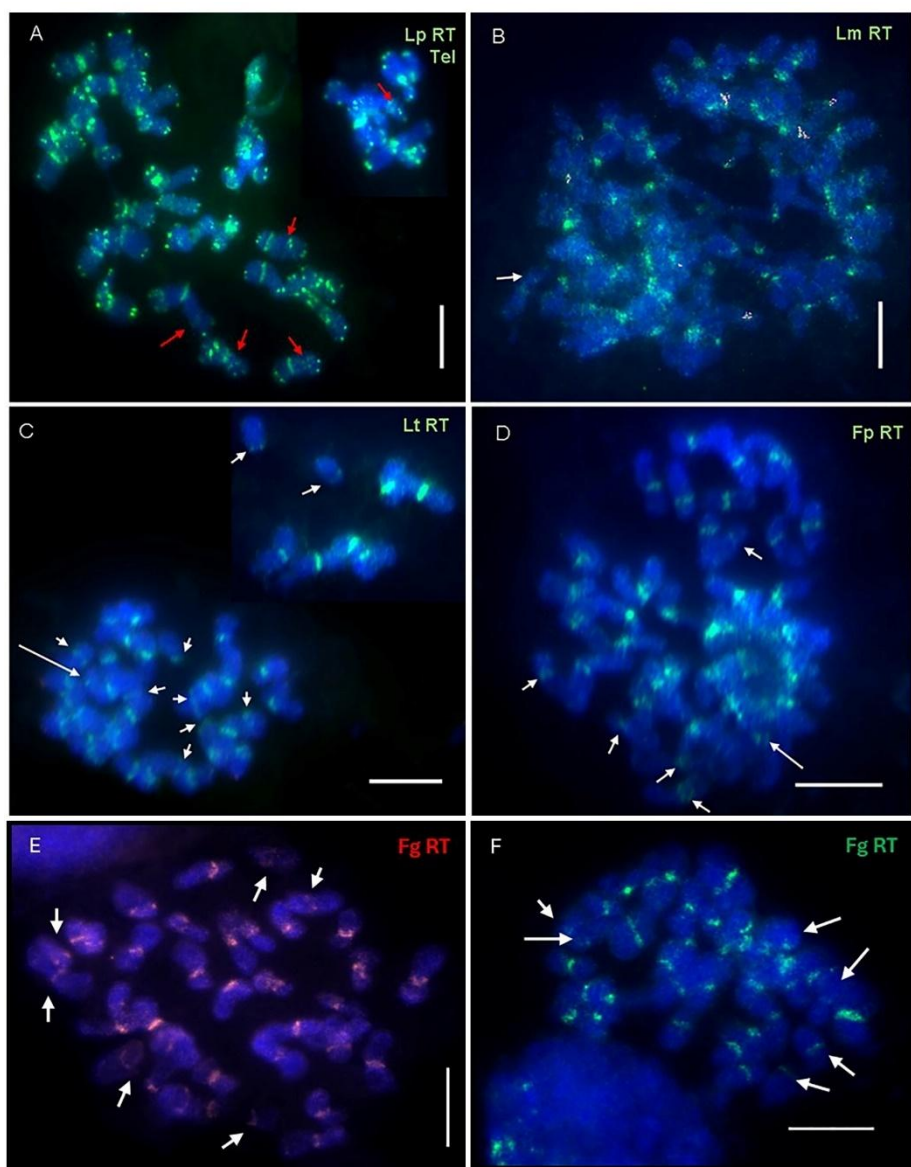
Šiame tyrime buvo bandoma nustatyti gamtinio alopoliploido *F. gigantea* ir mūsų sukurtų tarpgentinių *L. perenne* × *F. gigantea* F1 kartos hibridų centromerų ir telomerų pokyčius metafazinėse chromosomose, siekiant atskleisti genomų persitvarkymo dėsningumus.

3.5 lentelė. Fesreba zondų signalų skaičius *F. gigantea* ir *L. perenne* × *F. gigantea* metafazinėse chromosomose.

Table 3.5. The number of Fesreba probes signals in metaphase chromosomes of *F. gigantea* and *L. perenne* × *F. gigantea*.

Rūšis (ploidiškumas) / <i>Species (Ploidy Level)</i>	Pakartojimų skaičius / <i>Number of Repetitions</i>	Metafazinių plokštelių sk. / <i>No. of Metaphase Plates</i>	Fesreba RT zondų signalų skaičius / <i>No. of Fesreba RT Probe Signals</i>				
			Lp*	Lm	Lt	Fp	Fg
<i>F. gigantea</i> (2n = 6x = 42)	50	249	42	42	42	42	42
<i>L. perenne</i> × <i>F. gigantea</i> (2n = 4x = 28)	46	210	21	21	28	28	28

*Lp – *L. perenne*, Lm – *L. multiflorum*, Lt – *L. temulentum*, Fp – *F. pratensis*, Fg – *F. gigantea*



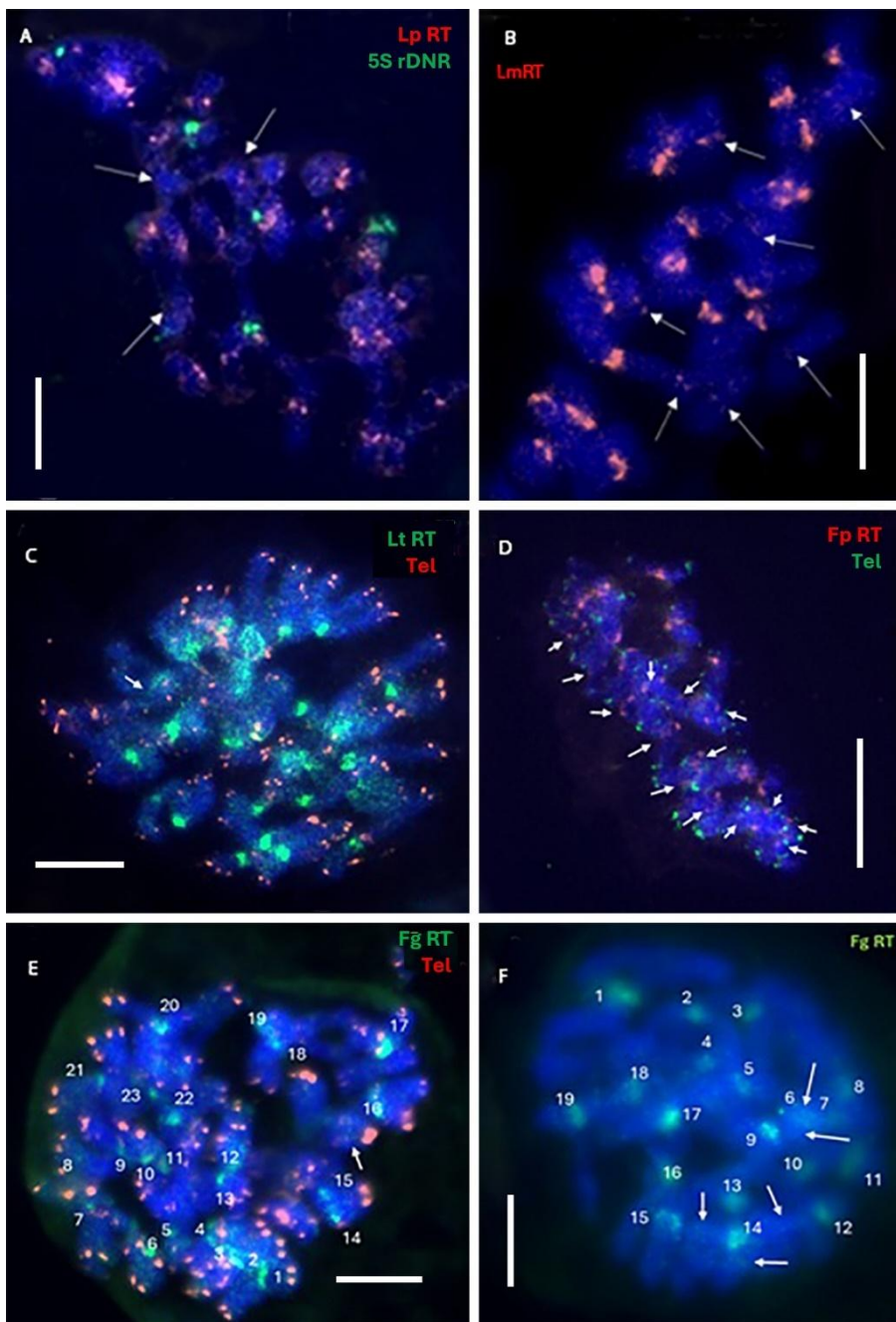
3.7 pav. Centromerinių Fesreba RT zondų hibridizacija *F. gigantea* metafazinėse plokštelėse. (A) *L. perenne* RT ir telomerinis zondai, (B) *L. multiflorum*, (C) *L. temulentum*, (D) *F. pratensis* ir (E, F) *F. gigantea* RT zondai. Baltos rodyklės – silpnai pasiženklintos centromerinės sritys. Raudonos rodyklės – žymi telomerines sekas nebūdingose, intersticinėse chromosomų vietose. Skalė = 10 μm.

Fig. 3.7. Hybridization of the centromeric RT probes in *F. gigantea* metaphase plates. The (A) *L. perenne* RT and telomeric probes; (B) *L. multiflorum*, (C) *L. temulentum*, (D) *F. pratensis* and (E, F) *F. gigantea* RT probes. The

white arrows – faintly marked centromeric regions. The red arrows – telomeric sequence in the interstitial chromosome regions. Scale bar = 10 μ m.

Šio tyrimo duomenys atskleidė, kad *L. perenne* RT zondas parodė stiprius hibridizacijos signalus *F. gigantea* 42 mitotinių chromosomų centromerinėse srityse (3.5 lentelė, 3.7 A pav.), o *L. multiflorum*, *F. pratensis* ir *F. gigantea* RT zondu hibridizacijos signalai buvo silpnesni (3.5 lentelė, 3.7 B, D–F pav.). Silpniausi hibridizacijos signalai ties centromerinėmis *F. gigantea* sritimis buvo panaudojus *L. temulentum* RT zondą (3.5 lentelė, 3.7 C pav.). Telomerinio zondo signalai buvo lokalizuoti telomerinėse srityse, tik keliose chromosomose buvo matomi papildomi signalai intersticinėse srityse (3.7 A pav.).

Lolium perenne $\times$ *Festuca gigantea* ($2n = 4x = 28$) hibridų metafazinėse plokštelėse naudojant *L. perenne* ir *L. multiflorum* RT zondus stipri hibridizacija stebima 21 centromerinėje srityje, o 7 centromerinės sritys neturėjo signalų arba jie buvo matomi silpnai (3.8 A, B pav.). Kartais ryškūs hibridizacijos signalai būdavo pasklidę per septynių chromosomų visą ilgį (3.9 A1, B1). Naudojant *L. temulentum* RT hibridizacijos signalai buvo intensyvūs centromerinėse srityse ir pericentromerinėse chromosomų dalyse (3.5 lentelė, 3.8 C pav.). Silpniausiai veikė *F. pratensis* RT zondas. Matomi intensyvesni hibridizacijos signalai 14 chromosomų centromerose, o likusiose 14 chromosomų centromerinėse srityse hibridizacijos signalai buvo silpni (3.5 lentelė, 3.8 D pav.). Be to, *F. pratensis* RT zondo hibridizacijos signalai buvo silpni ir *F. gigantea* centromerinėse srityse, matomi 6 silpni signalai iš 42 centromerinių sričių (3.7 D pav.). Panašus rezultatas buvo gautas panaudojus *F. gigantea* RT zondą, kurio hibridizacijos signalai buvo mažiau intensyvūs nei *L. perenne*, *L. multiflorum* ir *L. temulentum* RT (3.5 lentelė, 3.8 E ir F pav.).

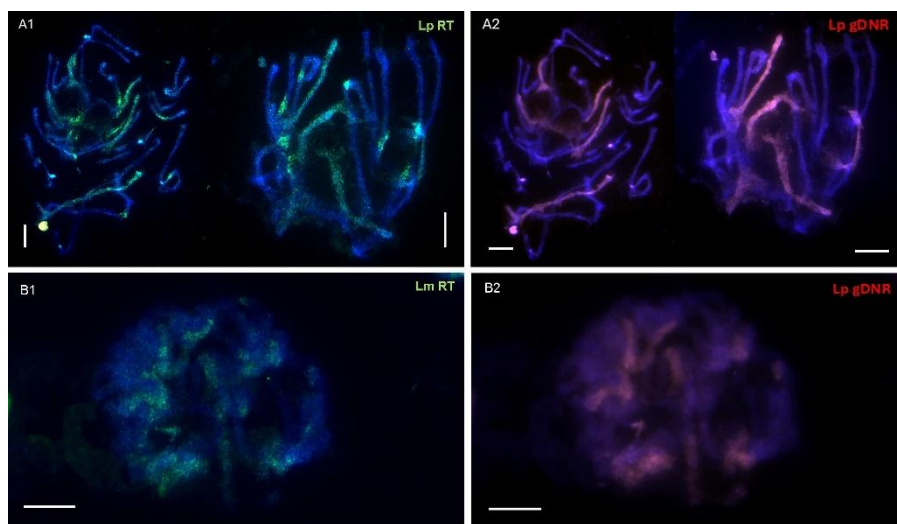


3.8 pav. Centromerinių Fesreba RT zondų hibridizacija *L. perenne* × *F. gigantea* hibridų metafazinėse plokštelėse. (A) *L. perenne* (raudona), (B) *L. multiflorum* (raudona), (C) *L. temulentum* (žalia), (D) *F. pratensis* (raudona) ir (E, F) *F. gigantea* (žalia) RT zondai. (C, E) telomerinis (raudona)

ir (D) (žalia) zondai. (A) – 5S rDNR zondas (žalia). Baltos rodyklės – silpnai pasiženklinusios centromerinės sritys. Skalė = 10 μm.

Fig. 3.8. Hybridization of the centromeric RT probes in *L. perenne* × *F. gigantea* metaphase plates. The (A) *L. perenne* (red), (B) *L. multiflorum* (red), (C) *L. temulentum* (green), (D) *F. pratensis* (red) and (E, F) *F. gigantea* (green) RT probes. (C, E) telomeric (red) and (D) (green) probes. (A) – 5S rDNA (green). The white arrows – faintly marked centromeric regions. Scale bar = 10 μm.

Fesreba sekos hibridizacija papildomai buvo tirta tą pačią *L. perenne* × *F. gigantea* metafazinę plokštelę panaudojus dviem iš eilės FISH eksperimentams, ją hibridizavus skirtingais zondais. Pastebėta, kad *L. perenne* ir *L. multiflorum* RT zondai hibridizavosi 21 chromosomos centromerinėse srityse ir per visą 7 chromosomų ilgį (3.9 A1, B1 pav.). Taip pat stebėta *L. perenne* gDNR zondo hibridizacija 7 chromosomose, kuriose anksčiau buvo matoma *L. perenne* ir *L. multiflorum* RT zondo hibridizacija (3.9 A2, B2 pav.).



3.9 pav. Centromerinio *L. perenne* RT (A1), *L. multiflorum* RT (B1) ir *L. perenne* gDNR (A2 ir B2) zondų hibridizacija *L. perenne* × *F. gigantea* hibrido metafazinėse plokštelėse. Žalia spalva – centromerinis zondas, raudona – genomis zondas. Skalė = 10 μm.

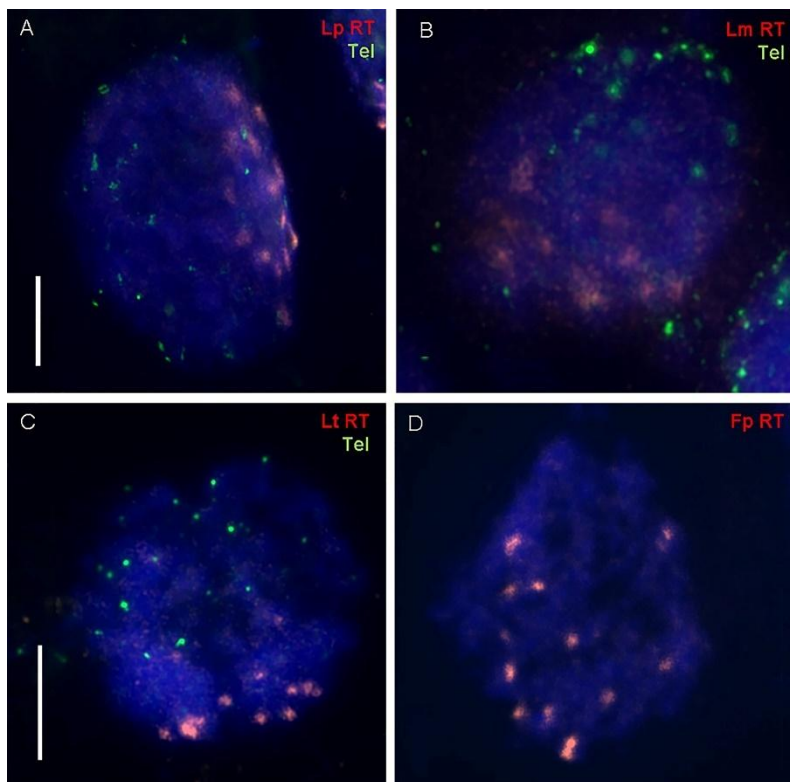
Fig. 3.9. Hybridization of centromeric *L. perenne* RT (A1) and *L. multiflorum* RT (B1) probes and gDNA *L. perenne* (A2, B2) probe in *L. perenne* × *F. gigantea* metaphase plates. The green – centromeric probes, red – genomic probe. Scale bar = 10 μm.

FISH metodas atskleidė, kad tiek *F. gigantea* (3.7 pav.), tiek *L. perenne* × *F. gigantea* hibridų (3.8 pav.) metafazinėse plokštelėse Fesreba retrotranspozono RT zondas hibridizuojasi centromeriniuose regionuose, tačiau skiriasi signalo stiprumas ir pobūdis. Kai kuriose *L. perenne* × *F. gigantea* metafazėse RT zondo signalas pasiskirstęs difuziškai – jis išsklaidytas per visą septynių chromosomų ilgį (3.9 pav.), o tai leidžia manyti, kad retrotranspozono RT sekos yra įsiterpusios per visą šių chromosomų ilgį. Kalbant apie telomerines sekas, tiek *F. gigantea*, tiek *L. perenne* × *F. gigantea* hibridams būdingi intersticiniai telomerinių sekų tarpai (3.4 C pav., 3.7 A pav.).

3.3.3. Chromosomų centromerų ir telomerų FISH ypatumai interfaziniuose branduoliuose

Siekiant nustatyti chromosomų teritorijų (ChT) organizacinių centrų (centromerų ir telomerų) padėtį buvo naudojamos skirtingo ploidiškumo *Festuca* ir *Lolium* rūšių bei *L. perenne* × *F. gigantea* hibridų citologiniai preparatai, hibridizuoti centromeriniais ir telomeriniais zondais. *F. gigantea* ir *L. perenne* × *F. gigantea* rūšių buvo įvertinta po $N = 160\text{--}200$, *L. perenne*, *L. multiflorum*, *L. temulentum* ir *F. pratensis* po $N = 20$ interfazinių branduolių. Buvo vertinamas Fesreba RT zondų hibridizacijos signalų skaičius ir intensyvumas.

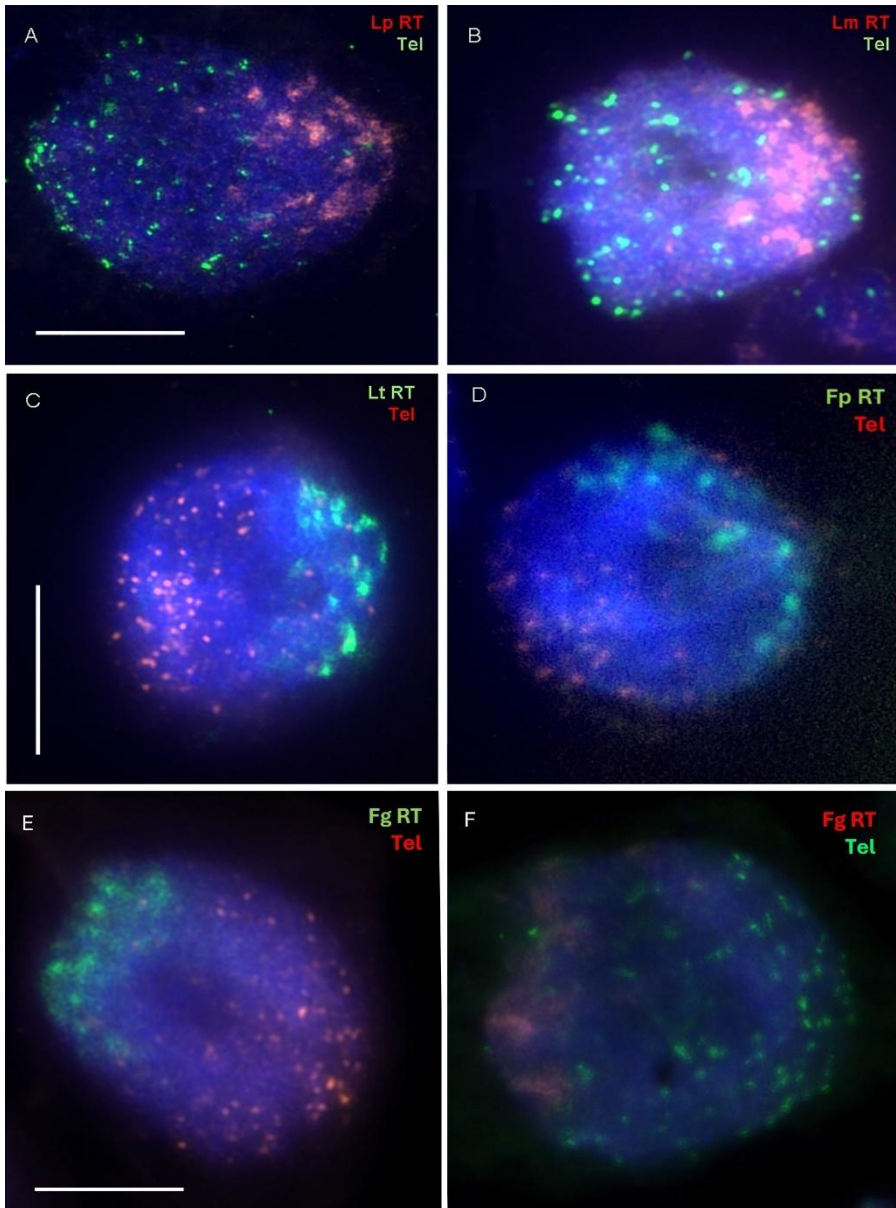
Analizuojant diploidinių *Festuca* ir *Lolium* rūšių branduolius, pastebėta, kad centromerinių signalų skaičius ne visada atitiko keturiolikos mitotinių chromosomų skaičių (3.6 lentelė, 3.10 pav.), kartais jie sudarė signalų grupes. Centromeros ir telomeros išsidėstydavo priešingose branduolio poliuose (3.10 pav.).



3.10 pav. Centromerinio Fesreba RT zondo hibridizacija diploidinių rūšių interfaziniuose branduoliuose, atitinkamai naudojant tos pačios rūšies RT zondus. (A) *L. perenne*, (B) *L. multiflorum*, (C) *L. temulentum* ir (D) *F. pratensis*. Raudona spalva – centromeros, žalia – telomeros. Skalė = 10 μ m.

Fig. 3.10. Hybridization of the centromeric RT probe in interphase nuclei of diploid species, using the same species of RT probes accordingly. The (A) *L. perenne*, (B) *L. multiflorum*, (C) *L. temulentum* and (D) *F. pratensis*. The red – centromeres, green – telomeres. Scale bar = 10 μ m.

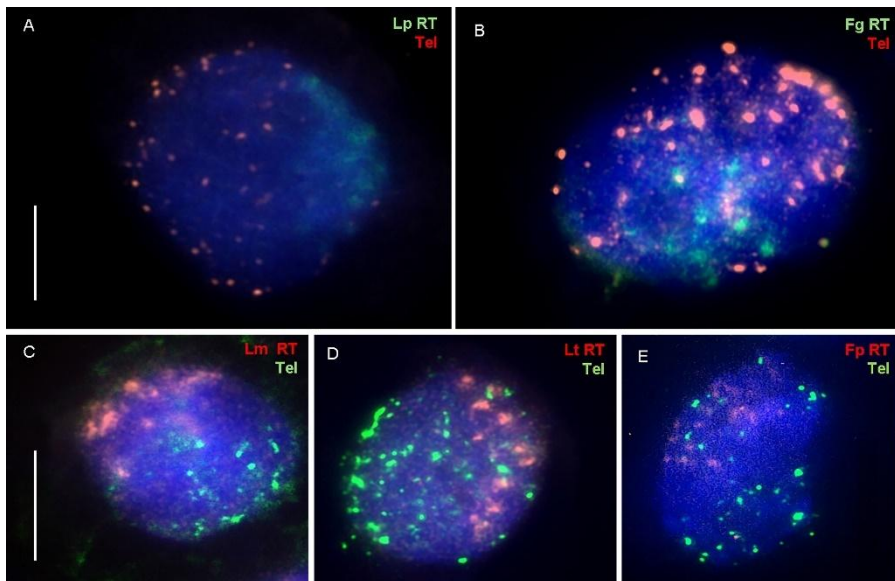
Atlikus *F. gigantea* heksaploido interfazinių branduolių analizę, panaudojus jo galimų tėvinių rūšių *L. perenne*, *L. multiflorum*, *L. temulentum* ir *F. pratensis* bei *F. gigantea* (kontrolė) gDNR kaip matricą RT zondo gamybai, nustatyta, kad didžiausias centromerinių signalų skaičius buvo 28 (3.6 lentelė). Dažniausiai hibridizacijos signalai buvo intensyvūs ir sudarė dideles grupes. Toks rezultatas matomas nepriklausomai nuo to, kurios *Festuca* ir *Lolium* rūšies RT zondas buvo naudojamas (3.11 pav.). Centromeriniai ir telomeriniai signalai buvo matomi priešingose branduolio pusėse (3.11 pav.).



3.11 pav. Centromerinio Fesreba RT zondo hibridizacija *F. gigantea* interfaziniuose branduoliuose. (A) *L. perenne* (raudona), (B) *L. multiflorum* (raudona), (C) *L. temulentum* (žalia), (D) *F. pratensis* (žalia), (E) *F. gigantea* (žalia) ir (F) *F. gigantea* (raudona) RT zondai. A, B ir F – telomerinis zondas (žalia), C–E – telomerinis zondas (raudona). Skalė = 20 μm.

Fig. 3.11. Hybridization of the centromeric RT probe in interphase nuclei of *F. gigantea*. The (A) *L. perenne* (red), (B) *L. multiflorum* (red), (C) *L. temulentum* (green), (D) *F. pratensis* (green), (E) *F. gigantea* (green)

and (F) *F. gigantea* (red) RT probes. The A, B and F – telomeric probe (green), C–E – telomeric probe (red). Scale bar = 20 μ m.



3.12 pav. Centromerinio Fesreba RT zondo hibridizacija *L. perenne* $\times$ *F. gigantea* interfaziniuose branduoliuose. (A) *L. perenne* (žalia), (B) *F. gigantea* (žalia), (C) *L. multiflorum* (raudona), (D) *L. temulentum* (raudona) ir (E) *F. pratensis* (raudona) RT zondai. A ir B – telomerinis zondas (raudona), C–E – telomerinis zondas (žalia). Skalė = 10 μ m.

Fig. 3.12. Hybridization of the centromeric RT probe in interphase nuclei of *L. perenne* $\times$ *F. gigantea*. The (A) *L. perenne* (green), (B) *F. gigantea* (green), (C) *L. multiflorum* (red), (D) *L. temulentum* (red), (E) *F. pratensis* (red) RT probes. The A and B – telomeric probe (red), C–E – telomeric probe (green). Scale bar = 10 μ m.

3.6 lentelė. Centromerinės Fesreba sekos minimalus ir maksimalus signalų skaičius *Lolium* ir *Festuca* rūšių bei *L. perenne* × *F. gigantea* hibridų interfaziniuose branduoliuose.

Table 3.6. The minimum and maximum signal numbers of centromeric Fesreba sequences in interphase nuclei of *Lolium*, *Festuca* and *L. perenne* × *F. gigantea*.

Rūšis (ploidiškumas) / <i>Species (Ploidy Level)</i>	Pakartojimų skaičius / <i>Number of Repetitions</i>	Fesreba RT zondų signalų skaičius / <i>No. of Fesreba RT Probe Signals</i>				
		Lp*	Lm	Lt	Fp	Fg
<i>F. gigantea</i> (2n = 6x = 42)	50	16–28	13–21	16–22	11–22	10–27
<i>L. perenne</i> × <i>F. gigantea</i> (2n = 4x = 28)	46	10–18	10–20	10–20	11–18	9–20
<i>L. perenne</i> (2n = 2x = 14)	9	9–14	–	–	–	–
<i>L. multiflorum</i> (2n = 2x = 14)	8	–	10–14	–	–	–
<i>L. temulentum</i> (2n = 2x = 14)	7	–	–	9–14	–	–
<i>F. pratensis</i> (2n = 2x = 14)	12	–	–	–	11–14	–

*Lp – *L. perenne*, Lm – *L. multiflorum*, Lt – *L. temulentum*, Fp – *F. pratensis*, Fg – *F. gigantea*

Toks dėsningumas išliko ir tetraploidinių *L. perenne* × *F. gigantea* hibridų interfaziniuose branduoliuose, kuriuose didžiausias matomas centromerinių signalų skaičius buvo 20 (3.6 lentelė, 3.12 pav.). Jų hibridizacijos signalų intensyvumas rečiau buvo silpnas, o dažniau sudarė dideles grupes. ChT organizaciniai centrai telkėsi priešingose branduolio pusėse (3.12 pav.).

Apibendrinant, poliploidinių *F. gigantea* ir *L. perenne* × *F. gigantea* augalų centromerinių signalų skaičius neatitiko mitotinių chromosomų skaičiaus, nes Fesreba RT zondo hibridizacijos signalų intensyvumas sudarė didesnes grupes. Tyrimo rezultatai patvirtino, kad didžiojo eraičino ir jo galimų tėvinių rūšių bei jų hibridų chromosomos interfazės metu išsidėsto Rablo konfigūracija, kuomet centromeros ir telomeros išsidėsto priešingose vidinės interfazinio branduolio membranos pusėse.

3.3.4. rDNR sekų pasiskirstymas *F. gigantea* ir *L. perenne* × *F. gigantea* hibriduose

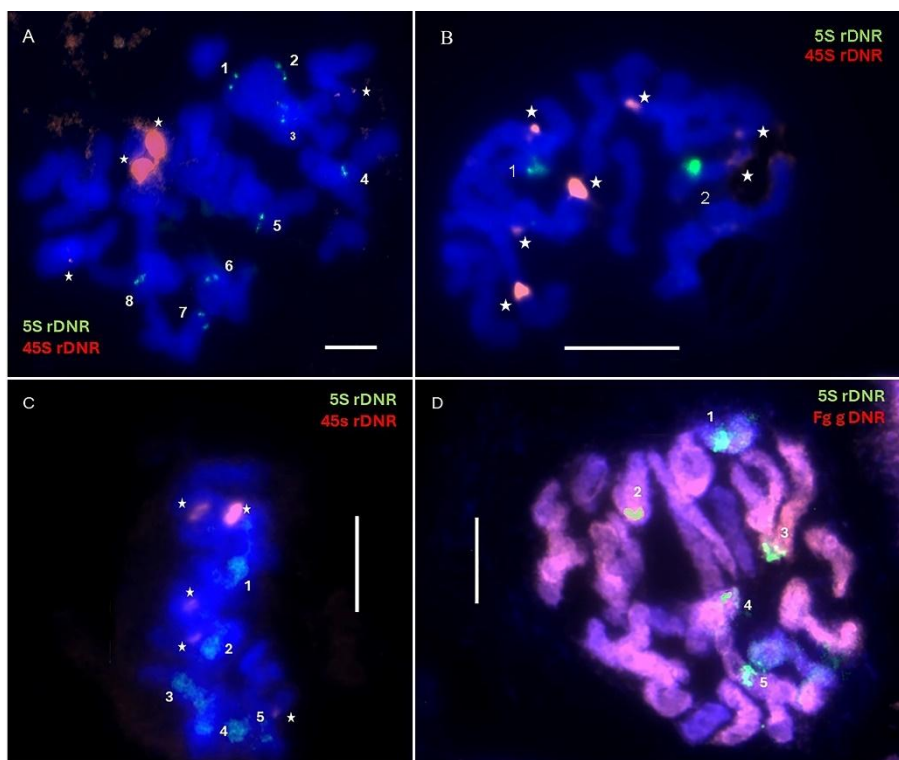
Alopoliploidinių rūšių evoliucijos metu įvykusių chromosomų persitvarkymams suprasti yra svarbūs rDNR sričių tyrimai. Šiam tyrimui naudojome mūsų sukurtų hibridų ir jų tėvinių rūšių citologinius preparatus, kuriuos hibridizavome 5S ir 45S rDNR zondais. Buvo nustatytas šių rDNR sekų signalų skaičius. Panaudojus *F. gigantea* gDNR ir 5S rDNR zondų derinį buvo siekiama nustatyti iš *F. gigantea* paveldėtų 5S rDNR sričių skaičių ir šios sekos stabilumą F1 *L. perenne* × *F. gigantea* hibriduose.

3.7 lentelė. *F. gigantea*, *L. perenne* ir *L. perenne* × *F. gigantea* rDNR lokusų skaičius.

Table 3.7. The number of *F. gigantea*, *L. perenne* ir *L. perenne* × *F. gigantea* rDNA loci.

Rūšis (ploidiškumas) / Species (Ploidy Level)	Pakartojimų skaičius / Number of Repetitions	Metafazinių plokštelių sk. / No. of Metaphase Plates	Interfazinių branduolių sk. / No. of Interphase Nuclei	rDNR lokusų skaičius / No. of rDNA loci	
				45S rDNR / 45S rDNA	5S rDNR / 5S rDNA
<i>F. gigantea</i> (2n = 6x = 42)	41	53	41	4	8
<i>L. perenne</i> (2n = 2x = 14)	11	55	42	7	2
<i>L. perenne</i> × <i>F. gigantea</i> (2n = 4x = 28)	40	104	53	5	5

FISH rezultatas parodė, kad *F. gigantea* yra būdingos keturios poros chromosomų, turinčių 5S rDNR (8 signalai) sritis. Keturios sritys lokalizuojasi chromosomų antrinėse persmaukose, o kitos keturios – chromosomų pečių galuose. Dvi chromosomų poros turi 45S rDNR, matomi 4 signalai, esantys antrinėse chromosomų persmaukose (3.7 lentelė, 3.13 A ir 3.14 A pav.). *L. perenne* chromosomose buvo stebimai du 5S rDNR signalai lokalizuoti antrinėse chromosomų persmaukose. Vienas hibridizacijos signalas generavo didesnį plotą, kitas signalas buvo mažiau intensyvus. Šioje chromosomų poroje buvo matomi ir 45S rDNR signalai. Penki 45S rDNR signalai lokalizavosi antrinėse persmaukose (3.7 lentelė, 3.13 B ir 3.14 B pav.), iš jų 4 signalai buvo intensyvesni ir generavo didesnį plotą. *L. perenne* × *F. gigantea* hibridų chromosomose buvo matomi penki 5S ir penki 45S rDNR lokusai, du intensyvūs 45S rDNR hibridizacijos signalai ir generuojami didesni jų plotai ir trys mažiau intensyvūs signalai bei trys 5S rDNR zondo intensyvūs hibridizacijos signalai ir du – mažiau intensyvūs (3.7 lentelė, 3.13 C ir 3.14 C pav.).

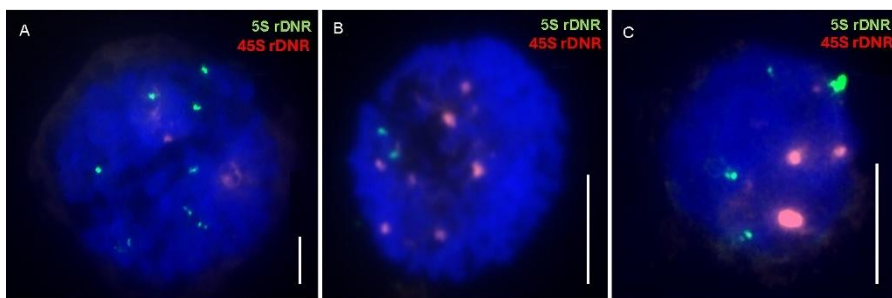


3.13 pav. 5S ir 45S rDNR FISH/GISH tėvinių rūšių ir hibridų metafazinėse plokštelėse. (A) *F. gigantea*, (B) *L. perenne* ir (C, D) *L. perenne* × *F. gigantea*

metafazinės plokštelės. Baltos žvaigždės – 45S rDNR. Skaičiai 1–8 – 5S rDNR. Skalė = 10 µm.

Fig. 3.13. *The 5S and 45S rDNA FISH/GISH in metaphase plates of parental species and their hybrids. The (A) F. gigantea, (B) L. perenne and (C, D) L. perenne × F. gigantea metaphasis plates. The white stars – 45S rDNA; 1–8 number – 5S rDNA. Scale bar = 10 µm.*

Analizuojant *L. perenne* × *F. gigantea* hibridų 5S rDNR padėties pokyčius metafazinėse chromosomose buvo naudotas *F. gigantea* gDNR ir 5S rDNR zondų derinys. Buvo matomas vienas 5S rDNR intensyvus hibridizacijos signalas chromosomos petyje, kuris neturėjo *F. gigantea* gDNR zondo hibridizacijos signalo (3.13 D pav.). Ši chromosoma yra kilusi iš *L. perenne*. Kitose 4 chromosomose, turinčiose 5S rDNR signalą, hibridizacija įvyko ir su *F. gigantea* gDNR zonu (3.13 D pav.). Gauti duomenys patvirtino spėjimą, kad hibridai turėjo paveldėti vieną chromosomą, turinčią 5S rDNR sritį, iš daugiametės svidrės ir keturias chromosomas, turinčias šią sritį, iš didžiojo eraičino.



3.14 pav. 5S ir 45S rDNR FISH tėvinių rūšių ir hibridų interfaziniuose branduoliuose. (A) *F. gigantea*, (B) *L. perenne* ir (C) *L. perenne* × *F. gigantea* interfaziniai branduoliai. 5S rDNR – žalia; 45S rDNR – raudona. Skalė = 10 µm.

Fig. 3.14. *The 5S and 45S rDNA FISH in interphase nuclei of parental species and their hybrids. The (A) F. gigantea, (B) L. perenne and (C) L. perenne × F. gigantea interphase nuclei. The 5S rDNA – green; 45S rDNA – red. Scale bar = 10 µm.*

FISH leido nustatyti *L. perenne* × *F. gigantea* hibridų paveldėtų rDNR sekų skaičių ir lokalizaciją metafazinėse chromosomose. Analizė atskleidė, kad hibridai paveldėjo po penkis 5S ir 45S rDNR lokusus. Be to, lyginat su tėvinėmis rūšimis, nebuvo nei 5S rDNR lokusų praradimo, nei jų skaičiaus pagausėjimo, o tai rodo šios sekos elemento stabilumą šiuose hibriduose.

Pastaba / Note: 3.2 ir 3.3 rezultatų dalys buvo aprašytos remiantis autorės apžvalgine publikacija, kuri atspindi autorės pagrindinį indelį. Publikacija yra įtraukta į literatūros sąrašą. Autorės publikacija / 3.2 and 3.3 parts of the results to describe based on the author's review article which demonstrated the author's main contribution and mentioned in the reference list: Stakelienė, V., & Pašakinskienė, I. (2022). Fluorescent *in situ* hybridisation in plants: new ways to link DNA sequence resources and chromosome loci – a review. *Zemdirbyste-Agriculture*, 109: 171–178.

3.4. Šaknų endofitų įvairovė *F. gigantea* ir giminingose *Festuca/Lolium* rūšyse bei *L. perenne* × *F. gigantea* hibriduose

Šiame darbe buvo nagrinėjami *F. gigantea* ryšiai su endofitais. Buvo pasirinkti daugiamečiai augalai *F. gigantea*, *F. arundinacea*, *F. pratensis*, *L. perenne*, *L. perenne* × *F. gigantea* hibridai ir vienmečiai *L. multiflorum* bei *L. temulentum*. Pirmiausiai, įvertintas endofitinių grybų morfostruktūrų dažnis kiekvienos rūšies šaknyse. Sekančiame etape buvo izoliuoti grybų ir bakterijų endofitai ir įvertintas jų pasiskirstymas. Paskutiniame eksperimente nustatytas endofitinių grybų inokuliacijos poveikis gausiažiedės svidrės augalų augimui.

3.4.1. Endofitų citologinės morfostruktūros ir jų dažnis šaknyse

Mikroskopiškai buvo vertinti *F. gigantea* šaknų viršūnės skersinio pjūvio preparatai (toliau – šaknyse). Grybų morfostruktūros buvo sugrupuotos į šešis skirtingus citomorfotipus: 1) stori, dematiški (turintys tamsų pigmentą) ir labai išsišakoję hifai (3.15 A pav.); 2) hialininiai (neturintys pigmento), į „pumpurus“ panašūs, viename gale dichotomiškai išsišakoję ir ~130 μm ilgio hifai (3.15 B pav.); 3) ploni, melanizuoti (turintys pigmento), dichotomiškai išsišakoję hifai (3.15 C, D pav.); 4) tamsūs su pertvarom hifai (3.15 E pav.); 5) *Alternaria* tipo daugialastės konidijos (3.15 F pav.); 6) grybų sporų aglomeracijos (sporų sankaupos) (3.15 G pav.). Dauguma grybinių struktūrų buvo tarplastelinės (3.15 A–C, E, H ir I pav.), kartais buvo aptikta vidulastelinių (3.15 D pav.). Kai kurie hifai buvo susitelkę į tankias grupes (3.15 H ir I pav.).

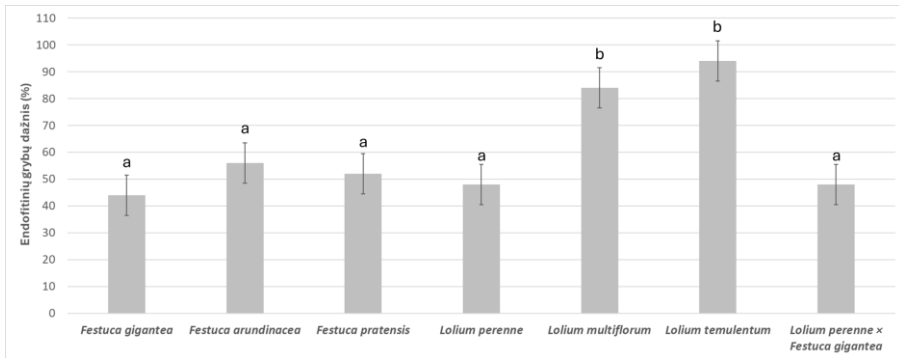


3.15 pav. Endofitinių grybų ir bakterijų morfotipų citologinis vaizdas *F. gigantea* šaknyse: (A–E) endofitinių grybų hifų vaizdai; (F) *Alternaria* tipo konidijos; (G) grybų sporų sankaupos; (H ir I) hifų sankaupos; (J) didelė krūva bacilos tipo endofitinių bakterijų; (K) bakterijų grandinė. Skalė = 10 μm.

Fig. 3.15. Cytological view of fungal and bacterial endophyte morphotypes in the root of *F. gigantea*: (A–E) images of endophytic fungi hyphae; (F) *Alternaria*-type conidia; (G) agglomerates of fungal spores; (H and I) clusters of hyphae; (J) large bunches of *Bacillus*-type endophytic bacteria; (K) chains of filamentous bacteria. Scale bar = 10 μm.

Taip pat buvo aptiktos endofitinių bakterijų struktūros: didelės išsibarsčiusios bacilų tipo bakterijų grupės ir bakterijų grandinės (3.15 J ir K pav.).

Naudojant Tripano mėlio dažą buvo įvertintas endofitinių grybų dažnis *F. gigantea* ir daugiamečių *Festuca*, *Lolium* rūšių ir jų hibridų bei vienmečių *Lolium* spp. augalų šaknyse, vertinant po $N = 120$ šaknų fragmentų. Grybų struktūros buvo stebėtos 44 % *F. gigantea* tirtų šaknų. Kitose *Festuca* rūšyse grybinės struktūros buvo matomos 52–56 % tirtų šaknų (3.16 pav.).



3.16 pav. Endofitinių grybų struktūrų dažnis *Lolium* ir *Festuca* rūšių bei *L. perenne* × *F. gigantea* hibridų šaknyse. Skirtingos raidės virš paklaidų juostų rodo reikšmingus skirtumus tarp rūšių ($p \leq 0,05$), remiantis Tukey HSD post-hoc testu. Varianto $N = 120$.

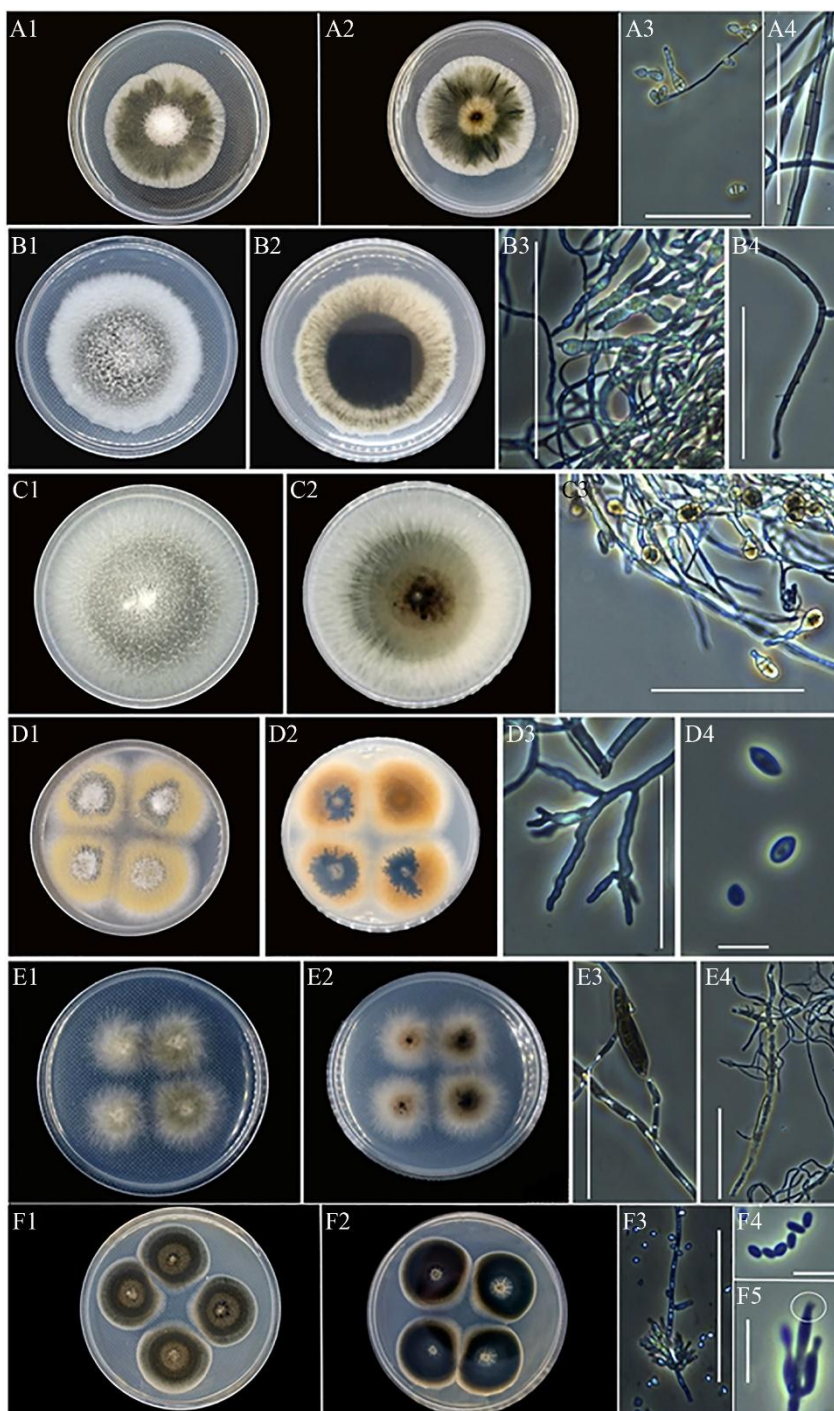
Fig. 3.16. Colonization frequency of endophytic fungi in root tip cuttings of *Lolium* and *Festuca* species and *L. perenne* × *F. gigantea* hybrids. Different letters above the bars indicate significant differences between the species ($p \leq 0.05$) based on Tukey's HSD post-hoc test. Variant $N = 120$.

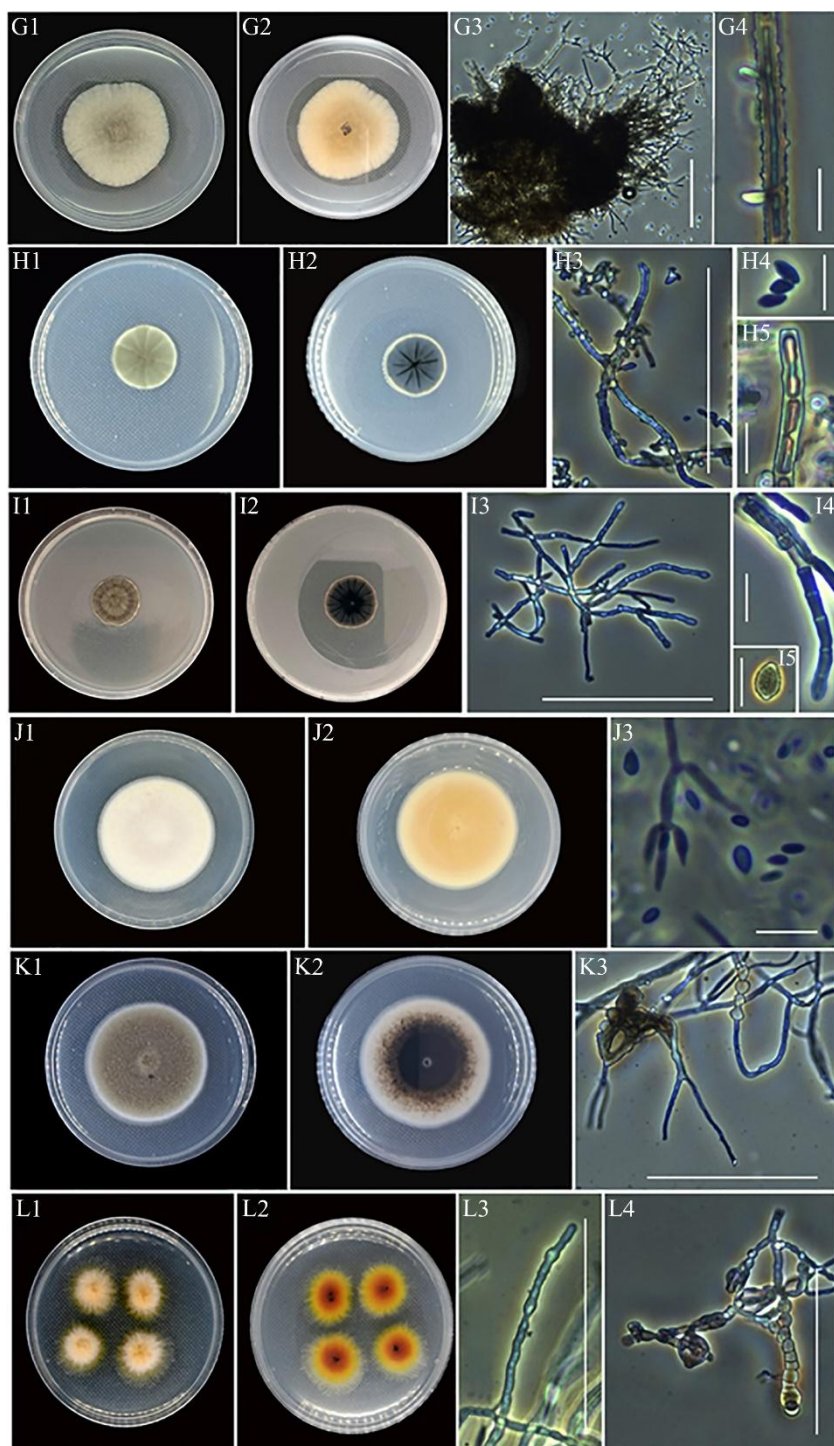
Didžiausias endofitinių grybų struktūrų dažnis nustatytas vienmečių *L. temulentum* (94 %) ir *L. multiflorum* (84 %) rūšių šaknyse, priešingai nei daugiamečiuose *L. perenne* (48 %) augaluose. *L. perenne* × *F. gigantea* hibridų grybų kolonizacijos dažnis buvo toks pats kaip ir tėvinėse rūšyse.

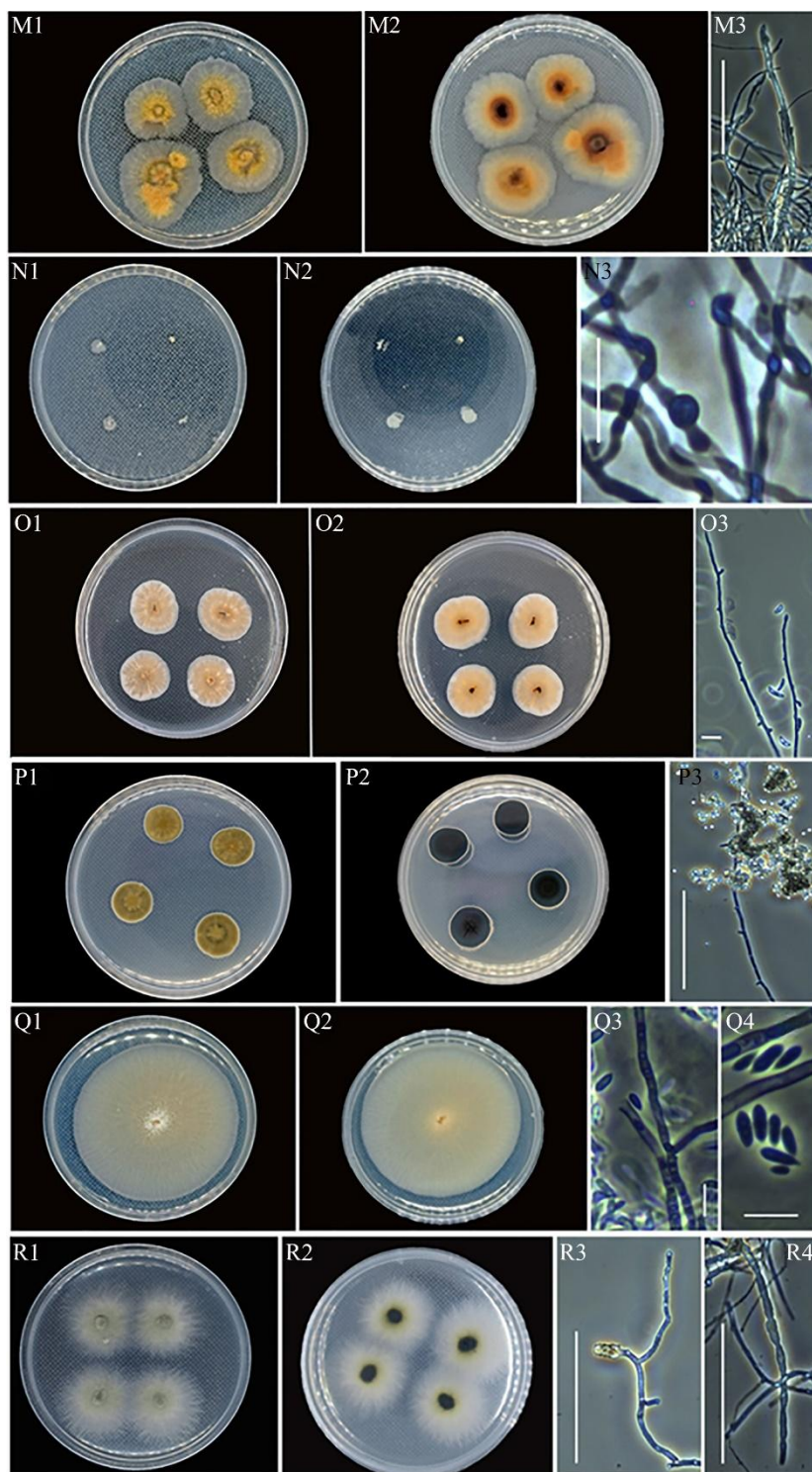
3.4.2. Endofitinių grybų įvairovė ir jų pasiskirstymas *F. gigantea* ir giminingose rūšyse

Endofitinių grybų izoliatai buvo išauginti ant PDA terpės. Iš viso buvo įvertinta po $N = 200$ – 250 šaknų fragmentų kiekvienai rūšiai, atliekant 8–10 sodinimų. Kontrolinėse Petri lėkštelėse, kuriose buvo įpilta po 200 μ l paskutinio šaknų plovimo vandens, kolonijų augimas nebuvo aptiktas. Tai rodo, kad šaknų paviršius buvo sterilus, o ant terpės augantys grybai buvo kilę iš šaknų vidinių audinių.

Rūšių taksonominis priskyrimas buvo atliktas remiantis kolonijos morfologija ir micelio citomorfologija (priedas S1) bei taksonomiškai patvirtinti palyginus su DNR ITS, *RPB2*, *SSU* ir *TEFI-a* regionų sekų duomenimis 98 – 100 % ribose, naudojant BLAST įrankį (lentelė S1).



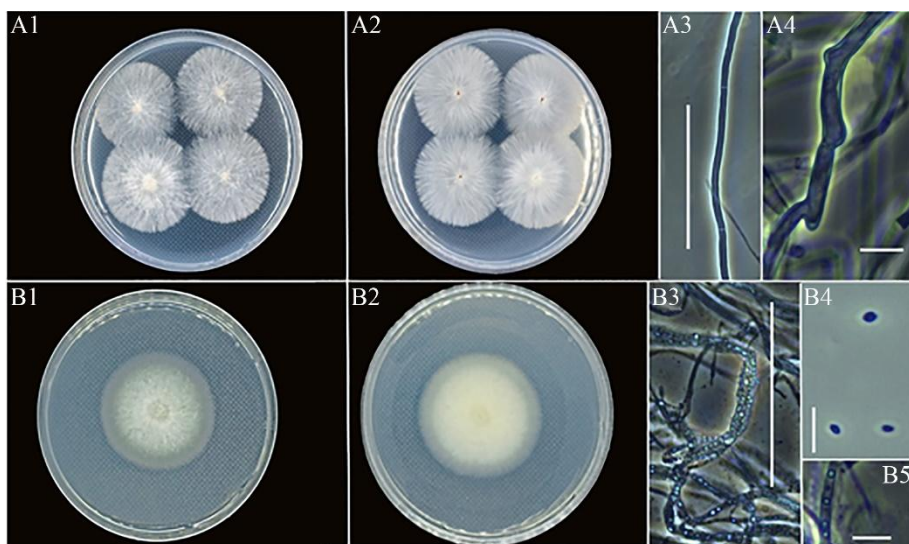




3.17 pav. Ascomycota 7–10 dienų izoliatai *Festuca* ir *Lolium* rūšyse ir jų hibriduose (viršutinė pusė kairėje, apatinė dešinėje): (A1, A2) *Alternaria alternata*, (A3) daugialastės konidijos su trumpais kūginiais snapeliais, (A4) segmentuoti, subhialiniai hifai; (B1, B2) *Alternaria infectoria*, (B3) konidijos ir konidijakočiai, (B4) segmentuoti hifai; (C1, C2) *Alternaria rosae*, (C3) konidijos su segmentuotais konidijakočiais ir hifai; (D1, D2) *Aureobasidium pullulans*, (D3) hifai, (D4) konidijos; (E1, E2) *Bipolaris sorokiniana*, (E3) konidijakotis ir konidija, (E4) hifai; (F1, F2) *Cadophora fastigiata*, (F3, F5) konidijakočiai (pažymėtas piltuviškas antkaklis) ir segmentuoti hifai, (F4) konidija; (G1, G2) *Chaetomium funicola*, (G3) askoma ir askosporos, (G4) askomos dichotomiškai išsišakojusios galinės atšakos; (H1, H2) *Cladosporium cladosporioides*, (H3, H5) konidiogeninė ląstelė, (H4) konidijos; (I1, I2) *Cladosporium halotolerans*, (I3, I4) segmentuoti hifai, (I5) konidija; (J1, J2) *Cordyceps fumosorosea*, (J3) konidijakotis ir konidijos; (K1, K2) *Didymella macrostoma*, (K3) chlamidosporos; (L1, L2) *Epicoccum nigrum*, (L3) pseudohifai, (L4) chlamidosporos ir blastosporos; (M1, M2) *Hypoxyton rubiginosum*, (M3) hifai; (N1, N2) *Lomentospora* sp., (N3) hifai ir konidijakotis; (O1, O2) *Microdochium bolleyi*, (O3) konidija ant cilindrinės konidiogeninės ląstelės, (O4) chlamidosporos; (P1, P2) *Paraphoma fimeti*, (P3) konidiogeninė ląstelė ir konidijos; (Q1, Q2) *Plectosphaerella cucumerina*, (Q3) hifai ir konidijos, (Q4) konidijos; (R1, R2) *Pyrenophora dictyoides*, (R3, R4) konidija ir konidijakotis. Skalė: A3, A4, B3, B4, C3, E3, E4, F3, G3, D3, H3, I3, K3, L3, L4, M3, O4, P3, R3 ir R4 = 100 µm; F4, F5, G4, D4, H4, H5, I4, I5, J3, N3, O3, Q3 ir Q4 = 10 µm.

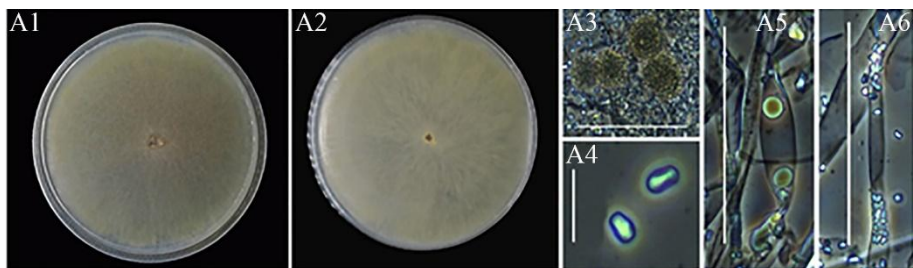
Fig. 3.17. Ascomycota 7–10-day isolate colonies on PDA medium (top image on the left, reverse on the right) from the roots of *Festuca* spp., *Lolium* spp. and in their hybrids; cytomorphological images obtained from mycelium as follows: (B1, B2) *Alternaria infectoria*, (B3) conidia and conidiophores, (B4) segmented hyphae; (C1, C2) *Alternaria rosae*, (C3) conidia with segmented conidiophores and hyphae; (D1, D2) *Aureobasidium pullulans*, (D3) hyphae, (D4) conidia; (E1, E2) *Bipolaris sorokiniana*, (E3) conidiophores and conidia (E4) hyphae; (F1, F2) *Cadophora fastigiata*, (F3, F5) conidiophores (funnel-shaped collarete marked) and segmented hyphae, (F4) conidia; (G1, G2) *Chaetomium funicola*, (G3) ascomata and ascospores, (G4) dichotomous terminal branches of the ascoma; (H1, H2) *Cladosporium cladosporioides*, (H3, H5) conidiogenous cell, (H4) conidia; (I1, I2) *Cladosporium halotolerans*, (I3, I4) segmented hyphae, (I5) conidia; (J1, J2) *Cordyceps fumosorosea*, (J3) conidiophore and conidia; (K1, K2) *Didymella macrostoma*, (K3) chlamydospores; (L1, L2) *Epicoccum nigrum*, (L3) pseudohyphae, (L4) chlamydospores and blastospores; (M1, M2) *Hypoxyton rubiginosum*, (M3) hyphae; (N1, N2) *Lomentospora* sp.,

(N3) hyphae and conidophore; (O1, O2) *Microdochium bolleyi*, (O3) conidia on cylindrical conidiogenous cells, (O4) chlamydospores; (P1, P2) *Paraphoma fimeti*, (P3) conidiogenous cell and conidia; (Q1, Q2) *Plectosphaerella cucumerina*, (Q3) hyphae and conidia, (Q4) conidia; (R1, R2) *Pyrenophora dictyoides*, (R3, R4) conidia and conidiophore. Scale bar: A3, A4, B3, B4, C3, E3, E4, F3, G3, D3, H3, I3, K3, L3, L4, M3, O4, P3, R3 ir R4 = 100 μ m; F4, F5, G4, D4, H4, H5, I4, I5, J3, N3, O3, Q3 ir Q4 = 10 μ m.



3.18 pav. Basidiomycota 7–10 dienų izoliatų kolonijos iš *F. gigantea* šaknų (viršutinė pusė kairėje, apatinė dešinėje): (A1, A2) *Coprinellus disseminatus*, (A3, A4) segmentuoti hifai; (B1, B2) *Sistotrema brinkmannii*, (B3, B5) hifai, (B4) bazidiosporos. Skalė: A3 ir B3 = 100 μ m; A4, B4 ir B5 = 10 μ m.

Fig. 3.18. Basidiomycota 7-10-day isolates colonies from *F. gigantea* roots (top image on the left, reverse on the right): (A1, A2) *Coprinellus disseminatus*, (A3, A4) segmented hyphae; (B1, B2) *Sistotrema brinkmannii*, (B3, B5) hyphae, (B4) basidiospores. Scale bar: A3 and B3 = 100 μ m; A4, B4 and B5 = 10 μ m.

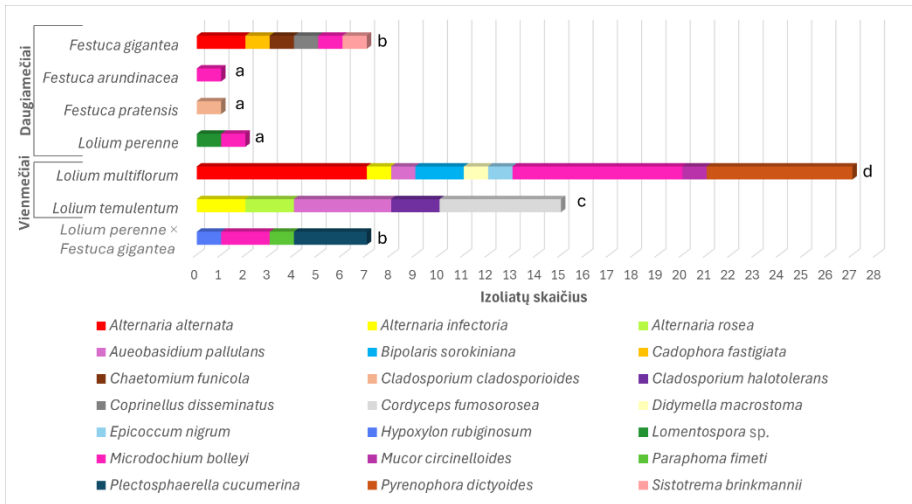


3.19 pav. Mucoromycota 7 dienų izoliato kolonija iš *L. multiflorum* šaknų (viršutinė pusė kairėje, apatinė dešinėje): (A1, A2) *Mucor circinelloides*, (A3) sporangija, (A4, A5) sporangiosporos, (A6) hifai, kuriuose yra lipidų kūnai. Skalė: A3, A5 ir A6 = 100 µm; A4 = 10 µm.

Fig. 3.19. *Mucoromycota* 7-day isolate colony from *L. multiflorum* roots (top image on the left, reverse on the right): (A1, A2) *Mucor circinelloides*, (A3) sporangia, (A4, A5) sporangiospores, (A6) hyphae containing lipid bodies; Scale bar: A3, A5 and A6 = 100 µm; A4 = 10 µm.

Iš *F. gigantea* ir jam artimų *Festuca*, *Lolium* rūšių bei *L. perenne* × *F. gigantea* hibridų buvo izoliuota 60 endofitinių grybų kolonijų, priskirtų 21 taksonui (3.17–3.19 pav., lentelė S1). Iš jų, 18 rūšių buvo Ascomycota skyriaus atstovai (3.17 ir 3.20 pav.). Dvi Basidiomycota rūšys, *Coprinellus disseminatus* ir *Sistotrema brinkmannii*, buvo izoliuoti tik iš *F. gigantea* šaknų (3.18 ir 3.20 pav.). Iš tiriamos *Festuca* augalų grupės, *F. gigantea* pasižymėjo didžiausia grybų įvairove, išskirtos šešios grybų rūšys (IF = 29 %), o Basidiomycota grybai sudarė 1/3 dalį rūšių (3.20 pav.). *Mucor circinelloides*, priklausantis Mucoromycota skyriui, buvo izoliuotas iš *L. multiflorum* šaknų (3.19 ir 3.20 pav.).

Iš tirtų *Lolium* rūšių didžiausia grybų įvairove pasižymėjo vienmetė *L. multiflorum*. Šiuo atveju buvo izoliuoti 9 taksonai, IF = 43 % (3.20 pav.). Tuo tarpu *L. temulentum* ir *L. perenne* × *F. gigantea* hibridams buvo būdingas mažesnis grybų įvairovės rodiklis, atitinkamai 5 ir 4 taksonai (IF = 24 % ir IF = 19 %). Mažiausia įvairovė stebėta *L. perenne*, *F. arundinacea* ir *F. pratensis* augaluose. Šiose rūšyse buvo nustatyta tik viena ar dvi endofitinės grybų rūšys, iš kurių gauta po vieną ar dvi kolonijas (3.20 pav.).



3.20 pav. Endofitinių grybų, išskirtų iš *Festuca* ir *Lolium* rūšių ir jų hibridų šaknų, paplitimas. Skirtingos raidės virš juostų rodo reikšmingus skirtumus tarp rūšių ($p \leq 0,05$), remiantis Tukey HSD post-hoc testu.

Fig. 3.20. Distribution of endophytic fungi isolated from the roots of *Festuca* and *Lolium* species and their hybrids. Different letters above the bars indicate significant differences between the species ($p \leq 0.05$) based on Tukey's HSD post-hoc test.

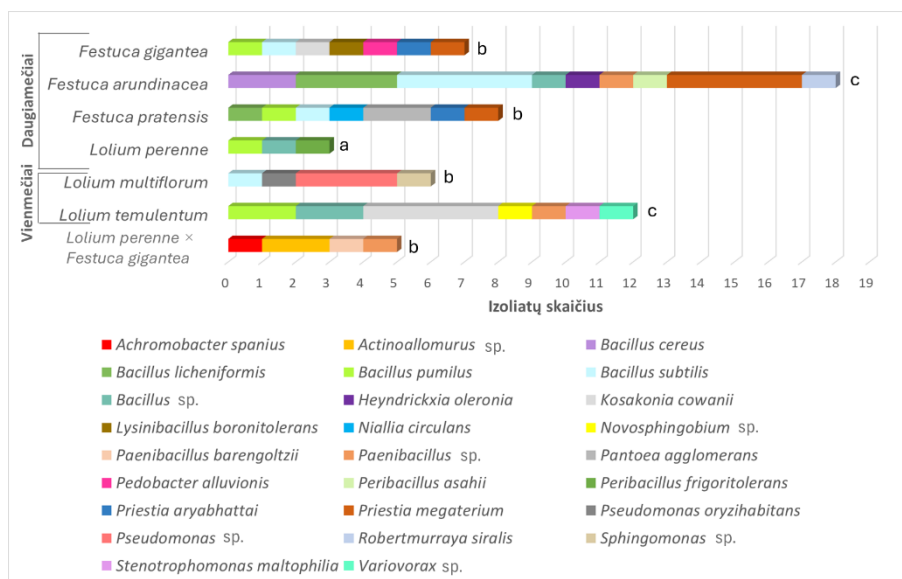
Pagal izoliavimo dažnį (IF, %) endofitinių grybų rūšys hierarchiškai pateiktos lentelėje S2. Labiausiai paplitusi rūšis buvo *M. bolleyi*, kuri buvo aptikta penkiose iš septynių rūšių – gauta 12 izoliatų, (IF = 20 %) (3.20 pav.). Kita plačiai paplitusi rūšis buvo *A. alternata* – izoliuotos 9 kolonijos, (IF = 15 %) (3.20 pav.). Tiek *M. bolleyi*, tiek *A. alternata* dažniausiai buvo izoliuoti iš *L. multiflorum*, gauta po 7 izoliatų, IF = 12 % kiekvienam (3.20 pav.). Daugiausia izoliatų (27) gauta iš *L. multiflorum*, po to sekė *L. temulentum* su 15 izoliatų, atitinkamai IF = 45 % ir IF = 25 % (3.20 pav.). Šie rezultatai patvirtina mūsų citologinės analizės duomenis, rodančius didelį endofitinių grybų kolonizacijos dažnį šių dviejų vienmečių rūšių šaknyse (3.16 pav.). *F. gigantea* ir *L. perenne* × *F. gigantea* hibriduose izoliuota po 7 kolonijas. Palyginus *L. perenne* ir *F. gigantea* šaknų endofitus su jų *L. perenne* × *F. gigantea* hibridų, atitikimo tarp grybų taksonų nenustatyta, tai yra endofitų rūšių pasiskirstymas buvo skirtingas.

Mūsų tyrimas parodė, kad *F. gigantea* ir kitos *Festuca* ir *Lolium* rūšys bei *L. perenne* × *F. gigantea* hibridai yra įvairių endofitinių grybų šeimininkai. Šių augalų šaknis kolonizuoja endofitiniai grybai iš skirtingų grybų skyrių. Daugiausia rūšių priklausė Ascomycota skyriui, kurioje labiausiai paplitusios

buvo *A. alternata* ir *M. bolleyi* rūšys. Didysis eraičinas išsiskyrė iš kitų rūšių didžiausia grybų įvairovė lyginat su kitomis daugiametėmis *Festuca/Lolium* rūšimis. Be to, net trečdalį grybų rūšių, nustatytų *F. gigantea* šaknyse, sudarė Basidiomycota grybai. Vienmetės *L. multiflorum* ir *L. temulentum* rūšys išsiskyrė dideliu grybų rūšių ir izoliatų skaičiumi.

3.4.3. Endofitinių bakterijų įvairovė ir jų pasiskirstymas *F. gigantea* ir giminingose rūšyse

Iš *F. gigantea* ir jam artimų *Festuca* ir *Lolium* rūšių bei *L. perenne* × *F. gigantea* hibridų šaknų fragmentų ($N = 100$) ant LB terpės buvo išauginti 59 izoliatai, kurie buvo identifikuoti kaip 26 bakterijų taksonai. Jų priskyrimą patvirtino 16S rDNR sekų BLAST rezultatai (lentelė S3). Gautos bakterijų izoliatų 16S DNR sekos buvo deponuotos į GenBank (lentelė S4). Kontrolinėse Petri lėkštelėse, kuriose buvo įpilta po 200 µl paskutinio šaknų plovimo vandens, nebuvo aptikta bakterijų kolonijų augimo. Tai rodo, kad šaknų paviršius buvo sterilus, o ant terpės augančios bakterijos buvo kilusios iš šaknų vidinių audinių.



3.21 pav. Endofitinių bakterijų, išskirtų iš *Festuca* ir *Lolium* rūšių ir jų hibridų šaknų, įvairovė. Skirtingos raidės virš juostų rodo reikšmingus skirtumus tarp rūšių ($p \leq 0,05$), remiantis Tukey HSD post-hoc testu.

Fig. 3.21. Diversity of endophytic bacteria isolated from *Lolium* and *Festuca* species and their hybrids. Different letters above the bars indicate significant

differences between the species ($p \leq 0.05$) based on Tukey's HSD post-hoc test.

Pagal izoliavimo dažnį (IF, %), endofitinių bakterijų gentys pateiktos hierarchiškai lentelėje S2. Tyrimo metu iš *F. gigantea*, *F. pratensis* ir *L. temulentum* šaknų išskirta po 7 bakterijų taksonus, atitinkamai 7 (12 %), 8 (14 %) ir 12 (20 %) izoliatų. Nustatyta, kad didžiausia bakterijų įvairovė pasižymėjo *F. arundinacea* – taksonomiškai buvo patvirtintos 9 rūšys, 18 izoliatų (31 %) (3.21 pav.). Mažiausiai bakterijų taksonų buvo izoliuota iš *L. multiflorum*, *L. perenne* × *F. gigantea* ir *L. perenne* šaknų, atitinkamai 4, 4 ir 3 taksonai (3.21 pav.). Lyginant *F. gigantea* ir *L. perenne* šaknų endofitines bakterijas su izoliuotomis iš *L. perenne* × *F. gigantea* hibridų, atitikimo tarp bakterijų taksonų nenustatyta, t.y. endofitų rūšių pasiskirstymas buvo skirtingas (3.21 pav.).

Įvertinus bakterijų pasiskirstymą tiriamųjų augalų šaknyse, nustatyta, kad labiausiai paplitusios buvo gramteigiamos Bacillota (sinonimas Firmicutes) grupės bakterijos (15 rūšių), priklausančios aštuonioms gentims: *Bacillus*, *Heyndrickxia*, *Lysinibacillus*, *Niallia*, *Paenibacillus*, *Peribacillus*, *Priestia* ir *Robertmurraya* (3.21 pav., lentelė S3). Iš Bacillota grupės dažniausiai buvo paplitę *Bacillus* (IF = 37 %), *Priestia* (IF = 14 %) ir *Paenibacillus* (IF = 7 %) atstovai.

Kita bakterijų grupė, pasižymėjusi gausiu paplitimu, buvo gramneigiamos bakterijos, priklausančios Pseudomonadota (sinonimas Proteobacteria) grupei (9 rūšys). Šioje grupėje nustatyti aštuonių genčių atstovai – *Achromobacter* (Burkholderiales), *Kosakonia* (Enterobacterales), *Novosphingobium* (Sphingomonadales), *Pantoea* (Enterobacterales), *Pseudomonas* (Pseudomonadales), *Sphingomonas* (Sphingomonadales), *Stenotrophomonas* (Lysobacterales) ir *Variovorax* (Burkholderiales) (3.21 pav.). Iš Pseudomonadota grupės dažniausiai buvo izoliuotos *Kosakonia* ir *Pseudomonas* bakterijos, atitinkamai IF = 8 % ir IF = 7 % (3.21 pav.). Padermės iš Actinomycetota ir Bacteroidota / Chlorobiota buvo retos, izoliuota po vieną rūšį, atitinkamai gauti 2 *Actinoallomurus* sp. (Streptosporangiales) izoliatai ir vienas *Pedobacter* sp. (Sphingobacteriales) izoliatas (3.21 pav.).

3.4.4. Endofitinių mikroorganizmų gausumas ir taksonų turtingumas *F. gigantea* ir jam giminingose rūšyse

Buvo atlikti endofitinių grybų ir bakterijų gausumo ir taksonų turtingumo skaičiavimai skirtinguose augaluose šeimininkuose. Gauti rezultatai rodo, kad

F. gigantea turėjo didžiausius endofitinių mikroorganizmų turtingumo indeksus, $D = 2,57$ grybams ir $D = 3,08$ bakterijoms (3.8 lentelė). Kita rūšis, išsiskyrusi didžiausiu endofitinių grybų rūšių turtingumu, buvo vienmetė *L. multiflorum*, $D = 2,43$. Atlikta analizė atskleidė, kad *F. gigantea*, *F. arundinacea*, *F. pratensis* ir *L. temulentum* pasižymėjo didesniu endofitinių bakterijų rūšių turtingumu ($D > 2$) nei *L. perenne*, *L. perenne* $\times$ *F. gigantea* ir *L. multiflorum* ($D < 2$) (3.8 lentelė).

Galima teigti, kad daugiametėms poliploidinėms *F. gigantea* ir *F. arundinacea* rūšims būdinga didesnė endofitų įvairovė ir gausa palyginus su giminingomis diploidinėmis *F. pratensis* ir *L. perenne* rūšimis. Vienmetės *Lolium* rūšys mikroorganizmų gausa ir įvairovė reikšmingai lenkė daugiametės diploidinės *F. pratensis* ir *L. perenne* rūšis, o taip pat ir *L. perenne* $\times$ *F. gigantea* hibridus.

3.8 lentelė. Endofitinių grybų ir bakterijų gausumas ir taksonų turtingumas skirtinguose augaluose šeimininkuose.

Table 3.8. Endophytic fungal and bacterial abundance and taxon richness across different plant species.

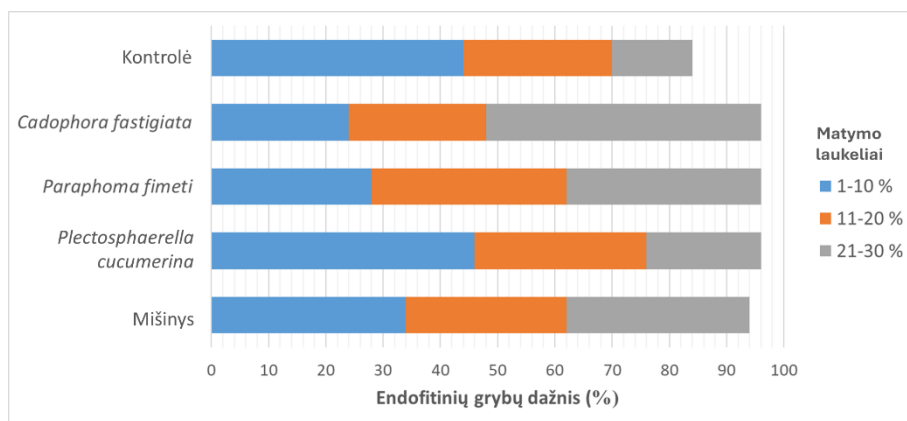
Augalų rūšys / <i>Plant Species</i>	Endofitiniai grybai / <i>Endophytic Fungi</i>			Endofitinės bakterijos / <i>Endophytic Bacteria</i>			Bendras endofitų sk./ <i>Total No. of Endophytes</i>	
	Izoliatų sk. / <i>No. Isolates</i>	Rūšių sk. / <i>No. Species</i>	*D	Izoliatų sk. / <i>No. Isolates</i>	Rūšių sk. / <i>No. Species</i>	D	Izoliatų sk. / <i>No. Isolates</i>	Rūšių sk. / <i>No. Species</i>
Daugiamečiai augalai / <i>Perennials</i>								
<i>F. gigantea</i>	7	6	2,57	7	7	3,08	14	13
<i>F. arundinacea</i>	1	1	1,00	18	9	2,77	19	10
<i>F. pratensis</i>	1	1	1,00	8	7	2,89	9	8
<i>L. perenne</i>	2	2	1,44	3	3	1,82	5	5
<i>L. perenne</i> × <i>F. gigantea</i>	7	4	1,54	5	4	1,86	12	8
Vienmečiai / <i>Annuals</i>								
<i>L. multiflorum</i>	27	9	2,43	6	4	1,67	33	13
<i>L. temulentum</i>	15	5	1,48	12	7	2,41	27	12

*D – Margalefo indeksas / *Margalef's index*.

3.5. Endofitinių grybų inokuliacijos poveikis *L. multiflorum* augalų augimui

Nustatant endofitinių grybų poveikį gausiažiedės svidrės augimui, sėklų inokuliacijai buvo pasirinkti iš *Fetuca* ir *Lolium* šaknų išskirti endofitinių grybų izoliatai: *Cadophora fastigiata* (BSG003), *Paraphoma fimeti* (BSG010) ir *Plectosphaerella cucumerina* (BSG006).

Vertinant grybų dažnį šaknyse praėjus 7 dienoms po inokuliacijos nustatyta, kad skirtinguose inokuliacijos variantuose endofitinių grybų dažnis *L. multiflorum* daigų šaknyse padidėjo nuo 94 % iki 96 %, kai tuo tarpu kontrolinės grupės daiguose endofitų dažnis siekė 84 % (3.22 pav.). Be to, vertinant endofitinių grybų gausumą mėginiuose, pastebėta, kad visų inokuliantų gausumas, 21–30 % matymo laukelių skaičiaus, padidėjo daugiau negu 2 kartus. Tai sudarė 32–48 % šaknų mėginių. Tačiau *P. cucumerina* gausumas *L. multiflorum* daigų šaknyse buvo artima kontrolinei augalų grupei, atitinkamai 20 % ir 14 % mėginių (3.22 pav.). Šie rezultatai rodo, kad inokuliacija endofitinių grybų sporų suspensijom padidino gausiažiedės svidrės šaknų endofitų gausumą.



3.22 pav. Endofitinių grybų struktūrų dažnis *L. multiflorum* šaknyse praėjus 7 dienoms po inokuliacijos. Varianto $N = 50$.

Fig. 3.22. Frequency of endophytic fungal structures in *L. multiflorum* roots 7 days after inoculation. Variant $N = 50$.

Endofitinių grybų inokuliacijos poveikio įvertinimui buvo inokuliuotos *L. multiflorum* sėklos, iš kurių gauti augalai 63 dienas buvo auginami šiltnamyje, cilindrinėse elementų sistemoje, pripildytoje sterilaus durpių ir kompostinio substrato mišinio (3.23 A–D pav.).

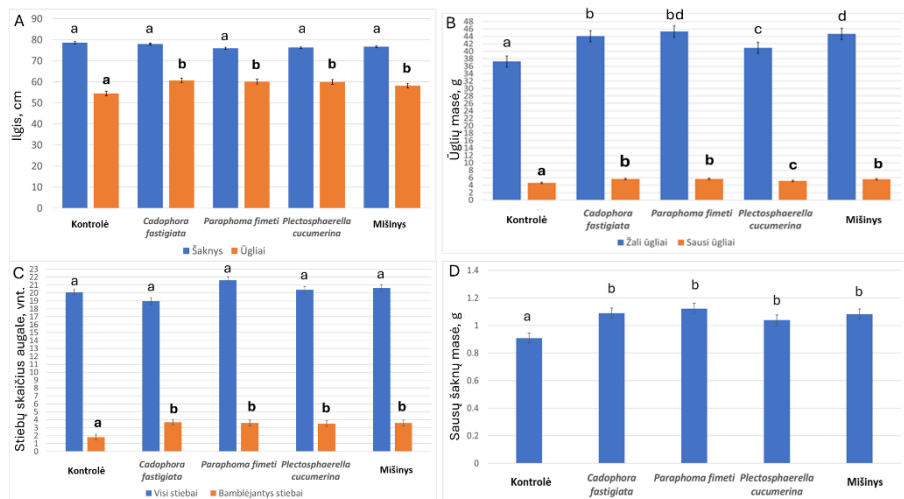


3.23 pav. *L. multiflorum* augalų, paveiktų grybų sporų suspensijomis, vaizdas po 63 dienų auginimo cilindrinėse elementų sistemoje. (A) *C. fastigiata*, *P. fimeti* ir *P. cucumerina* suspensijomis inokuliuotų ir kontrolinių augalų grupių reprezentacinis vaizdas; (B–D) *C. fastigiata* paveiktų augalų reprezentaciniai vaizdai: šaknis dirvožemyje geotekstilės maišų atidarymo momentu (B); kontrolinio augalo šaknis (C); augalo šaknis po *C. fastigiata* inokuliacijos (D).

Fig. 3.23. A view of the experimental panel of Italian ryegrass plants affected by fungal inoculations after 63 days of growth in the cylinder elements system. (A) A representative view of plants groups from *C. fastigiata*, *P. fimeti*, *P. cucumerina*, the three fungi mix inoculations and the control; (B–D) representative views of the plants from *C. fastigiata* treatment: roots in the soil at the moment of the opening of geotextile bags (B), control plant roots measured (C) next to the plant roots from *C. fastigiata* inoculation (D).

Atlikus sudėgusių sėklų skaičiavimus nustatyta, kad inokuliacija skirtingų endofitinių grybų sporų suspensijomis ir jų mišiniu padidino *L. multiflorum* sėklų daigumą nuo 78 % iki 82 % visose inokuliuotų augalų grupėse, o kontrolinėje grupėje sėklų daigumas siekė 68 %. Atlikti matavimai

parodė, kad sėklų inokuliacija didino gausiažiedės svidrės ūglių aukštį ~10 % visose augalų grupėse, o šaknų ilgiui reikšmingos įtakos neturėjo (3.24 A pav.). Atlikus ūglių skaičiavimus nustatyta, kad inokuliacija neturėjo reikšmingos įtakos bendram stiebų skaičiui skirtinguose inokuliacijos variantuose (3.24 C pav.), tačiau turėjo reikšmingą įtaką bamlėjančių ūglių skaičiaus padidėjimui visose inokuliuotų augalų grupėse. Šie rezultatai rodo, kad inokuliuoti augalai sparčiau vystėsi ir greičiau perėjo iš vegetatyvinio augimo į žydėjimo stadiją.



3.24 pav. *L. multiflorum*, paveiktų grybų sporų suspensijom po 63 dienų augimo cilindrinėse elementų sistemoje, augimo parametrai. (A) ūglių aukštis ir šaknų ilgis; (B) ūglių žalia ir sausa biomasė; (C) ūglių skaičius; (D) sausų šaknų biomasė. Skirtingos raidės (a, b, c ir d) virš juostų rodo reikšmingus veikimo skirtumus ($p \leq 0,05$), remiantis post-hoc Tukey (HSD) testu. (A) įprastas šriftas reiškia šaknies ilgį, paryškintas – ūglių aukštį; (B) įprastas – žalių ūglių svoris, paryškintas – sausų ūglių svoris; (C) įprastas – bendras stiebų skaičius, paryškintas – bamlėjančių stiebų skaičius. Varianto $N = 30$.

Fig. 3.24. *L. multiflorum* growth parameters affected by fungal inoculations after 63 days of growth in the cylinder element system. (A) Shoot height and root length; (B) shoot green and dry biomass; (C) shoot number; (D) dry root biomass. Different letters (a, b, c and d) above the bars indicate significant differences between the treatments ($p \leq 0.05$) based on Tukey's HSD post-hoc test. In (A), regular font for root length, bold – for shoot height; in (B), regular – for green shoot weight, bold – for dry shoot weight; in (C), regular – for total stem no., bold – for nodding stem no. Variant $N = 30$.

Atlikus ūglių ir šaknų svėrimus nustatyta, kad visais inokuliacijos atvejais endofitiniai grybai turėjo stiprų stimuliuojantį poveikį gausiažiedės svidrės ūglių ir šaknų biomasei. *C. fastigiata* ir *P. fimeti* padidino augalų šviežią ir sausą ūglių biomase, atitinkamai 20 % ir 26 %, o *P. cucumerina* 11 % (3.24 B pav.). Tai rodo, kad *P. cucumerina* turėjo mažiausią stimuliuojantį poveikį gausiažiedės svidrės ūglių biomasei palyginus su kitais inokuliacijos variantais.

Apibendrint gautus duomenis galima teigti, kad visi endofitinių grybų inokuliacijos variantai reikšmingai skatino *L. multiflorum* šaknų augimą – nustatytas 20–30 % augalų sausų šaknų svorio padidėjimas, palyginus su kontrolinės grupės augalais (3.24 D pav.). Nors inokuliacija trijų endofitinių grybų sporų mišiniu taip pat turėjo augalų augimą skatinantį poveikį, pavienių izoliatų poveikis buvo pranašesnis (3.24 A–D pav.).

Pastaba / Note: 3.4. Šaknų endofitų įvairovė *F. gigantea* ir giminingose *Festuca/Lolium* rūšyse bei *L. perenne* × *F. gigantea* hibriduose skyriaus rezultatai ir analizė yra publikuoti autorės publikacijose, kurie atspindi autorės pagrindinį indelį ir yra įtraukti į literatūros sąrašą. Publikacijos, kurios buvo naudotos 3.4.1–3.4.4 poskyrių aprašymams / In results and analysis section 3.4. "The fungal diversity of the *F. gigantea*, *Festuca/Lolium* species and *L. perenne* × *F. gigantea* hybrids roots" published in the author's articles which demonstrated the author's main contribution and mentioned in the reference list. The articles used to describe the 3.4.1-3.4.4 sections: 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, 453.; 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): 79. Publikacija, kuri buvo naudota 3.4.5. poskyriui aprašyti / The published article used to describe 3.4.5. section: Pašakinskienė, I., Stakelienė, V., Matijošiūtė, S., Martūnas, J., Rimkevičius, M., Būdienė, J., Aučina, A., & Skridaila, A. (2024). Growth-Promoting Effects of Grass Root-Derived Fungi *Cadophora fastigiata*, *Paraphoma fimeti* and *Plectosphaerella cucumerina* on Spring Barley (*Hordeum vulgare*) and Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum*). *Microorganisms*, 13, 25.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

4.1 *Festuca gigantea* alopoliploidinės kilmės tyrimas GISH metodu: galimi ryšiai su diploidinėmis *Lolium* ir *Festuca* rūšimis

Tyrimai rodo, kad *Festuca* ir *Lolium* rūšys yra glaudžiai susijusios, todėl gali tarpusavyje kryžmintis, taip sukurdamos skirtingo ploidiskumo tarpgentinius hibridus (Kosmala ir kt., 2006; Zwierzykowski ir kt., 1998). Nors šios gentys yra artimos, tačiau dėl pakankamo genominių sekų skirtingumo, taikant GISH metodą, galima atskirti tarpgentinių hibridų tėvų genomus (Kopecký ir kt., 2008; Kosmala ir kt., 2006; Zwierzykowski ir kt., 1998). Naudojant GISH metodą jau yra nustatyti *Festulolium* hibridų (Kopecký ir kt., 2006; 2008; Morgan ir kt., 1988) ir gamtinio heksaploido *F. arundinacea* (Kopecký ir kt., 2010; Pašakinskienė ir kt., 1997, 1998) genomų komponentai, tačiau žinios apie kito gamtinio aloheksaploido *F. gigantea* genominę sudėtį iki šiol yra labai ribotos. Hand su kolegomis (2010) atlikti rDNR ITS sričių sekų tyrimai rodo glaudų evoliucinį ryšį tarp diploidų *Lolium perenne*, *L. multiflorum*, *L. temulentum* ir *F. pratensis* bei heksaploido *F. gigantea*, kurie priklauso *Schedonorus* grupei.

Chromosomų diferencinis dažymas leido atskirti *F. gigantea* genocho chromosomų rinkinius ir jo genocho atskirus sudėtinius komponentus, kilusius iš diploidinių *Lolium* ir *Festuca* rūšių. Mūsų tyrimas parodė, kad didžiojo eraičino genomą yra sudėtimis, 2/3 sudaryta iš diploidinių *L. perenne*, *L. multiflorum* arba *L. temulentum* ir *F. pratensis* subgenomų, kurie yra tam tikri naujadarai. Pirmiausia įrodėme jų giminingumą kryžmindami diploidines *Lolium* rūšis (motininis augalas) su *F. gigantea* (tėvinis augalas), tokiu būdu sukurdami tetraploidinius *Lolium* spp. × *F. gigantea* hibridus. Todėl neabejojame, kad šios rūšys yra tarpusavyje suderinamos ir yra giminingos, nes sukurti hibridai buvo gyvybingi. Tokių bandymų, įrodančių *Lolium* ir *Festuca* rūšių giminingumą ir gebėjimą lengvai kryžmintis, buvo atlikta nemažai. Jie yra pateikti Zwierzykowski apžvalgoje (1996).

GISH analizės metu naudojant skirtingus diploidinių *L. perenne*, *L. multiflorum*, *L. temulentum* ir *F. pratensis* bendros gDNR zondus pasiženklino 28 chromosomų rinkinys, iš 42 *F. gigantea* chromosomų. Chromosomos turėjo intensyvių ir vidutinį tolygų hibridizacijos signalą. Jos buvo lengvai atskiriamos nuo kitų 14 chromosomų, neturinčių hibridizacijos signalo. Taigi, viena iš trijų *Lolium* rūšių (labiau tikėtina, kad *L. multiflorum*) ir *F. pratensis* dalyvavo didžiojo eraičino genocho susidaryme. Mūsų sukurtuose *L. perenne* × *F. gigantea* F1 kartos hibriduose nebuvo pastebėta

Lolium ir *Festuca* genomų maišymosi (rekombinacijos). Visose chromosomose gDNR signalas buvo tolygus, o didžiojo eraičino genomas, kaip ir tikėtasi, dominavo ir sudarė $\frac{3}{4}$ hibridų genomo. Tuo pačiu hibridai morfologiniais požymiais buvo artimesni *F. gigantea* tėviniai rūšiai. Tačiau Zwierzykowski su kolegomis (2006) atlikti tyrimai rodo, kad *Festulolium* hibriduose su kiekviena karta *Lolium* genomas vis labiau dominuoja (daugėjo iš svidrės paveldėtų chromosomų), o eraičino genomas buvo išstumiamas (chromosomų mažėjo). Be to, daugėjo rekombinantinių chromosomų ir chromosomų trūkio taškų, kurios dažniau pasitaikydavo iš eraičino paveldėtose chromosomose (Zwierzykowski ir kt., 2006). Panašias tendencijas lietuviškose *Festulolium* hibriduose atskleidė ir Pašakinskienė su Jones (2003), o lenkiškose Zwierzykowski su kolegomis (1991, 1998).

Pakartotinė didžiojo eraičino metafazinių plokštelių hibridizacija panaudojus *L. perenne*, *L. multiflorum* ir *F. pratensis* bendros gDNR zondus parodė, kad *F. pratensis* gDNR zondas hibridizuojasi tose pačiose 28 *F. gigantea* chromosomose, kur ir *L. perenne* bei *L. multiflorum* gDNR zondai. Tai parodo, kad 28 chromosomų rinkinys yra tam tikras *F. gigantea* chromosomų naujadaras, sudarytas iš *L. perenne*, *L. multiflorum*, *L. temulentum* ir *F. pratensis* subgenomų. Humphreys su kolegomis (1995) atlikti tyrimai analizuojant nendrinio eraičino (*F. arundinacea*) genomo komponentus atskleidė, jog šio gamtinio aloheksaploidinio hibrido ($2n = 6x = 42$) genomo susidaryme sudalyvavo *F. glaucescens* ir *F. pratensis*. *F. glaucescens* sudarė $\frac{2}{3}$, o *F. pratensis* $\frac{1}{3}$ nendrinio eraičino genomo dalį. Vėliau Pašakinskienė su bendraautoriais (1997) įrodė, kad nendrinio eraičino genomo susidaryme sudalyvavo ir *L. multiflorum*, kurios genomine DNR kryžmiškai hibridizavosi ir ženklino 14 chromosomų paveldėtų iš *F. pratensis*. Taigi, didžiojo eraičino protėvinių rūšių, *Lolium* spp. ir *F. pratensis*, genomų homologijos laipsnis yra pakankamai aukštas, o tai rodo, kad jos yra glaudžiai susijusios ir evoliuciškai artimos, o evoliuciniu aspektu rūšių išsiskyrimas įvyko ne taip seniai.

Apibendrinant gautus GISH rezultatus nustatyta, kad *F. gigantea* yra kilęs iš *Lolium* protėvinės rūšies (*L. perenne*, *L. multiflorum* arba *L. temulentum*), kuri kartu su *F. pratensis* sudaro $\frac{2}{3}$ jo genomo (28 chromosomos iš 42). Tai įrodo aloploidinę didžiojo eraičino kilmę, tačiau šie rezultatai tik iš dalies užpildo jo genomo sudėties žinių spragą, todėl reikalingi tolimesni tyrimai, kurie padėtų atskleisti dar vieną jo genomo sudėties komponentą. Manome, kad ši tėvinė rūšis, sudalyvavusi didžiojo eraičino kilmėje, turėtų augti tose pačiose miško augavietėse kaip ir *F. gigantea* bei būti morfologiniais požymiais artima didžiajam eraičinui.

4.2. Specifinių chromosominių sekų pasiskirstymo ypatumai *F. gigantea*, giminingose diploidinėse rūšyse ir *L. perenne* × *F. gigantea* hibriduose

Specifinės chromosomų sritys tokios kaip centromera, telomera, 5S ir 45S rDNR yra sudarytos iš TRs (Garcia ir kt., 2012; Luo ir kt., 2022; Nagaki ir kt., 2015; Peska ir Garcia, 2020; Zwyrtková ir kt., 2020), kurie yra svarbūs chromosomų molekulinės struktūros elementai ir svarbūs ląstelei dalijantis. Žinoma, kad augalams yra būdingi 45S rDNR lokusai, kurie dar kitaip vadinami antrinėmis sąsmaukomis arba branduolėlio organizaciniais regionais (angl. *nucleolar organizing regions*). Šie regionai yra trapūs, nes per susiaurėjimus dažnai įvyksta chromosomų trūkiai (Huang ir kt., 2012; Pikaard, 1999). Taigi, per šias vietas gali įvykti chromosomų rekombinacija ir susidaryti nauji deriniai, ko pasekoje didėja populiacijos įvairovė. Šie trapūs 45S rDNR regionai, pritaikant FISH metodą, dideliu dažniu buvo stebimi diploidinėse ir poliploidinėse *L. multiflorum* ir *L. perenne* mitozinėse chromosomose (Bustamante ir kt., 2014; Huang ir kt., 2009), todėl buvo stebima daugiau negu viena 45S rDNR vieta chromosomoje (Bustamante ir kt., 2014), o 5S rDNR sritis buvo nekintanti. Mūsų tyrime stebėtas stabilus 45S rDNR lokusų skaičius *F. gigantea* chromosomose, kuris sutapo su Thomas su bendraautoriais (1996, 1997) atliktais tyrimais, kuriuose jie nagrinėjo *L. perenne* ir *F. gigantea* 5S ir 45S rDNR lokusų skaičių ir jų lokalizaciją chromosomose. Panaši tendencija buvo nustatyta mūsų sukurtų tarpgentinių *L. perenne* × *F. gigantea* hibridų metafazinėse chromosomose ir interfaziniuose branduoliuose, kuomet panaudoję 5S ir 45S rDNR zondus, nustatėme, kad hibridai paveldėjo pusę rDNR sričių iš daugiametės svidrės, o kitą dalį iš didžiojo eraičino. Šių sričių skaičius nekito, o vieta chromosomoje buvo konservatyvi. Taigi, visi hibridų rDNR lokusai buvo vienodai perduoti iš tėvų hibridams.

Kita svarbi augalų chromosomų sritis yra centromera. Ląstelės dalijimosi metu ji yra ypač svarbi taisyklingam chromosomų pasiskirstymui anafazėje (Jannink ir kt., 1996; Pouokam ir kt., 2019). Mūsų analizė parodė, kad alopoliploidiniuose *F. gigantea* ir *L. perenne* × *F. gigantea* augaluose, centromerinių zondų signalų skaičius *F. gigantea* mitozinėse chromosomose buvo stabilus, o hibriduose kito nuo 21 iki 28, priklausomai nuo naudoto centromerinio RT zondo. Interfaziniuose branduoliuose centromerinių zondų hibridizacijos signalai grupavosi, todėl buvo stebimas mažesnis centromerinių signalų skaičius. *Lolium* ir *F. pratensis* rūšių mitozinėse chromosomose RT zondų hibridizacija buvo stebima visų chromosomų centromerinėse srityse, o interfaziniuose branduoliuose signalai kartais telkdavosi į grupes. Atlikti

tyrimai rodo, kad chromosomos interfaziniuose branduoliuose erdviškai išsidėsto skirtingomis teritorijomis, todėl išvengiama DNR molekulių persipynimo (Pouokam ir kt., 2019); tai parodo mažesnis centromerų signalų skaičius.

Ankstesniuose tyrimuose nustatyta, kad chromosomų pečiuose esantis pericentromerinis heterochromatinas apriboja genomą ir padeda išlaikyti chromosomų teritoriškumą ir stabilumą (Mizuguchi ir kt., 2015), o centromeroms būdingos palydovinės DNR sekos (angl. *satellite DNA*) (Jiang ir kt., 2003) užtikrina kompaktišką chromatino struktūrą (Neumann ir kt., 2011). Palydovinės sekos yra susijusios su heterochromatinu, kuris yra pericentromerinėse chromosomų dalyse (Ambrožová ir kt., 2011), o retrotranspozonai dažnai lokalizuojasi kartu su palydovinėmis sekomis (Neumann ir kt., 2011). Taip pat augalai paprastai turi Ty3/gypsy kilmės retrotranspozonus (Ambrožová ir kt., 2011; Neumann ir kt., 2011). Mūsų eksperimente buvo naudota Fesreba seka, kuri priklauso Ty3/gypsy kilmės retrotranspozonui, todėl *Festuca* ir *Lolium* rūšyse RT zondai hibridizavosi centromerinėse ir pericentromerinėse srityse. Rezultatas patvirtina, kad *Festuca* ir *Lolium* rūšims centromeriniuose regionuose būdingos Ty3/gypsy kilmės retrotranspozonų sekos.

Atliekant Fesreba sekos (*L. perenne* ir *L. multiflorum* RT zondai) ir *L. perenne* bendros gDNR zondo hibridizaciją mūsų sukurtų *L. perenne* × *F. gigantea* F1 hibridų metafazinėse plokštelėse, panaudojus zondų derinius, buvo gautas neįprastas įdomus rezultatas. Pirminės hibridizacijos metu, naudojant Fesreba RT zondą, 7 chromosomose buvo stebimas Fesreba hibridizacijos signalas pasklidęs per visą chromosomų ilgį, o tuo pačiu įprastas lokalus centromerinis signalas kitose 21 chromosomose. Atlikus pakartotinę hibridizaciją su *L. perenne* DNR nustatyta, kad Fesreba seka yra išplitusi septyniose hibrido chromosomose, paveldėtose iš *L. perenne* tėvinės rūšies. Zwyrtková su bendraautoriais (2020) tyrime nebuvo stebimas Fesreba sekos pasklidimas konkrečiose tetraploidinių *Lolium* ir *Festuca* rūšių chromosomose. Tikėtina, tai susiję su įvykusi genomo persitvarkymu mūsų F1 *L. perenne* × *F. gigantea* hibriduose, kuomet centromerinė Fesreba RT seka pasklido per visą hibriduose esantį daugiametės svidrės genomą (septynias chromosomas).

Stebint centromerų ir telomerų išsidėstymą interfaziniuose branduoliuose nustatėme, kad svidrėms ir eraičiams bei jų hibridams yra būdinga klasikinė Rablo konfigūracija, kuomet interfaziniuose branduoliuose centromeros ir telomeros išsidėsto priešingose branduolio pusėse. Tiang su kolegomis (2012) apžvalgoje teigiama, kad ši konfigūracija yra anafazės liekana. Toks

centromerų ir telomerų išsidėstymas yra būdingas daugeliui augalų, turintiems didesnę genomo dydį. Klasikinė Rablo konfigūracija yra nustatyta žemės ūkiui svarbių augalų mitozinėse ląstelėse: kviečiuose (Dong ir Jiang, 1998; Shaw ir kt., 2002), rugiuose, miežiuose, avižose (Dong ir Jiang, 1998), pupose, žirniuose (Rawlins ir kt., 1991) ir kituose augaluose. Nustatyta, kad sorgų centromeros ir telomerai maišosi interfazinio branduolio srityje ir jiems nėra būdinga Rablo konfigūracija, o kukurūzai turi tarpinę konfigūraciją (tarp Rablo ir ne Rablo). Įdomi tendencija buvo stebima ryžiuose, kuomet Rablo konfigūracija buvo matoma tik ksilemos ląstelėse po įvykusios DNR replikacijos ląstelei nesidalijant (endoreduplikacija) (Dong ir Jiang, 1998; Santos ir Shaw, 2004). Mūsų duomenimis, ši konfigūracija, *Lolium* ir *Festuca* rūšių somatinėse ląstelėse kitų autorių iki šiol nebuvo aprašyta.

Augalų chromosomų galuose esančios telomeros yra svarbus chromosomos struktūros elementas, o panaudojus FISH techniką galima nustatyti įvairius struktūros persitvarkymus, įvykusius evoliucijos eigoje alopoliploidinėse rūšyse. Panaudoję *Arabidopsis* tipo telomerinės sekos zondą *F. pratensis*, *L. perenne*, *L. multiflorum* ir *L. temulentum*, mes nustatėme, kad šios telomerinės sekos yra visų chromosomų galuose. Majka su kolegomis (2018) taip pat nustatė, kad *Arabidopsis* tipo telomerinė seka yra būdinga *Lolium* ir *Festuca* augalų chromosomoms. Mūsų analizė atskleidė, kad alopoliploidams *F. gigantea* ir *L. perenne* × *F. gigantea* hibriduose telomerinės sekos yra būdingos ne tik įprastose chromosomų vietose (jų galuose), bet ir vidinėje chromosomų pečių dalyje (intersticiniai telomeriniai pasikartojimai, ITR), kurias nustatė ir Majka su bendraautoriais (2018) *F. pratensis* × *L. perenne* F2–F9 hibriduose. Jie nagrinėjo sąsają tarp ITR regionų ir įvykusių genominių persitvarkymų šių hibridų metafazinėse chromosomose. Taigi, gamtiniame hibride *F. gigantea* ir mūsų sukurtuose *L. perenne* × *F. gigantea* hibriduose ITR taip pat gali prisidėti prie genomo nestabilumo ir turėti įtakos kariotipo persitvarkymui. Tikėtina, kad alopoliploiduose ITR sekos atsiranda dėl DNR grandinės trūkių reparacijos, kai kryžminant skirtingas rūšis įvyksta homeologinių chromosomų rekombinacija per chromosomų galų susijungimą arba dėl inversijų ir translokacijų (Majka ir kt., 2018; Maravilla ir kt., 2021). Mūsų žiniomis, iki šiol ITR sekos nebuvo identifikuotos *F. gigantea* kitų autorių.

Apibendrinant, *L. perenne* × *F. gigantea* hibridų chromosomose yra po penkias 5S ir 45S rDNR sritis, iš jų keturios 5S ir dvi 45S iš didžiojo eraičino, viena 5S ir trys 45S rDNR iš daugiametės svidrės. Taigi šiuose hibriduose jų skaičius yra stabilus. Taip pat telomerinių sekų analizė parodė, kad mūsų tirtoms alopoliploidinėms rūšims yra būdingos ITR sritys. Nustatyta, kad

F. gigantea ir jo tėvinėms rūšims bei *L. perenne* × *F. gigantea* hibridams yra būdinga Rablo konfigūracija. Alopoliploidinių rūšių genomo persitvarkymams tirti yra svarbūs chromosomų struktūriniai elementai: intersticiniai regionai, kurie yra judresni už centromeras (Tiang ir kt., 2012), ir 45S rDNR sritis, kuriai būdingas didesnis rekombinacijos dažnis dėl jos trapumo (Huang ir kt., 2012; Lideikytė ir kt., 2006; Pikaard, 1999). Šių chromosomų struktūrinių elementų dinamika interfaziniuose branduoliuose nėra visiškai išaiškinta. Reikalingi detalesni tyrimai, kurie padėtų suprasti specifinių DNR sekų pokyčius tetraploidiniuose *Festulolium* hibriduose po įvykusių genomo persitvarkymų kryžminant *Lolium* spp. ir *F. gigantea*.

Pastaba / Note: *F. gigantea* alopoliploidinės kilmės tyrimų ir specifinių chromosominių sekų pasiskirstymo ypatumų diskusijos dalių plėtojimui buvo naudota autorės publikacija, kuri atspindi autorės pagrindinį indelį. Publikacija yra įtraukta į literatūros sąrašą. Autorės publikacija / The part of discussion Investigation of the allopolyploid origin of *F. gigantea* and Features of the distribution of specific chromosomal sequences taken from author's article which demonstrated the author's main contribution and mentioned in the reference list: Stakelienė, V., & Pašakinskienė, I. (2022). Fluorescent *in situ* hybridisation in plants: new ways to link DNA sequence resources and chromosome loci – a review. *Zemdirbyste-Agriculture*, 109: 171–178.

4.3. Endofitų rūšinė įvairovė ir jų pasiskirstymas *F. gigantea* ir jam artimų rūšių šaknyse

Daugelis tyrimų rodo, kad žolių šaknys yra endofitinių grybų buveinės (Addy ir kt., 2005; Hardoim ir kt., 2015; Knapp ir kt., 2019; Mandyam ir kt., 2010; Porras-Alfaro ir kt., 2008; Wearn ir kt., 2012), o jų esminis vaidmuo yra teigiamai veikti augalų šeimininkų augimą ir išlikimą (Mandyam ir kt., 2010; Porras-Alfaro ir kt., 2008). Tyrimai rodo, kad *Acremonium* ir *Epichloë/Neotyphodium* endofitiniai grybai yra paplitę *Festuca* ir *Lolium* rūšių sėklose ir lapuose (Christensen ir kt., 1993; Leuchtmann, 1994; Schardl, 2009; White ir kt., 1985). Tuo tarpu duomenys apie *F. gigantea* šaknų endofitus apsiriboja trumpu pranešimu, kuriame mikroskopiškai buvo vertinamos grybinių hifų struktūros, tačiau rūšių aprašymai nebuvo nurodyti (Popkova ir Blagoveshchenskaya, 2019). Taip pat, iš mūsų ištirtų rūšių, *F. arundinacea* išlieka vienintele rūšimi iš kurios šaknų buvo izoliuotos ir taksonomiškai identifikuotos endofitinės bakterijos (de los Santos ir kt., 2016).

Šiame tyrime išskyrėme 21 grybų rūšį (60 izoliatų), daugiausia iš Ascomycota skyriaus – 18 rūšių. Tuo tarpu dvi Basidiomycota rūšys –

Coprinellus disseminatus ir *Sistotrema brinkmannii* – išskirtinai izoliuotos tik iš didžiojo eraičino šaknų. Dar viena grybų rūšis, kuri izoliuota iš *L. multiflorum*, taksonomiškai buvo priskirta Mucoromycota skyriui. Šie duomenys sutampa su ankstesnių tyrimų duomenimis, rodančiais Ascomycota atstovų dominavimą tarp grybinių endofitų, kurie įprastai yra augalų šaknų simbiotai ir saprofitai (Przemieniecki ir kt., 2019; Rashmi ir kt., 2019; Sánchez Márquez ir kt., 2007; Toju ir kt., 2013, 2019), bei sudaro apie 90 % bendrijos, o Basidiomycota sudaro nedidelį komponentą (Rashmi ir kt., 2019; Sánchez Márquez ir kt., 2007; Toju ir kt., 2013, 2019). Tuo tarpu iš *F. gigantea* šaknų ši proporcija buvo skirtinga – 1/3 sudarė Basidiomycota rūšys, atitinkami 2 iš 6 nustatytų. Tai galima paaiškinti tuo, kad *F. gigantea* auga miško buveinėse, kuriose yra tikėtina aptikti Basidiomycota atstovų.

Mūsų tyrime *C. disseminatus* (Agaricales) izoliavimas iš *F. gigantea* šaknų buvo gana netikėtas, nes *C. disseminatus* paprastai nėra aptinkamas kaip endofitas, nors jis buvo rastas atogrąžų miškų paklotėje formuojantis mikorizines struktūras, tokiu būdu palengvindamas orchidėjų daigumą ir daigų formavimąsi (Gao ir kt., 2022a; Yagame ir kt., 2018). Žoliniuose augaluose šis endofitas buvo izoliuotas iš *Phleum pratense* (Przemieniecki ir kt., 2019) ir *Holcus lanatus* lapų (Sánchez Márquez ir kt., 2010) bei iš stiebų ir kitų atogrąžų medžių dalių (de Errasti ir kt., 2010; Martin ir kt., 2015).

Sistotrema brinkmannii (Cantharellales) taip pat nėra tipiškas žolinių augalų endofitas – tai medieną pūdantis grybas, plačiai paplitęs ant medžių žievės, taip pat aptinkamas dirvožemyje (Hallenberg, 1991; Potvin ir kt., 2012). Jis buvo išskirtas iš sunykusių *Pinus sylvestris* šaknų (Menkis ir kt., 2006), *P. contorta* medienos (Son ir kt., 2011), taip pat rastas *Ipomea* sveikuose lapuose (Steiner ir kt., 2006). Atsižvelgiant į platų *C. disseminatus* ir *S. brinkmannii* paplitimą (Hallenberg, 1991), atrodo, kad šių endofitų buvimas miško žolinio augalo šaknyse yra visiškai įmanomas.

Cordyceps fumosorosea buvo izoliuotas tik iš vienmetės *L. temulentum* piktžolės šaknų (5 izoliatai). Nors įprastai *Cordyceps* rūšys žinomos kaip parazitai, gyvenantys vabzdžių lervose (Lei ir kt., 2021; Nikoh ir Fukatsu, 2000), kai kurios rūšys buvo išskirtos ir iš augalų audinių (Vega, 2018). Pažymėtina, kad horizontalus endofitinių grybų perdavimas tarp vabzdžių ir augalų yra gerai žinomas reiškinys (Raman ir Suryanarayanan, 2017). Atsižvelgiant į tai, kad *L. temulentum* auga įvairiose pažeistose ekologinėse nišose, kuriose gausu organinio pūdinio, kuris pritraukia daugybę vabzdžių ir jų lervų, *C. fumosorosea* buvimas šiose nišose atrodo labai įmanomas. Yra žinoma, kad augalų endofitai gali būti perduodami vertikaliai (tiesiogiai iš tėvų per sėklas) arba horizontaliai (iš supančios aplinkos) (Baron ir Rigobelo,

2022; Bastías ir kt., 2022; War ir kt., 2023). Norint suprasti *Festuca* ir *Lolium* rūšių šaknų endofitų kilmę, reikia atlikti išsamius tyrimus.

Labiausiai paplitęs šaknies endofitinis grybas buvo *Microdochium bolleyi*, rastas penkiose iš septynių augalų rūšių, IF = 20 %. Šis endofitas dažnai aptinkamas Poaceae šeimos augalų šaknyse (Gao ir kt., 2022b; Sánchez Márquez ir kt., 2010), o Hong su kolegomis (2008) nustatė, kad *M. bolleyi* sukelia *Agrostis stolonifera* šaknų puvinį. Kitas plačiai aptiktas grybas buvo *Alternaria alternata* (IF = 15 %), kurio gausumu ypač pasižymėjo *L. multiflorum* (7 izoliatai). Pereira su kolegomis (2019) *A. alternata* izoliavo iš *F. rubra* subsp. *purinose* šaknų, o *L. multiflorum* augaluose jis sukėlė lapų dėmėtligę (Wei ir kt., 2021). Tiek *M. bolleyi* (David ir kt., 2016; Gao ir kt., 2022b; Przemieniecki ir kt., 2019; Wirsal ir kt., 2001), tiek *A. alternata* (Pereira ir kt., 2019; Przemieniecki ir kt., 2019; Rashmi ir kt., 2019; Thomma, 2003) yra priskiriami generalistiniams augalų endofitams, jie yra plačiai paplitę įvairiose augalų rūšyse.

Šiame tyrime, lyginant endofitų paplitimą įvairiose augalų rūšyse, tarp daugiamečių rūšių didžiausia grybų įvairovė pasižymėjo miško žolinis augalas *F. gigantea*. Kitos rūšys, pasižymėjusios didele grybų įvairove buvo vienmetės *L. multiflorum* ir *L. temulentum*, atitinkamai 9 ir 5 taksonai. Pabrėžtina, kad šie grybų rūšių gausumo duomenys sutapo su mūsų nustatytu didžiausiu grybinių struktūrų kiekiu, stebėtu šaknies audiniuose mikroskopiškai (Tripiano mėlio dažymas). Didesnis grybų paplitimas vienmečiuose *Lolium* augaluose rodo galimą endofitų naudą šeiminiams. Tikėtina, kad gausus endofitinių grybų kiekis šaknyse teigiamai veikia maistinių medžiagų įsisavinimą, palaikant šių trumpaamžių augalų spartų augimą trumpuoju sezonu.

Priešingai, pievų *F. pratensis*, *F. arundinacea* ir *L. perenne* daugiamečių rūšių augaluose grybų įvairovė buvo mažiausia. Tai rodo, kad buveinių tipas yra svarbus formuojantis grybinių endofitų bendrijoms. Pabrėžtina, kad miško buveinės yra palankesnės įvairiems endofitiniams grybams įsikurti nei atviros pievos.

Šiame tyrime mes taip pat išskyrėme 26 bakterijų taksonus (59 izolatus), priklausančius keturiems bakterijų skyriams. Labiausiai paplitusios buvo gramteigiamos bakterijos iš Bacillota (sin. Firmicutes) grupės, 58 % išskirtų bakterijų kultūrų, priklausančių penkiolikai taksonų. Iš jų keturi taksonai buvo išskirti iš *F. gigantea* šaknų, tai *Bacillus pumilus*, *B. subtilis*, *Lysinibacillus boronitolerans* ir *Priestia megaterium*. *Bacillus* genties bakterijos buvo labiausiai paplitusios – taksonomiškai patvirtinti penki taksonai, kurie sudarė 38 % visų izoliatų, ir rasti visose *Lolium* ir *Festuca* rūšyse (išskyrus hibridus).

Bacillus bakterijos yra plačiai paplitusios natūralioje aplinkoje ir pasižymi didele šeiminių įvairove. Jos skaido organines medžiagas, skatina augalų augimą ir slopina patogeninius organizmus (Mandic-Mulec ir kt., 2015; Tsotetsi ir kt., 2022). Li su kolegomis, užkrėtę *Arabidopsis thaliana* augalus *P. megaterium* paderme, parodė šios rūšies gebėjimą skatinti augalų augimą, padidinant su gynyba susijusių genų ekspresiją ir salicilo rūgšties kaupimąsi (Li ir kt., 2022).

Kita dominuojanti grupė buvo gramneigiamos bakterijos iš *Pseudomonadota*, kurios sudarė 35 % bakterijų izoliuotų, priklausančių devyniems taksonams. Iš jų *Kosaconia cowanii* buvo izoliuotas iš *F. gigantea* ir *Lolium temulentum* šaknų. Šios grupės atstovai pasižymi įvairiomis funkcijomis, turinčiomis įtakos augalų išlikimui. Pavyzdžiui, *Stenotrophomonas maltophilia* (Xanthomonadales) yra dažnai aptinkamas žemės ūkio augaluose ir yra žinomas dėl savo augalų augimą skatinančių savybių (Alexander ir kt., 2019) bei priešgrybelinio poveikio prieš javų patogenus (Sharma ir kt., 2014). Tuo tarpu *Pseudomonas oryzae* (*Pseudomonadales*) yra dirvožemio bakterija, kuri išgyvena drėgnoje dumbloje aplinkoje, būdingoje ryžių laukams (Kodama ir kt., 1985).

Mūsų tyrime didžiausia bakterijų įvairovė nustatyta pievų *F. arundinacea* augaluose, kur rastos 9 rūšys (18 izoliatų), po to sekė *L. temulentum* su 7 rūšimis (12 izoliatų). Vienas iš veiksmų, lemiančių didesnę bakterinių, o ne grybinių endofitų, skaičių gali būti sausos dirvos savybės atvirame lauke, palyginti su drėgna pamiškio dirva, kuri yra būdinga *F. gigantea* buveinėms. Be to, tam tikros augalų rūšys gali būti ypač palankios įvairiems endofitams ir gali turėti naudos iš šios sąveikos, kuri teigiamai veikia jų augimą ir atsparumą stresui. Anksčiau Przemieniecki su kolegomis (2019) parodė augalų šeiminių specifiškumą svarbą, palygindami *Phleum pratense* ir *L. perenne* grybinių endofitų gausą lapuose. Mūsų tyrimo rezultatai, gauti iš šaknų, sutampa su Przemieniecki ir kt. (2019) rezultatais, gautais iš lapų. Jie rodo, kad *L. perenne* išsiskiria ypač maža endofitų gausa tarp žolinių augalų, naudojamų žemės ūkio pievose.

Hibridų ir tėvinių rūšių palyginime, endofitų atitikimo nebuvimas tarp *L. perenne* × *F. gigantea* hibridų ir jų tėvinių rūšių rodo, kad endofitų įsikūrimą augaluose įtakoja sudėtinga šeiminių ir mikroorganizmų sąveika, o ne paprastas genetinis paveldėjimas. Kita vertus, natūralios hibridinės kilmės rūšys *F. gigantea* ir *F. arundinacea* pasižymėjo didesne mikroorganizmų įvairove, palyginti su jų diploidiniais *F. pratensis* ir *L. perenne* giminačiais, o tai rodo galimą ryšį tarp hibridinio genomo sudėtingumo ir didesnės šaknų mikrobiotos įvairovės.

Burkholderiales eilės bakterijų atstovai ir *Chaetomium* spp. bei *Alternaria* spp. grybai yra vieni iš labiausiai paplitusių kertinių taksonų pievų, miškų ir žemės ūkio paskirties ekosistemose (Banerjee ir kt., 2018). Mes aptikome du Burkholderiales atstovus žolinių augalų šaknyse – *Achronobacter spanius* ir *Variovorax* sp. Be to, aptikome *Pedobacter alluvionis*, Sphingobacteriales atstovą didžiojo eraičio šaknyse. Sphingobacteriales taip pat yra priskiriami pagrindiniams miško ir pievų taksonams (Banerjee ir kt., 2018). Taigi, nors mūsų nustatytų endofitų įvairovė yra santykinai nedidelė, palyginti su Banerjee ir bendraautorių (2018) tyrimo duomenimis, gauti rezultatai patvirtina, kad *Festuca* ir *Lolium* rūšių šaknyse yra įsitvirtinę svarbūs kertiniai mikroorganizmų bendrijų atstovai.

Mūsų tyrimas rodo, kad *Festuca* ir *Lolium* šaknys yra daugelio šaknų endofitų, grybų ir bakterijų, buveinė, o tai užpildo *Festuca* spp. ir *Lolium* spp. tyrimų spragą. Tolesni tyrimai, susiję su *Festuca* ir *Lolium* rūšimis skirtingose buveinėse, galėtų parodyti šių žolinių augalų endofitų rinkinių skirtumus ir atskleisti skirtingus funkcinius endofitų sambūvio vaidmenis.

Pastaba / Note: Endofitų rūšinės įvairovės ir jų pasiskirstymo *F. gigantea* ir jam artimų rūšių šaknyse diskusijos dalis yra publikuota autorės publikacijose, kurios atspindi autorės pagrindinį indelį. Publikacijos yra įtrauktos į literatūros sąrašą. Autorės publikacijos / The part of discussion about the diversity of endophytic fungi in the *Festuca* and *Lolium* roots taken from author's articles which demonstrated the author's main contribution and mentioned in the reference list: 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, 453; 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): 799.

4.4. Augimą skatinantis endofitinių grybų inokuliacijos poveikis

L. multiflorum augimui

Tyrimai rodo, kad beveik visi augalai yra endofitinių grybų šeimininkai (Baron ir Rigobelo, 2022), o jų svarba augalų bendrijoms tapo akivaizdi, kuomet buvo įrodytas jų skatinamasis poveikis augalų augimui (de Santiago ir kt., 2009; Hiruma ir kt., 2016; Vergara ir kt., 2017, 2018, 2019). Deja, grybų skatinamojo poveikio *L. multiflorum* augimui tyrimų skaičius yra nedidelis. Iki šiol yra įrodytas augimą skatinantis poveikis inokuliuojant gausiažiedę svidrę *Trichoderma harzianum* (Banjac ir kt., 2021), *Xerocomus badius* ir *Serendipita indica* (Liu ir kt., 2019).

Tyrimuose inokuliuojamus augalus *Cadophora* sp. buvo parodytas augimą skatinantis poveikis *Betula pendula*, *Eucalyptus globulus*, *L. perenne* (Berthelot ir kt., 2016, 2018) ir pomidorams (Yakti ir kt., 2018). Tačiau, iki šio nebuvo tirtas *Plectosphaerella cucumerina* ir *Paraphoma fimet* inokuliacijos skatinamasis poveikis augalų augimui. Mūsų tyrimas parodė, kad *C. fastigiata*, *P. fimet* ir *P. cucumerina* inokuliatui skatina gausiažiedės svidrės šaknų ir ūglių augimą. Be to, pastebėta, kad ūglių biomasės prieaugis ir vegetacijos spartumas priklausė nuo naudojamos grybų rūšies.

Mūsų tyrimas parodė, kad *C. fastigiata* inokuliacija reikšmingai skatina gausiažiedės svidrės šaknų augimą (25 % prieaugis). Berthelot su kolegomis taip pat atskleidė, kad endofitiniai grybai, šiuo atveju *Cadophora* sp., turi stimuliuojantį poveikį *L. perenne* augimui – didina sausą šaknų svorį, tuo tarpu ūglių masės padidėjimas nebuvo statistiškai reikšmingas (Berthelot ir kt., 2016). Iki šiol atlikti tyrimai rodo, kad *C. fastigiata* yra žolinių ir sumedėjusių rūšių šaknų endofitas (Knapp ir kt., 2012). Taip pat *Cadophora* rūšys auga ant medienos, medžių šaknų bei dirvožemyje (Bien ir Damm, 2020; Gramaje ir kt., 2011; Maciá-Vicente ir kt., 2020; Sánchez Márquez ir kt., 2011; Schol-Schwarz, 1970; Travadon ir kt., 2015).

Pažymėtina, kad tiek mūsų, tiek ir kituose žolinių augalų tyrimuose buvo nustatytas didesnis teigiamas grybų inokuliacijos poveikis šaknų augimui nei ūglių. Tai patvirtina bandymas, kuriame *L. perenne* augalams patiriant sausros stresą, naudojant endofitinių bakterijų inokuliantus ir jų mišinį (izoliatai gauti iš tuopos ir gluosnio), daugiamečių svidrės šaknų augimo prieaugis pranoko ūglių biomasės padidėjimą (atitinkamai 60 % ir 48 %) (Khan ir kt., 2012).

Plectosphaerella cucumerina yra dirvožemio grybas, augalų organinių medžiagų skaidytojas, dažnas šaknų patogenas, sukeliantis šaknų puvinio infekcijas, tuo pačiu paplitęs įvairiose augalų rūšyse (Carlucci ir kt., 2012; Giraldo ir Crous, 2019; Uecker, 1993). Šis grybas sukelia patogeninį poveikį pomidorams, paprikoms, šparagams, kopūstams, bulvėms ir daugeliui moliūginių augalų (Carlucci ir kt., 2012; Uecker, 1993). Tačiau iki šiol nėra įrodymų, kad *P. cucumerina* galėtų veikti kaip patogenas Poaceae rūšims ar skatinti augalų augimą. Keletas tyrimų rodo, kad *P. cucumerina* gali veikti kaip biologinės kontrolės agentas. Pavyzdžiui, *P. cucumerina* parodė nematofaginį aktyvumą prieš bulvių cistinius nematodus (Atkins ir kt., 2002, 2003). Taip pat nustatyta, kad jis tinkamas naikinti *Cirsium arvense* piktžolės (Bailey ir kt., 2017). Mūsų tyrime, veikiant *P. cucumerina* sporų inokuliacija, nustatytas reikšmingas augimą skatinantis poveikis gausiažiedės svidrės šaknims (20 % prieaugis) ir ūgliams (10 % prieaugis). Apibendrinant galima

teigti, kad mūsų tyrimas pirmą kartą atskleidė *P. cucumerina* inokuliacijos skatinantį poveikį augalų augimui.

Ankstesni tyrimai atskleidė, kad *Paraphoma fimeti* yra dažnas dirvožemio grybas, turintis įvairų gyvenimo tipą, nuo patogeninio iki endofitinio ir esantis daugelyje augalų šeimininkų (Moslemi ir kt., 2018; Roustaee ir kt., 2000). Yra žinoma, kad kelios patogeninės *Paraphoma* rūšys *Compositae* augalams sukelia šaknų infekcijas (Moslemi ir kt., 2018). Tačiau iki šiol nebuvo patvirtintas šio grybo augalų augimą skatinamasis poveikis. Mūsų tyrime *P. fimeti* veiksmingai skatino svidrės ūglių ir šaknų augimą, atitinkamai 26 % ir 30 % sausos masės prieaugio.

Mūsų tyrimo rezultatai papildė žinias apie endofitinius grybus kaip augalų augimo biostimulius. Tai ateityje leis paspartinti grybų izoliatų atranką ir išplėsti tyrimus, siekiant skatinti kitų žemės ūkio augalų augimą.

Pastaba / Note: endofitinių grybų inokuliacijos poveikio *L. multiflorum* augimui diskusijos dalis yra publikuota autorės publikacijoje, kurioje atsispindi pagrindinis jos indelis. Ši publikacija yra įtraukta į literatūros sąrašą / the discussion section about the effects of endophytic fungi inoculation for *L. multiflorum* growth published in the article demonstrates the author's main contribution and cited in the reference list (Pašakinskienė, I., Stakelienė, V., Matijošiūtė, S., Martūnas, J., Rimkevičius, M., Būdienė, J., Aučina, A., & Skridaila, A. (2024). Growth-Promoting Effects of Grass Root-Derived Fungi *Cadophora fastigiata*, *Paraphoma fimeti* and *Plectosphaerella cucumerina* on Spring Barley (*Hordeum vulgare*) and Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum*). *Microorganisms*, 13, 25).

IŠVADOS

1. Gamtinio *Festuca gigantea* ($2n = 6x = 42$) alopoliploido 2/3 genomo sudaro *Lolium multiflorum* arba *L. perenne* rūšys; ant tų pačių 28 *F. gigantea* chromosomų dėsningai persidengia *Lolium* ir *F. pratensis* DNR zondai, taigi šios chromosomos yra sudėtiniai naujadarai. Keturiolika likusių chromosomų yra kilusios iš kitos nei *Festuca* ar *Lolium* genties, nes ant jų neaptikta tirtų rūšių DNR hibridizacija.
2. *L. perenne* $\times$ *F. gigantea* ($2n = 4x = 28$) hibridams būdingi chromosominiai persitvarkymai: centromerinės Fesreba sekos dispersinis pasklidimas po *L. perenne* chromosomas ir telomerinės sekos buvimas intersticinėse chromosomų vietose, tuo tarpu 5S ir 45S rDNR lokusų skaičius yra stabilus. Visoms tirtoms rūšims ir hibridams būdingas centromerų ir telomerų specifinis išsidėstymas interfaziniuose branduoliuose – Rablo konfigūracija.
3. *F. gigantea* ir jam giminingų *Festuca* bei *Lolium* augalų šaknis dažniausiai kolonizuoja Ascomycota skyriaus endofitiniai grybai. Basidiomycota rūšys aptiktos išskirtinai tik *F. gigantea* augalų šaknyse.
4. Miško augalui *F. gigantea* būdinga didesnė grybinių šaknų endofitų įvairovė nei pievų *Festuca* ir *Lolium* rūšims. *F. arundinacea* pasižymi didesne bakterijų įvairove nei kitos daugiametės *Lolium* ir *Festuca* rūšys.
5. Lyginat šaknų endofitinių mikroorganizmų pasiskirstymą tėvinėse *F. gigantea* ir *L. perenne* rūšyse ir jų hibriduose, buvo nustatyti skirtingi rūšių rinkiniai – tai rodo, jog gebėjimas šaknyse formuoti specifinius ryšius su tam tikrais endofitais nėra paveldima savybė.
6. Vienmetės diploidinės *Lolium* rūšys, *L. multiflorum* ir *L. temulentum*, išsiskyrė reikšmingai didesne šaknų endofitų gausa, palyginti su artimomis daugiametėmis *Lolium* ir *Festuca* rūšimis.
7. Endofitinių grybų *Cadophora fastigiata*, *Paraphoma fimeti* ir *Plectosphaerella cucumerina* inokuliacija skatino *L. multiflorum* augimą, darant didesnę poveikį šaknims nei ūgliams.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Addy, H. D., Piercey, M. M., & Currah, R. S. (2005). Microfungal endophytes in roots. *Canadian Journal of Botany*, 83: 1–13. <https://doi.org/10.1139/b04-171>
2. Adeoye, A., Odugbemi, A., & Ajewole, T. (2022). Structure and Function of Aquaporins: the Membrane Water Channel Proteins. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 12(1): 690–705. <https://doi.org/10.33263/BRIAC121.690705>
3. Albert, P. S., Zhang, T., Semrau, K., Rouillard, J.-M., Kao, Y.-H., Wang, C.-J., R, Danilova, T. V., Jiang, J., & Birchler, J. A. (2019). Whole-chromosome paints in maize reveal rearrangements, nuclear domains, and chromosomal relationships. *PNAS*, 116(5): 1679–1685. <https://doi.org/10.1073/pnas.1813957116>
4. Alexander, A., Singh, V. K., Mishra, A., & Jha, B. (2019). Plant growth promoting rhizobacterium *Stenotrophomonas maltophilia* BJ01 augments endurance against N2 starvation by modulating physiology and biochemical activities of *Arachis hypogea*. *PLoS ONE*, 14, e0222405. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222405>
5. Ali, A., Tabbasum, I., Ölmez, F., Azeem, H., Deveci, G., Khalid, B., & Mehtab, M. (2023). Bacterial Endophytes, a resilient way toward sustainable agriculture: provide plant growth promotion and biocontrol of plant pathogens. *Journal of Global Innovations in Agricultural Sciences*, 11(2): 153–174. <https://doi.org/10.22194/JGIAS/11.1046>
6. Altaf, A., Zada, A., Khan, I., Aleem, M., Hussain, S., Xu D., Quan M., Zhu X., & Zhu M. (2021). DNA methylation in plants. *Journal of Global Innovations in Agricultural Sciences*, 9(3): 109–114. <https://doi.org/10.22194/JGIAS/9.9543>
7. Ambrožová, K., Mandáková, T., Bureš, P., Neumann, P., Leitch, I. J., Koblížková, A., Macas, J., & Lysak M.A. (2011). Diverse retrotransposon families and an AT-rich satellite DNA revealed in giant genomes of *Fritillaria* lilies. *Annals of Botany*, 107(2): 255–268. <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcq235>
8. Anamthawat-Jónsson, K., Schwarzacher, T., Leitch, A. R., Bennett, M. D., & Heslop-Harrison, J. S. (1990). Discrimination between closely related *Triticeae* species using genomic DNA as a probe. *Theoretical and Applied Genetics*, 79(6): 721–728. <https://doi.org/10.1007/BF00224236>

9. Ananiev, E. V., Phillips, R. L., & Rines, H. W. (1998). Chromosome specific molecular organization of maize (*Zea mays* L.) centromeric regions. *PNAS*, 95(22): 13073–13078.
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.22.13073>
10. Ansari, H. A., Ellison, N., Stewart, A. V., & Williams, W. M. (2022). Distribution patterns of rDNA loci in the *Schedonorus-Lolium* complex (Poaceae). *Comparative Cytogenetics*, 16(1): 39–54.
<https://doi.org/10.3897/compcytogen.v16.i1.79056>
11. Arnold, A. E. (2007). Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews*, 21: 51–66. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.05.003>
12. Arnold, A. E., & Lutzoni, F. (2007). 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>
13. Atia, M. A. M., Abdeldaym, E. A., Abdelsattar, M., Ibrahim, D. S. S., Saleh, I., Elwahad, M. A., Osman, G. H., Arif, I. A., & Abdelaziz, M. E. (2020). *Piriformospora indica* promotes cucumber tolerance against Root-knot nematode by modulating photosynthesis and innate responsive genes. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(1): 279–287.
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.09.007>
14. Atkins, S. D., Clark, I. M., Sosnowska, D., Hirsch, P. R., & Kerry, B. R. (2003). Detection and quantification of *Plectosphaerella cucumerina*, a potential biological control agent of potato cyst nematodes, by using conventional PCR, real-time PCR, selective media, and baiting. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8): 4788–4793.
<https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4788-4793.2003>
15. Atkins, S. D., Clark, I. M., Sosnowska, D., & Kerry, B. R. (2002). Initial testing of potential fungal biological control agents of potato cyst nematodes. In *Proceedings Brighton Crop Protection Conference – Pests and Diseases* (pp. 79–84). Surrey: British Crop Protection Council.
<https://repository.rothamsted.ac.uk/item/88z64/initial-testing-of-potential-fungal-biological-control-agents-for-potato-cyst-nematodes>
16. Avin, F. A. (2019). *Easy way to count spores and prepare spore suspension by Hemocytometer*. Otis, L., Ed.; Floyd Nursery Research Center, Tennessee State University: McMinnville, TN, USA; Prieiga: https://www.researchgate.net/publication/337772212_Easy_way_to_count_spores_and_prepare_spore_suspension_by_Hemocytometer (žiūrėta, 2025 balandžio 3).

17. Awad, M. F., Albogami, B., Mwabvu, T., Hassan, M. M., Baazeem, A., Hassan, M. M., & Elsharkawy M. M. (2023). Identification and biodiversity patterns of *Aspergillus* species isolated from some soil invertebrates at high altitude using morphological characteristics and phylogenetic analyses. *PeerJ*, 11(1), e15035.
<http://dx.doi.org/10.7717/peerj.15035>
18. Bagdonaitė, A., Galinis, V., Jankevičienė, R., Lekavičius, A., Natkevičaitė-Ivanauskienė, M., Pipinys, J., Purvinas, E., Ribokaitė, R., Snarskis, P., Stankevičius, A., & Šarknienė, I. (1963). *Lietuvos TSR flora* (Vol. 3, pp. 246–282). Vilnius, Lithuania.
19. Bailey, K. L., Derby, J., Bourdôt, G. W., Skipp, R. A., & Hurrell, G. A. (2017). Optimising inoculum yield and shelf life of *Plectosphaerella cucumerina*, a potential bioherbicide for *Cirsium arvense*. *Biocontrol Science and Technology*, 27(12): 1416–1434.
<https://doi.org/10.1080/09583157.2017.1409337>
20. Baltruschat, H., Fodor, J., Harrach, B. D., Niemczyk, E., Barna, B., Gullner, G., Janeczko, A., Kogel, K.-H., Schäfer, P., Schwarczinger, I., Zuccaro, A., & Skoczowski, A. (2008). Salt tolerance of barley induced by the root endophyte *Piriformospora indica* is associated with a strong increase in antioxidants. *New Phytologist*, 180(2): 501–510.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02583.x>
21. Bamisile, B. S., Dash, C. K., Akutse, K. S., Keppanan, R., & Wang, L. (2018). Fungal Endophytes: Beyond Herbivore Management. *Frontiers in Microbiology*, 9: 544. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00544>
22. Banerjee, S., Schlaeppi, K., & van der Heijden, M. G. A. (2018). Keystone taxa as drivers of microbiome structure and functioning. *Nature Reviews Microbiology*, 16: 567–576. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0024-1>
23. Banjac, N., Stanisavljević, R., Dimkić, I., Velijević, N., Soković, M., & Ćirić, A. (2021). *Trichoderma harzianum* IS005-12 promotes germination, seedling growth and seedborne fungi suppression in Italian ryegrass forage. *Plant, Soil and Environment*, 67(3): 130–136.
<https://doi.org/10.17221/581/2020-PSE>
24. Baron, E. J. (1996). Classification. In S. Baron (Eds.), *Medical Microbiology* (4th ed). Galveston: The University of Texas Medical Branch at Galveston. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8406/>
25. Baron, N. C., & Rigobelo, E. C. (2022). Endophytic fungi: a tool for plant growth promotion and sustainable agriculture. *Mycology*, 13(1): 39–55.
<https://doi.org/10.1080/21501203.2021.1945699>

26. Bashir, T., Mishra, R. C., Hasan, M. M., Mohanta, T. K., & Bae, H. (2018). Effect of Hybridization on Somatic Mutations and Genomic Rearrangements in Plants. *International Journal of Molecular Science*, 9(12): 3758. <https://doi.org/10.3390/ijms19123758>
27. Bastías, D. A., Bustos, L. B., Jáuregui, R., Barrera, A., Acuña-Rodríguez, I. S., Molina-Montenegro, M. A., & Gundel, P. E. (2022). *Epichloë* Fungal Endophytes Influence Seed-Associated Bacterial Communities. *Frontiers in Microbiology*, 12, 795354. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.795354>
28. Bastías, D. A., Martínez-Ghersa, M. A., Ballaré, C. L., & Gundel, P. E. (2017). *Epichloë* Fungal Endophytes and Plant Defenses: Not Just Alkaloids. *Trends in Plant Science*, 22(11): 939–948. <http://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.08.005>
29. Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., & Kauserud, H. (2010). ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an *in silico* approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology*, 10, 189. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-189>
30. Beránková, D., Čížková, J., Majzlíková, G., Doležalová, A., Mduma, H., Brown, A., Swennen, R., & Hřibová, E. (2024). Striking variation in chromosome structure within *Musa acuminata* subspecies, diploid cultivars, and F1 diploid hybrids. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1387055. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1387055>
31. Berthelot, C., Blaudez, D., Beguiristain, T., Chalot, M., & Leyval, C. (2018). Co-inoculation of *Lolium perenne* with *Funneliformis mosseae* and the dark septate endophyte *Cadophora* sp. in a trace element-polluted soil. *Mycorrhiza*, 28: 301–314. <https://doi.org/10.1007/s00572-018-0826-z>
32. Berthelot, C., Leyval, C., Foulon, J., Chalot, M., & Blaudez, D. (2016). Plant growth promotion, metabolite production and metal tolerance of dark septate endophytes isolated from metal-polluted poplar phytomanagement sites. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(10), fiw144. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw144>
33. Bhunjun, C. S., Phukhamsakda, C., Hyde, D. K., McKenzie, E. H. C., Saxena, R. K., & Li, Q. (2024). Do all fungi have ancestors with endophytic lifestyles? *Fungal Diversity*, 125: 73–98. <https://doi.org/10.1007/s13225-023-00516-5>
34. Bien, S., & Damm, U. (2020). *Arboricolonus simplex* gen. et sp. nov. and novelties in *Cadophora*, *Minutiella* and *Proliferodiscus* from *Prunus* wood in Germany. *MycoKeys*, 63: 119–161. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.63.46836>

35. Bivilienė, A. (2010). *Lietuvoje augančių daugiamečių žolių genetinė įvairovė*. Akademija: Spaudvita.
<https://amvmt.lrv.lt/uploads/amvmt/documents/files/MGI/Leidiniai/agb/daugiameciu%20zoliu%20genetine%20ivairove/Daugiameciu%20zoliu%20genetine%20ivairove.pdf>
36. Braz, G. T., He, L., Zhao, H., Zhang, T., Semrau, K., Rouillard, J.-M., Torres, G. A., & Jiang, J. (2018). Comparative oligo-FISH mapping: an efficient and powerful methodology to reveal karyotypic and chromosomal evolution. *Genetics*, 208(2): 513–523.
<https://doi.org/10.1534/genetics.117.300344>
37. Braz, G. T., Yu, F., do Vale Martins, L., & Jiang, J. (2020). Fluorescent *In Situ* Hybridization Using Oligonucleotide-Based Probes. In B. S. Nielsen & J. Jones (Eds.), *In situ hybridization protocols* (MIMB, Vol. 2148, pp. 71–83). Nyderlands: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0623-0_4
38. Brown, S. P., Rigdon-Huss, A. R., & Jumpponen, A. (2014). Analyses of ITS and LSU gene regions provide congruent results on fungal community responses. *Fungal Ecology*, 9: 65–68.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.funeco.2014.02.002>
39. Bulińska-Radomska, Z., & Lester, R. N. (1986). Intergeneric relationships of *Lolium*, *Festuca*, and *Vulpia* (Poaceae) and their phylogeny. *Plant Systematics and Evolution*, 159: 217–227.
40. Burgdolf, R. J., Laing, M. D., Morris, C. D., & Jamal-Ally, S. F. (2014). A procedure to evaluate the efficiency of surface sterilization methods in culture-independent fungal endophyte studies. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(3): 977–983. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000300030>
41. Bustamante, F. O., Rocha, L. C., Torres, G. A., Davide, L. C., Mittelman, A., & Techio, V. H. (2014). Distribution of rDNA in diploid and polyploid *Lolium multiflorum* Lam. and fragile sites in 45S rDNA regions. *Crop Science*, 54: 617–625. doi: 10.2135/cropsci2013.05.0325
42. Cabeen, M. T.; Jacobs-Wagner, C. (2005). Bacterial cell shape. *Nature Reviews Microbiology*, 3(8): 601–610. doi:10.1038/nrmicro1205
43. Cagnano, G., Roulund, N., Jensen, C. S., Forte, F. P., Asp, T., & Leuchtmann, A. (2019). Large Scale Screening of *Epichloë* Endophytes Infecting *Schedonorus pratensis* and Other Forage Grasses Reveals a Relation Between Microsatellite-Based Haplotypes and Loline Alkaloid Levels. *Frontiers in Plant Science*, 10, 765.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00765>

44. Canter, P. H., Pašakinskienė, I., Jones, R. N., & Humphreys, M. W. (1999). Chromosome substitutions and recombination in the amphiploid *Lolium perenne* × *Festuca pratensis* cv Prior (2n = 4x = 28). *Theoretical and Applied Genetics*, 98: 809–814.
<https://doi.org/10.1007/s001220050087>
45. Card, S., Johnson, L., Teasdale, S., & Caradus, J. (2016). Deciphering endophyte behaviour: the link between endophyte biology and efficacious biological control agents. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(8), fiw114.
<https://doi.org/10.1093/femsec/fiw114>
46. Carlucci, A., Raimondo, M. L., Santos, J., & Phillips, A. J. (2012). *Plectosphaerella* species associated with root and collar rots of horticultural crops in southern Italy. *Persoonia*, 28: 34–48.
<https://doi.org/10.3767/003158512X638251>
47. Carretero-Paulet, L., & de Peer, Y. V. (2020). The evolutionary conundrum of whole-genome duplication. *American Journal of Botany*, 107(8): 1101–1105. <https://doi.org/10.1002/ajb2.1520>
48. Chadha, N., Mishra, M., Rajpal, K., Bajaj, R., Choudhary, D. K., & Varma, A. (2015). An ecological role of fungal endophytes to ameliorate plants under biotic stress. *Archives of Microbiology*, 197: 869–881.
<https://doi.org/10.1007/s00203-015-1130-3>
49. Charmet, G., Ravel, C., & Balfourier, F. (1997). Phylogenetic analysis in the *Festuca-Lolium* complex using molecular markers and ITS rDNA. *Theoretical and Applied Genetics*, 94(8): 1038–1046.
<https://doi.org/10.1007/s001220050512>
50. Chaudhary, P., Agri, U., Chaudhary, A., Kumar, A., & Kumar, G. (2022). Endophytes and their potential in biotic stress management and crop production. *Frontiers in Microbiology*, 13, 933017.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.933017>
51. Chen, L., Lou, Q., Zhuang, Y., Chen, J., Zhang, X., & Wolukau, J. N. (2007). Cytological diploidization and rapid genome changes of the newly synthesized allotetraploids *Cucumis* × *hytivus*. *Planta*, 225(3): 603–614.
DOI: 10.1007/s00425-006-0381-2
52. Chen, Z. J., & Ni, Z. (2006). Mechanisms of genomic rearrangements and gene expression changes in plant polyploids. *BioEssays*, 28(3): 240–252.
<https://doi.org/10.1002/bies.20374>
53. Chester, M., Gallagher, J. P., Symonds, V. V., Cruz da Silva, A. V., Mavrodiev, E. V., Leitch, A. R., Soltis, P. S., & Soltis, D. E. (2012). Extensive chromosomal variation in a recently formed natural

- allopolyploid species, *Tragopogon miscellus* (Asteraceae). *PNAS*, 109(4): 1176–1181. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112041109>
54. Chethana, K. W. T., Jayawardena, R. S., Chen, Y.-J., Konta, S., Tibpromma, S., Phukhamsakda, C., Abeywickrama, P. D., Samarakoon, M. C., Senwana, C., Mapook, A., Tang, X., Gomdola, D., Marasinghe, D. S., Padaruth, O. D., Balasuriya, A., Xu, J., Lumyong, S., & Hyde, K. D. (2021). Appressorial interactions with host and their evolution. *Fungal Diversity*, 110: 75–107. <https://doi.org/10.1007/s13225-021-00487-5>
 55. Chorlton, K. H., Marshall, A., & Thomas, I. D. (1997). Germination requirements and dormancy in *Festuca gigantea* (L.) Vill. populations. In R. H. Ellis, M. Black, A. J. Murdoch, & T. D. Hong (Eds.), *Basic and Applied Aspects of Seed Biology: Proceedings of the Fifth International Workshop on Seeds* (pp. 279–287). Netherlands: Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-011-5716-2_31
 56. Christensen, M. J., Leuchtmann, A., Rowan, D. D., & Tapper, B. A. (1993). Taxonomy of *Acremonium* endophytes of tall fescue (*Festuca arundinacea*), meadow fescue (*F. pratensis*) and perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Mycological Research*, 97(9): 1083–1092. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80509-1](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80509-1)
 57. Cocking, E. C. (2003). Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. *Plant and Soil*, 252: 169–175. <https://doi.org/10.1023/A:1024106605806>
 58. Cohen, A. C., Travaglia, C. N., Bottini, R., & Piccoli, P. N., (2009). Participation of abscisic acid and gibberellins produced by endophytic *Azospirillum* in the alleviation of drought effects in maize. *Botany*, 87(5): 455–462. <https://doi.org/10.1139/B09-023>
 59. Costa Pinto, L. S. R., Azevedo, J. L., Pereira, J. O., Carneiro Vieira, M., & Labate, C. A. (2000). Symptomless infection of banana and maize by endophytic fungi impairs photosynthetic efficiency. *The New Phytologist*, 147(3): 609–615. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00722.x>
 60. Cox, A. V., Bennett, S. T., Parokonny, A. S., Kenton, A., Callimassia, M. A., & Bennett, M. D. (1993). Comparison of plant telomere locations using a PCR-generated synthetic probe. *Annals of Botany*, 72(3): 239–247. <https://doi.org/10.1006/anbo.1993.1104>
 61. David, A. S., Seabloom, E. W., & May, G. (2016). 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: 912–926. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0712-6>

62. De Capdeville, G., Júnior, M. T. S., Szinay, D., Diniz, L. E. C., Wijnker, E., Swennen, R., Kema, G. H. J., & De Jong, H. (2009). The potential of high-resolution BAC-FISH in banana breeding. *Euphytica*, 166(3): 431–443. <https://doi.org/10.1007/s10681-008-9830-2>
63. de Errasti, A., Carmarán, C. C., & Novas, M. V. (2010). Diversity and significance of fungal endophytes from living stems of naturalized trees from Argentina. *Fungal Diversity*, 41(1): 29–40. <https://doi.org/10.1007/s13225-009-0012-x>
64. de Oliveira Bustamante, F., do Nascimento, T. H., Montenegro, C., Dias, S., do Vale Martins, L., Braz, G. T., Benko-Iseppon, A. M., Jiang, J., Pedrosa-Harand, A., & Brasileiro-Vidal, A. C. (2021). Oligo-FISH barcode in beans: a new chromosome identification system. *Theoretical and Applied Genetics*, 134: 3675–3686. <https://doi.org/10.1007/s00122-021-03921-z>
65. de Santiago, A., Quintero, J. M., Avilés, M., & Delgado, A. (2009). Effect of *Trichoderma asperellum* strain T34 on iron nutrition in white lupin. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(12): 2453–2459. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.07.033>
66. de los Santos, M. C., Taulé, C., Mareque, C., Baracochea, M., & Battistoni, F. (2016). Identification and characterization of the part of the bacterial community associated with field-grown tall fescue (*Festuca arundinacea*) cv. SFRO Don Tomás in Uruguay. *Annals of Microbiology*, 66: 329–342. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1113-2>
67. Deutsch, Y., Gur, L., Berman Frank, I., & Ezra, D. (2021). Endophytes from algae, a potential source for new biologically active metabolites for disease management in aquaculture. *Frontiers in Marine Science*, 8, 636636. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.636636>
68. Devi, R., Kaur, T., Kour, D., Rana, K. L., Yadav, A., & Yadav, A. N. (2020). Beneficial fungal communities from different habitats and their roles in plant growth promotion and soil health. *Microbial Biosystems*, 5(1): 21–47. DOI: 10.21608/mb.2020.32802.1016
69. Dimijian, G. G. (2000). Evolving together: the biology of symbiosis, part 1. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*, 13(3): 217–226. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1317043/>
70. Ding, T., Su, B., Chen, X., Xie, S., Gu, S., Wang, Q., Huang, D., & Jiang, H. (2017). An endophytic bacterial strain isolated from *Eucommia ulmoides* inhibits southern corn leaf blight. *Frontiers in Microbiology*, 8, 903. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00903>

71. Dong, F., & Jiang, J. (1998). Non-Rabl patterns of centromere and telomere distribution in the interphase nuclei of plant cells. *Chromosome Res.*, 6: 551–558. <https://doi.org/10.1023/A:1009280425125>
72. Dye, N. A., Pincus, Z., Theriot, J. A., Shapiro, L., & Gitai, Z. (2005). Two independent spiral structures control cell shape in *Caulobacter*. *PNAS*, 102(51): 18608–18613. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507708102>
73. Dykhuizen, D. (2005). Species Numbers in Bacteria. *Proceedings. California Academy of Science*, 56(6 Suppl 1): 62–71. https://www.researchgate.net/publication/51602096_Species_Numbers_in_Bacteria
74. El-Mahdy, O. M., Mohamed, H. I., & Mogazy, A. M. (2021). Biosorption effect of *Aspergillus niger* and *Penicillium chrysosporium* for Cd- and Pb-contaminated soil and their physiological effects on *Vicia faba* L. *Environmental Science and Pollution Research*, 28: 67608–67631. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15382-4>
75. Erickson, D., & Fenster, C. B. (2006). Intraspecific hybridization and the recovery of fitness in the native legume *Chamaecrista fasciculata*. *Evolution*, 60(2): 225–233. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2006.tb01101.x>
76. Feng, S., Jacobsen, S. E., & Reik, W. (2010). Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science*, 330(6004): 622–627. doi: 10.1126/science.1190614
77. Fernández, L. S., Větrovský, T., & Baldrian, P. (2018). The concept of operational taxonomic units revisited: genomes of bacteria that are regarded as closely related are often highly dissimilar. *Folia Microbiologica*, 64: 19–23. <http://dx.doi.org/10.1007/s12223-018-0627-y>
78. Firáková, S., Šturdíková, M., & Múčková, M. (2007). Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. *Biologia, Bratislava*, 62(3): 251–257. <https://doi.org/10.2478/s11756-007-0044-1>
79. Fischer, W. M., & Palmer, J. D. (2005). Evidence from small-subunit ribosomal RNA sequences for a fungal origin of Microsporidia. *Molecular phylogenetics and evolution*, 36(3): 606–622. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2005.03.031>
80. Gallego-Bartolomé, J. (2020). DNA methylation in plants: mechanisms and tools for targeted manipulation. *New Phytologist*, 227: 38–44. <https://doi.org/10.1111/nph.16529>
81. Galperin, M. Y., Alvarez, R. V., Karamycheva, S., Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Landsman, D., & Koonin, E. V. (2025). COG database update 2024.

- Nucleic Acids Research*, 53(D1): D356–D363.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkae983>
82. Gao, Y., Peng, S., Hang, Y., Xie, G., Ji, N., & Zhang, M. (2022a). Mycorrhizal fungus *Coprinellus disseminatus* influences seed germination of the terrestrial orchid *Cremastra appendiculata* (D. Don) Makino. *Scientia Horticulturae*, 293, 110724.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110724>
 83. Gao, Y., Ren, G.-C., Wanasinghe, D., Xu, J.-C., Farias, A., & Gui, H. (2022b). Two new species and a new record of *Microdochium* from grasses in Yunnan province, South-West China. *Journal of Fungi*, 8(12): 1297.
<https://doi.org/10.3390/jof8121297>
 84. Garcia, S., Garnatje, T., & Kovarik, A. (2012). Plant rDNA database: Ribosomal DNA loci information goes online. *Chromosoma*, 121(4): 389–394. <https://doi.org/10.1007/s00412-012-0368-7>
 85. García-Latorre, C., Rodrigo, S., & Santamaría, O. (2021). Endophytes as Plant Nutrient Uptake-Promoters in Plants. In D. K. Maheshwari, & S. Dheeman (Eds.), *Endophytes: Mineral Nutrient Management* (SDEB, Vol. 3, pp. 247–265). Netherlands: Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-65447-4_11
 86. Georgieva, M., & Vassileva, V. (2023). Stress Management in Plants: Examining Provisional and Unique Dose-Dependent Responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5105.
<https://doi.org/10.3390/ijms24065105>
 87. Gerlach, W. L., & Bedbrook, J. R. (1979). Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Research*, 7(7): 1869–1885. <https://doi.org/10.1093/nar/7.7.1869>
 88. Gernand, D., Rutten, T., Pickering, R., & Houben, A. (2006). Elimination of chromosomes in *Hordeum vulgare* × *H. bulbosum* crosses at mitosis and interphase involves micronucleus formation and progressive heterochromatinization. *Cytogenetic and Genome Research*, 114(2): 169–174. <https://doi.org/10.1159/000093334>
 89. Gernand, D., Rutten, T., Varshney, A., Rubtsova, M., Prodanovic, S., Brüll, C., Kumlehn, J., Matzk, F., & Houben, A. (2005). Uniparental chromosome elimination at mitosis and interphase in wheat and pearl millet crosses involves micronucleus formation, progressive heterochromatinization, and DNA fragmentation. *The Plant Cell*, 17(9): 2431–2438. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.034249>
 90. Giraldo, A., & Crous, P. W. (2019). Inside Plectosphaerellaceae. *Studies in Mycology*, 92(1): 227–286.

<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.10.005>

91. Glombik, M., Copetti, D., Bartos, J., Stoces, S., Zwierzykowski, Z., Ruttink, T., Wendel, J. F., Duchoslav, M., Dolezel, J., Studer, B., & Kopecký, D. (2021). Reciprocal allopolyploid grasses (*Festuca* × *Lolium*) display stable patterns of genome dominance. *The Plant Journal*, 107(4): 1166–1182. <https://doi.org/10.1111/tpj.15375>
92. Gnat, S., Nowakiewicz, A., & Zięba, P. (2019). Taxonomy Of Dermatophytes – The Classification Systems May Change But The Identification Problems Remain The Same. *Advancements of Microbiology*, 58(1): 49–58. <https://doi.org/10.21307/PM-2019.58.1.049>
93. Gouda, S., Das, G., Sen, S. K., Shin, H.-S., & Patra, J. K. (2016). Endophytes: a treasure house of bioactive compounds of medicinal importance. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1538. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01538>
94. 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: 112–126. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-8723
95. Hallenberg, N. (1991). Speciation and distribution in *Corticaceae* (*Basidiomycetes*). *Plant Systematics and Evolution*, 177(1): 93–110. <https://doi.org/10.1007/BF00937830>
96. Hand, M. L., Cogan, N. O., Stewart, A. V., & Forster, J. W. (2010). Evolutionary history of tall fescue morphotypes inferred from molecular phylogenetics of the *Lolium-Festuca* species complex. *BMC Evolutionary Biology*, 10, 303. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-303>
97. Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., Döring, M., & Sessitsch, A. (2015). The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3): 293–320. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00050-14>
98. Harun, A., Liu, H., Song, S., Asghar, S., Wen, X., Fang, Z., & Chen, C. (2023). Oligonucleotide Fluorescence *In Situ* Hybridization: An Efficient Chromosome Painting Method in Plants. *Plants*, 12(15), 2816. <https://doi.org/10.3390/plants12152816>
99. Hassan, A. H., Mokhtar, M. M., El & Allali, A. (2024). Transposable elements: multifunctional players in the plant genome. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1330127. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1330127>

100. He, M.-Q., Zhao, R.-L., Liu, D.-M., Denchev, T. T., Begerow, D., Yurkov, A., Kemler, M., Millanes, A. M., Wedin, M., McTaggart, A. R., Shivas, R. G., Buyck, B., Chen, J., Vizzini, A., Papp, V., Zmitrovich, I. V., Davoodian, N., & Hyde, K. D. (2022). Species diversity of Basidiomycota. *Fungal Diversity*, 114: 281–325.
<https://doi.org/10.1007/s13225-021-00497-3>
101. Henderson, I. R., & Salt, D. E. (2017). Natural genetic variation and hybridization in plants. *Journal of Experimental Botany*, 68(20): 5415–5417. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx377>
102. Hiruma, K., Gerlach, N., Sacristán, S., Nakano, R. T., Hacquard, S., Kracher, B., Neumann, U., Ramirez, D., Bucher, M., O'Connell, R. J., & Schulze-Lefert, P. (2016). Root Endophyte *Colletotrichum tofieldiae* Confers Plant Fitness Benefits that Are Phosphate Status Dependent. *Cell*, 165(2): 464–474. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.028>
103. 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, 77–80. doi: 10.4489/MYCO.2008.36.2.077
104. Houben, A., Orford, S. J., & Timmis, J. N. (2006). *In Situ* Hybridization to Plant Tissues and Chromosomes. In I. A. Darby, T. D. Hewitson (Eds.), *In Situ Hybridization Protocols* (MIMB, Vol. 326, pp. 203–218). Nyderlands: Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59745-007-3:203>
105. Huang, J., Ma, L., Sundararajan, S., Fei, S.-z., & Li, L. (2009). Visualization by atomic force microscopy and FISH of the 45S rDNA gaps in mitotic chromosomes of *Lolium perenne*. *Protoplasma*, 236: 59–65. <https://doi.org/10.1007/s00709-009-0051-x>
106. Huang, J., Ma, L., Yang, F., Fei, S.-z., & Li, L. (2008a). 45S rDNA regions are chromosome fragile sites expressed as gaps *in vitro* on metaphase chromosomes of root-tip meristematic cells in *Lolium* spp. *PLoS ONE*, 3(5), e2167. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002167>
107. Huang, K. C., Mukhopadhyay, R., Wen, B., Gitai, Z., & Wingreen, N. S. (2008b). Cell shape and cell-wall organization in Gram-negative bacteria. *PNAS*, 105(49), 19282–19287. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805309105>
108. Huang, M., Li, H., Zhang, L., Gao, F., Wang, P., Hu, Y., Yan, S., Zhao, L., Zhang, Q., Tan, J., Liu, X., He, S., & Li, L. (2012). Plant 45S rDNA Clusters Are Fragile Sites and Their Instability Is Associated with Epigenetic Alterations. *PLoS ONE*, 7(4), e35139.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035139>

109. Huang, W.-Y., Cai, Y.-Z., Xing, J., Corke, H., & Sun, M. (2007). A Potential antioxidant resource: endophytic fungi from medicinal plants. *Economic Botany*, 61(1): 14–30. [https://doi.org/10.1663/0013-0001\(2007\)61\[14:APAREF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1663/0013-0001(2007)61[14:APAREF]2.0.CO;2)
110. Humphreys, M. W. (2003). Development of a novel grass with resistance to environmental stress and high forage quality through intergeneric hybridization between *Lolium* and *Festuca*. In T. Yamada & T. Takamizo (Eds.), Conference Proceeding (pp. 7–15). Japan: National Agriculture and Bio-oriented Research Organization.
111. Humphreys, M. W., Thomas, H. M., Morgan, W. G., Meredith, M. R., Harper, J. A., Thomas, H., Zwirzykowski, Z., & Ghesquière, M. (1995). Discriminating the ancestral progenitors of hexaploid *Festuca arundinacea* using genomic *in situ* hybridization. *Heredity*, 75: 171–174. DOI: [10.1038/hdy.1995.120](https://doi.org/10.1038/hdy.1995.120)
112. Ilyas, M., Praptiwi, Wulansari, D., Fathoni, A., & Agusta, A. (2019). An assemblages of fungal endophytes isolated from medicinal plants collected from Toba and Samosir, North Sumatra. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 308, 012070. <http://dx.doi.org/10.1088/1755-1315/308/1/012070>
113. Ivleva, N. B., Groat, J., Staub, J. M., & Stephens, M. (2016). Expression of Active Subunit of Nitrogenase via Integration into Plant Organelle Genome. *PLoS ONE*, 11(8), e0160951. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160951>
114. Iwata-Otsubo, A., Radke, B., Findley, S., Abernathy, B., Vallejos, C. E., & Jackson, S. A. (2016). Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) based karyotyping reveals rapid evolution of centromeric and subtelomeric repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris*) and relatives. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, 6(4): 1013–1022. <https://doi.org/10.1534/g3.115.024984>
115. Jacob, J., Krishnan, G. V., Thankappan, D., & Amma, D. K. B. N. S. (2020). 4 – Endophytic bacterial strains induced systemic resistance in agriculturally important crop plants. In K. Ajay, & E. K. Radhakrishnan (Eds.), *Microbial Endophytes* (pp. 75–105). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819654-0.00004-1>
116. Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9): 2761–2764. <https://doi.org/10.1128/jcm.01228-07>

117. Jannink, G., Duplantier, B., & Sikorav, J. L. (1996). Forces on Chromosomal DNA during Anaphase. *Biophysical Journal*, 71(1): 451–465. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79247-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79247-0)
118. Ji, X., Xia, Y., Zhang, H., & Cui, J.-L. (2022). The microscopic mechanism between endophytic fungi and host plants: From recognition to building stable mutually beneficial relationships. *Microbiological Research*, 261, 127056. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127056>
119. Jiang, J. (2019). Fluorescence *in situ* hybridization in plants: Recent developments and future applications. *Chromosome. Research*, 27, 153–165. DOI: 10.1007/s10577-019-09607-z
120. Jiang, J., Birchler, J. A., Parrott, W. A., & Dawe, R. K. (2003). A molecular view of plant centromeres. *Trends in Plant Science*, 8(12): 570–575. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2003.10.011>
121. Jiang, J., & Gill, B. S. (1994). New 18S·26S ribosomal RNA gene loci: Chromosomal landmarks for the evolution of polyploid wheats. *Chromosoma*, 103: 179–185. <https://doi.org/10.1007/BF00368010>
122. Jiang, S., Qian, D.-w., Yang, N.-y., Tao, J.-h., & Duan, J.-a. (2013). Biodiversity and antimicrobial Activity of endophytic fungi in *Angelica sinensis*. *Chinese Herbal Medicines*, 5(4): 264–271. [https://doi.org/10.1016/S1674-6384\(13\)60039-8](https://doi.org/10.1016/S1674-6384(13)60039-8)
123. Jurat-Fuentes, J. L., & Jackson, T. A. (2012). Chapter 8 – Bacterial Entomopathogens. In F. E. Vega, & H. K. Kaya (Eds.), *Insect Pathology (Second Edition)* (pp. 265–349). London: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384984-7.00008-7>
124. Kabas, A., Celik, I., & Uluisik, S. (2023). Transgressive segregation of morphological traits in populations derived from cross between *Solanum habrochaites* and *Solanum lycopersicum*. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 60(1): 61–66. <https://doi.org/10.20289/zfdergi.1207916>
125. Kageyama, S. A., Mandyam, K. G., & Jumpponen, A. (2008). Diversity, Function and Potential Applications of the Root Associated Endophytes. In A. Varma (Eds.), *Mycorrhiza* (pp. 29–57). Netherlands: Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-78826-3_2
126. Kandel, S. L., Firrincieli, A., Joubert, P. M., Okubara, P. A., Leston, N. D., McGeorge, K. M., Mugnozza, G. S., Harfouche, A., Kim, S.-H., & Doty, S. L. (2017a). An *in vitro* study of bio-control and plant growth promotion potential of Salicaceae endophytes. *Frontiers in Microbiology*, 8, 386. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00386>

127. Kandel, S. L., Joubert, P. M., & Doty, S. L. (2017b). Bacterial endophyte colonization and distribution within plants. *Microorganisms*, 5(4), 77. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5040077>
128. Kang, Z., Xiaowu, W., & Feng C. (2019). Plant Polyploidy: Origin, Evolution, and Its Influence on Crop Domestication. *Horticultural Plant Journal*, 5(6): 231–239. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2019.11.003>
129. Kannoja, P., Choudhary, K. K., Srivastava, A. K., & Singh, A. K. (2019). PGPR bioelicitors: induced systemic resistance (ISR) and proteomic perspective on biocontrol. In A. K. Singh, A. Kumar, & P. K. Singh (Eds.), *PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture* (pp. 67–84). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815879-1.00004-5>
130. Khairalla, A., Rosella, S., Yagi, S., Mohamd, I., & Laurain-Mattar, D. (2016). Endophytic Fungi: Occurrence, Classification, Function and Natural Products. In E. Hughes (Eds.), *Endophytic Fungi: Diversity, Characterization and Biocontrol* (pp. 1–38). Nova. <https://www.researchgate.net/publication/312198386>
131. Khan, M. A., Asaf, S., Khan, A. L., Adhikari, A., Jan R., Ali, S., Imran, M., Kim, K.-M., & Lee, I.-J. (2020). Plant growth-promoting endophytic bacteria augment growth and salinity tolerance in rice plants. *Plant biology*, 22(5): 850–862. <https://doi.org/10.1111/plb.13124>
132. Khan, Z., Guelich, G., Phan, H., Redman, R., & Doty, S. (2012). Bacterial and yeast endophytes from poplar and willow promote growth in crop plants and grasses. *International Scholarly Research Notices*, 2012(1), 890280. <https://doi.org/10.5402/2012/890280>
133. Khan, A. L., Kang, S.-M., Dhakal, K. H., Hussain, J., Adnan, M., Kim, J.-G., & Lee, I.-J. (2013). Flavonoids and amino acid regulation in *Capsicum annuum* L. by endophytic fungi under different heat stress regimes. *Scientia Horticulturae*, 155(5): 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.02.028>
134. Kiss, L. (2012). Limits of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) sequences as species barcodes for *Fungi*. *PNAS*, 109(27), E1811. <https://doi.org/10.1073/pnas.1207143109>
135. Knapp, D. G., Imrefi, I., Boldpurev, E., Csikos, S., Akhmetova, G., Berek-Nagy, P. J., Otgonsuren, B., & Kovács, G. M. (2019). Root-colonizing endophytic fungi of the dominant grass *Stipa krylovii* from a Mongolian steppe grassland. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2565. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02565>

136. Knapp, D. G., Pintye, A., & Kovács, G. M. (2012). The dark side is not fastidious – Dark septate endophytic fungi of native and invasive plants of semiarid sandy areas. *PLoS ONE*, 7(2), e32570. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032570>
137. Kodama, K., Kimura, N., & Komagata, K. (1985). Two new species of *Pseudomonas*: *P. oryzihabitans* isolated from rice paddy and clinical specimens and *P. luteola* isolated from clinical specimens. *Int J Syst Bacteriol.*, 35(4): 467–474. <https://doi.org/10.1099/00207713-35-4-467>
138. Kopecký, D., Havránková, M., Loureiro, J., Castro, S., Lukaszewski, A. J., Bartoš, J., Kopecká, J., & Doležel, J. (2010). Physical Distribution of Homoeologous Recombination in Individual Chromosomes of *Festuca pratensis* in *Lolium multiflorum*. *Cytogenetic and Genome Research*, 129(1–3): 162–172. <https://doi.org/10.1159/000313379>
139. Kopecký, D., Loureiro, J., Zwierzykowski, Z., Ghesquière, M., & Doležel, J. (2006). Genome constitution and evolution in *Lolium* × *Festuca* hybrid cultivars (*Festulolium*). *Theoretical and Applied Genetics*, 113: 731–742. <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0341-z>
140. Kopecký, D., Lukaszewski, A. J., & Doležel, J. (2008). Cytogenetics of *Festulolium* (*Festuca* × *Lolium* hybrids). *Cytogenetic and Genome Research*, 120(3–4): 370–383. <https://doi.org/10.1159/000121086>
141. Kopecký, D., Martín, A., & Smýkal, P. (2022). Interspecific hybridization and plant breeding: From historical retrospective through work of Mendel to current crops. *Czech Journal of Genetic and Plant Breeding*, 58(3): 113–126. <https://doi.org/10.17221/19/2022-CJGPB>
142. Kosmala, A., Zwierzykowska, E., & Zwierzykowski, Z. (2006). Chromosome pairing in triploid intergeneric hybrids of *Festuca pratensis* with *Lolium multiflorum*, revealed by GISH. *Journal of Applied Genetics*, 47(3): 215–220. <https://doi.org/10.1007/BF03194626>
143. Krings, M., Taylor, T. N., Hass, H., Kerp, H., Dotzler, N., & Hermesen, E. J. (2007). Fungal endophytes in a 400-million-yr-old land plant: infection pathways, spatial distribution, and host responses. *New Phytologist*, 174(3): 648–657. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02008.x>
144. Książczyk, T., Taciak, M., & Zwierzykowski, Z. (2010). Variability of ribosomal DNA sites in *Festuca pratensis*, *Lolium perenne*, and their intergeneric hybrids, revealed by FISH and GISH. *Journal of Applied Genetics*, 51(4): 449–460. <https://doi.org/10.1007/BF03208874>
145. Kumar, M., Yadav, V., Kumar, H., Sharma, R., Singh, A., Tuteja, N., & Johri, A. K. (2011). *Piriformospora indica* enhances plant growth by

- transferring phosphate. *Plant Signaling & Behavior*, 6(5): 723–725. <https://doi.org/10.4161/psb.6.5.15106>
146. Kyozuka, J. (2023). Flowering time and reproduction of plant hormones in growth regulation. *Global Journal of Plant and Soil Sciences*, 7(4): 001–002. <https://www.international scholarsjournals.com/articles/flowering-time-and-reproduction-of-plant-hormones-in-growth-regulation.pdf>
 147. Lakatošová, M., & Holečková, B. (2007). Fluorescence *in situ* hybridisation. *Biologia, Bratislava*, 62(3): 243–250. <https://doi.org/10.2478/s11756-007-0043-2>
 148. Lee, S.-I., & Kim, N.-S. (2014). Transposable Elements and Genome Size Variations in Plants. *Genomics & Informatics*, 12(3): 87–97. <https://doi.org/10.5808/GI.2014.12.3.87>
 149. Lee, Y.-I., Chang, F.-C., & Chung, M.-C. (2011). Chromosome pairing affinities in interspecific hybrids reflect phylogenetic distances among lady's slipper orchids (*Paphiopedilum*). *Annals of Botany*, 108(1): 113–121. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr114>
 150. Lechowicz, K., Pawłowicz, I., Perlikowski, D., Arasimowicz-Jelonek, M., Majka, J., Augustyniak, A., Rapacz, M., & Kosmala, A. (2020). Two *Festuca* Species – *F. arundinacea* and *F. glaucescens* – Differ in the Molecular Response to Drought, While Their Physiological Response Is Similar. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), 3174. <https://doi.org/10.3390/ijms21093174>
 151. Lei, Y., Hussain, A., Guan, Z., Wang, D., Jaleel, W., Lyu, L., & He, Y. (2021). Unraveling the Mode of Action of *Cordyceps fumosorosea*: Potential Biocontrol Agent against *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Insects*, 12(2), 179. <https://doi.org/10.3390/insects12020179>
 152. Leitch, I. J., Johnston, E., Pellicer, J., Hidalgo, O., & Bennett, M. D. (2019). Angiosperm DNA C-values database. (Release 7.1, April 2019). Royal Botanic Gardens, Kew. <https://cvalues.science.kew.org/>
 153. Leuchtmann, A. (1994). Isozyme relationships of *Acremonium* endophytes from twelve *Festuca* species. *Mycological Research*, 98(1): 25–33. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80331-6](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80331-6)
 154. Leuchtmann, A., Schmidt, D., & Bush, L. P. (2000). Different levels of protective alkaloids in grasses with stroma-forming and seed-transmitted *Epichloë/Neotyphodium* endophytes. *Journal of Chemical Ecology*, 26: 1025–1036. <https://doi.org/10.1023/A:1005489032025>

155. Leyronas, C., & Raynal, G. (2001). Presence of *Neotyphodium-like* endophytes in European grasses. *Annals of Applied Biology*, 139(1): 119–127. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2001.tb00136.x>
156. Li, Z. Y., Chen, S. Y., Zheng, X. W., & Zhu, L. H. (2000). Identification and chromosomal localization of a transcriptionally active retrotransposon of Ty3-gypsy type in rice. *Genome*, 43(2): 404–408. <https://doi.org/10.1139/g99-137>
157. Li, J.-L., Sun, X., Chen, L., & Guo, L.-D. (2016). Community structure of endophytic fungi of four mangrove species in Southern China. *Mycology*, 7(4): 180–190. <https://doi.org/10.1080/21501203.2016.1258439>
158. Li, M., Zhu, Y., Li, S., Zhang, W., Yin, C., & Lin, Y. (2022). Regulation of Phytohormones on the Growth and Development of Plant Root Hair. *Frontiers in Plant Sciences*, 13, 865302. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.865302>
159. Li, T., Hu, Y.-J., Hao, Z.-P., Li, H., & Chen, B.-D. (2013). Aquaporin genes *GintAQPF1* and *GintAQPF2* from *Glomus intraradices* contribute to plant drought tolerance. *Plant Signaling & Behavior*, 8(5), 24030. <https://doi.org/10.4161/psb.24030>
160. Li, X., Zhou, J., Xu, R.-S., Meng, M.-Y., Yu, X., & Dai, C.-C. (2018). Auxin, Cytokinin, and Ethylene Involved in Rice N Availability Improvement Caused by Endophyte *Phomopsis liquidambari*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 37: 128–143. <https://doi.org/10.1007/s00344-017-9712-8>
161. Li, Z., Xiong, K., Wen, W., Li, L., & Xu, D. (2023). Functional Endophytes Regulating Plant Secondary Metabolism: Current Status, Prospects and Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2), 1153. <https://doi.org/10.3390/ijms24021153>
162. Liao, Z., Yu, H., Duan, J., Yuan, K., Yu, C., Meng, X., Kou, L., Chen, M., Jing, Y., Liu, G., Stith, S. M., & Li, J. (2019). SLR1 inhibits MOC1 degradation to coordinate tiller number and plant height in rice. *Nature Communications*, 10, 2738. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10667-2>
163. Lideikytė, L., Pašakinskienė, I., & Østrem, L. (2006). ‘Chromosome painting’ by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) in hybrids and introgressions of *Lolium* and *Festuca* species. *Biologija*, 3: 114–117.
164. Limsuwan, S., Trip, E. N., Kouwenc, T. R. H. M., Piersma, S., Hiranrat, A., Mahabusarakam, W., Voravuthikunchai, S. P., van Dijk, J. M., & Kayser, O. (2009). Rhodomyltone: A new candidate as natural

- antibacterial drug from *Rhodomyrtus tomentosa*. *Phytomedicine*, 16(6–7): 645–651. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.01.010>
165. Liu, X., Sun, S., Wu, Y., Zhou, Y., Gu, S., Yu, H., Yi, C., Gu, M., Jiang, J., Liu, B., Zhang, T., & Gong, Z. (2020). Dual-color oligo-FISH can reveal chromosomal variations and evolution in *Oryza* species. *The Plant Journal*, 101(1): 112–121. <https://doi.org/10.1111/tpj.14522>
 166. Liu, L.-Q., & Gu, Z.-J. (2011). Genomic *in situ* hybridization identifies genome donors of *Camellia reticulata* (Theaceae). *Plant Science*, 180(3): 554–559. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.12.006>
 167. Liu, B., Liu, X., Liu, F., Ma, H., Ma, B., Zhang, W., & Peng, L. (2019). Growth improvement of *Lolium multiflorum* Lam. induced by seed inoculation with fungus suspension of *Xerocomus badius* and *Serendipita indica*. *AMB Express*, 9, 145. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0865-7>
 168. Lou, Q., Zhang, Y., He, Y., Li, J., Jis, L., Cheng, C., Guan, W., Yang, S., & Chen, J. (2014). Single-copy gene-based chromosome painting in cucumber and its application for chromosome rearrangement analysis in *Cucumis*. *The Plant Journal*, 78(1): 169–179. <https://doi.org/10.1111/tpj.12453>
 169. Luo, X., He, Z., Liu, J., Wu, H., & Gong, X. (2022). Fish mapping of telomeric and non-telomeric (Ag₃t₃)₃ reveal the chromosome numbers and chromosome rearrangements of 41 woody plants. *Genes*, 13(7), 1239. <https://doi.org/10.3390/genes13071239>
 170. Lu, H., Wei, T., Lou, H., Shu, X., & Chen, Q. (2021). A Critical Review on Communication Mechanism within Plant-Endophytic Fungi Interactions to Cope with Biotic and Abiotic Stresses. *Journal of Fungi*, 7(9), 719. <https://doi.org/10.3390/jof7090719>
 171. Lundberg, D. S., Lebeis, S. L., Paredes, S. H., Yourstone, S., Gehring, J., Malfatti, S., Tremblay, J., Engelbrektson, A., Kunin, V., del Rio, T. G., Edgar, R. C., Eickhorst, T., Ley, R. E., Hugenholtz, P., Tringe, S. G., & Dangl, J. L. (2012). Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature*, 488: 86–90. <https://doi.org/10.1038/nature11237>
 172. Ma, J., Zhao, Q., Zaman, S., Anwar, A., & Li, S. (2024). The transcriptomic analysis revealed the molecular mechanism of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) inoculation in watermelon. *Scientia Horticulturae*, 332, 113184. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2024.113184>
 173. Ma, Y., Oliveira, R. S., Nai, F., Rajkumar, M., Luo, Y., Rocha, I., & Freitas, H. (2015). The hyperaccumulator *Sedum plumbizincicola* harbors metal-resistant endophytic bacteria that improve its phytoextraction

- capacity in multi-metal contaminated soil. *Journal of Environmental Management*, 156: 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.03.024>
174. Maciá-Vicente, J. G., Jansson, H.-B., Abdullah, S. K., Descals, E., Salinas, J., & Lopez-Llorca, L. V. (2008). Fungal root endophytes from natural vegetation in Mediterranean environments with special reference to *Fusarium* spp. *FEMS Microbiology Ecology*, 64(1): 90–105. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00443.x>
 175. Maciá-Vicente, J. G., Piepenbring, M., & Koukol, O. (2020). Brassicaceous roots as an unexpected diversity hot-spot of helotialean endophytes. *IMA Fungus*, 11, 16. <https://doi.org/10.1186/s43008-020-00036-w>
 176. Majka, J., Bzdęga, K., Janiak, A., Ćwiek-Kupczyńska, H., Krajewski, P., Książczyk, T., & Zwierzykowski, Z. (2019). Cytogenetic and molecular genotyping in the allotetraploid *Festuca pratensis* × *Lolium perenne* hybrids. *BMC Genomics*, 20, 367. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5766-2>
 177. Majka, J., Majka, M., Kopecký, D., & Doležel, J. (2020). Cytogenetic insights into *Festulolium*. *Biologia Plantarum*, 64: 598–603. <https://doi.org/10.32615/bp.2020.095>
 178. Majka, J., Zwierzykowski, Z., Majka, M., & Kosmala, A. (2018). Karyotype reshufflings of *Festuca pratensis* × *Lolium perenne* hybrids. *Protoplasma*, 255: 451–458. <https://doi.org/10.1007/s00709-017-1161-5>
 179. Mandić-Mulec, I., Stefanic, P., & van Elsas, J. D. (2015). Ecology of *Bacillaceae*. *Microbiology Spectrum*, 3(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.tbs-0017-2013>
 180. 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>
 181. Maravilla, A. J., Rosato, M., & Rosselló, J. A. (2021). Interstitial telomeric-like repeats (ITR) in seed plants as assessed by molecular cytogenetic techniques: A review. *Plants*, 10(11), 2541. <https://doi.org/10.3390/plants10112541>
 182. Martin, R., Gazis, R., Skaltsas, D., Chaverri, P., & Hibbett, D. (2015). Unexpected diversity of basidiomycetous endophytes in sapwood and leaves of *Hevea*. *Mycologia*, 107(2): 284–297. <https://doi.org/10.3852/14-206>
 183. Matheny, P. B., Liu, Y. J., Ammirati, J. F., & Hall, B. D. (2002). Using RPB1 sequences to improve phylogenetic inference among

- mushrooms (*Inocybe*, Agaricales). *American Journal of Botany*, 89(4): 688–698. <https://doi.org/10.3732/ajb.89.4.688>
184. Matoba, H., Soejima, A., & Hoshi, Y. (2007). Identification of parental genomes and genomic organization in *Aster microcephalus* var. *ovatus*. *Journal of Plant Research*, 120: 585–593. <https://doi.org/10.1007/s10265-007-0101-4>
 185. McNeil, N., & Ried, T. (2000). Novel molecular cytogenetic techniques for identifying complex chromosomal rearrangements: Technology and applications in molecular medicine. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 2(7): 1–14. <https://doi.org/10.1017/S1462399400001940>
 186. Menkis, A., Vasiliauskas, R., Taylor, A. F. S., Stenström, E., Stenlid, J., & Finlay, R. D. (2006). Fungi in decayed roots of conifer seedlings in forest nurseries, afforested clear-cuts and abandoned farmland. *Plant Pathology*, 55(1): 117–129. Doi: 10.1111/j.1365-3059.2005.01295.x
 187. Meng, Z., Zheng, Q., Wang, W., Zhu, Y., Li, Y., Dong, F., Luo, W., Zhang, Z., Wang, F., Shen, H., Xie, Q., & Li, H. (2025). Oligo-FISH barcode chromosome identification system provides novel insights into the natural chromosome aberrations propensity in the autotetraploid cultivated alfalfa. *Horticulture Research*, 12(1), uhae266. <https://doi.org/10.1093/hr/uhae266>
 188. Mesbah, N. M., Whitman, W. B., & Mesbah, M. (2011). 14 - Determination of the G+C Content of Prokaryotes. In F. Rainey, & A. Oren (Eds.), *Methods in Microbiology* (Vol. 38, pp. 299–324). London: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387730-7.00014-0>
 189. Miliute, I., Buzaitė, O., Baniulis, D., & Stanys, V. (2015). Bacterial endophytes in agricultural crops and their role in stress tolerance: A review. *Zemdirbyste-Agriculture*, 102(4): 465–478. DOI 10.13080/z-a.2015.102.060
 190. Mitchell, J. I., & Zuccaro, A. (2006). Sequences, the environment and fungi. *Mycologist*, 20(2): 62–74. <https://doi.org/10.1016/j.mycol.2005.11.004>
 191. Mizuguchi, T., Barrowman, J., & Grewal, S. I. S. (2015). Chromosome domain architecture and dynamic organization of the fission yeast genome. *FEBS Letters*, 589(20): 2975–2986. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.06.008>
 192. Morales-Cedeño, L. R., Orozco-Mosqueda, M. D. C., Loeza-Lara, P. D., Parra-Cota, F. I., de Los Santos-Villalobos, S., & Santoyo, G. (2021). Plant growth-promoting bacterial endophytes as biocontrol agents of pre-

- and post-harvest diseases: Fundamentals, methods of application and future perspectives. *Microbiological Research*, 242, 126612. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126612>
193. Moreno-Aguilar, M. F., Inda, L. A., Sánchez-Rodríguez, A., Catalán, P., & Arnelas, I. (2022). Phylogenomics and Systematics of Overlooked Mesoamerican and South American Polyploid Broad-Leaved *Festuca* Grasses Differentiate F. sects. Glabricarpae and Ruprechtia and F. subgen. Asperifolia, Erosiflorae, Mallopetalon and Coironhuecu (subgen. nov.). *Plants*, 11(17), 2303. <https://doi.org/10.3390/plants11172303>
 194. Morgan, W. G., Thomas, H., & Lewis, E. J. (1988). Cytogenetic studies of hybrids between *Festuca gigantea* Vill and *Lolium multiflorum* Lam. *Plant Breeding*, 101(4): 335–343. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1988.tb00306.x>
 195. Morse, L. J., Day, T. A., & Faeth, S. H. (2002). Effect of *Neotyphodium* endophyte infection on growth and leaf gas exchange of Arizona fescue under contrasting water availability regimes. *Environmental and Experimental Botany*, 48(3): 257–268. [https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(02\)00042-4](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(02)00042-4)
 196. Moslemi, A., Ades, P. K., Crous, P. W., Groom, T., Scott, J. B., Nicolas, M. E., & Taylor, P. W. J. (2018). *Paraphoma chlamydocopiosa* sp. nov. and *Paraphoma pye* sp. nov., two new species associated with leaf and crowninfection of pyrethrum. *Plant Pathology*, 67(1): 124–135. <https://doi.org/10.1111/ppa.12719>
 197. Mukai, Y., Nakahara, Y., & Yamamoto, M. (1993). Simultaneous discrimination of the three genomes in hexaploid wheat by multicolor fluorescence *in situ* hybridisation using total genomic and highly repeated DNA probes. *Genome*, 36(3): 489–494. <https://doi.org/10.1139/g93-067>
 198. Nagaki, K., Song, J., Stupar, R. M., Parokonny, A. S., Yuan, Q., Ouyang, S., Liu, J., Hsiao, J., Jones, K. M., Dawe, R. K., Buell, C. R., & Jiang, J. (2003). Molecular and cytological analyses of large tracks of centromeric DNA reveal the structure and evolutionary dynamics of maize centromeres. *Genetics*, 163(2): 759–770. <https://doi.org/10.1093/genetics/163.2.759>
 199. Nagaki, K., Tanaka, K., Yamaji, N., Kobayashi, H., & Murata, M. (2015). Sunflower centromeres consist of a centromere-specific LINE and a chromosome-specific tandem repeat. *Frontiers in Plant Science*, 6, 912. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00912>

200. Napitupulu, T. P., Ayudhya, S. P. N., Aimi, T., & Shimomura, N. (2022). Mycelial Growth-promoting Potential of Extracellular Metabolites of *Paraburkholderia* spp. Isolated from *Rhizopogon roseolus* Sporocarp. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 16(2): 1154–1166. <https://doi.org/10.22207/JPAM.16.2.43>
201. Neumann, P., Navrátilová, A., Koblížková, A., Kejnovský, E., Hřibová, E., Hobza, R., Widmer, A., Doležel, J., & Macas, J. (2011). Plant centromeric retrotransposons: A structural and cytogenetic perspective. *Mobile DNA*, 2, 4. <https://doi.org/10.1186/1759-8753-2-4>
202. Newsham, K. K. (2011). A meta-analysis of plant responses to dark septate root endophytes. *The New Phytologist*, 190(3): 783–793. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03611.x>
203. Nikoh, N., & Fukatsu, T. (2000). Interkingdom host jumping underground: phylogenetic analysis of entomoparasitic fungi of the genus *Cordyceps*. *Molecular Biology and Evolution*, 17(4): 629–638. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026341>
204. Nombamba, A., Fadiji, A. E., & Babalola, O. O. (2024). Exploring the role of endophytic fungi in the amelioration of drought stress in plants. *Plant Protection Science*, 60(3): 213–228. <https://doi.org/10.17221/25/2024-PPS>
205. O'Connor, C. (2008). Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH). *Nature Education*, 1(1), 171. <https://www.nature.com/scitable/topicpage/fluorescence-in-situ-hybridization-fish-327/>
206. Oono, R., Lutzoni, F., Arnold, A. E., Kaye, L., U'Ren, J. M., May, G., & Carbone, I. (2014). Genetic variation in horizontally transmitted fungal endophytes of pine needles reveals population structure in cryptic species. *American Journal of Botany*, 101(8): 1362–1374. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400141>
207. Ortíz-Castro, R., Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., & López-Bucio, J. (2009). The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signaling & Behavior*, 4(8): 701–712. <https://doi.org/10.4161/psb.4.8.9047>
208. Paterson, R. R. M., Solaiman, Z., & Santamaria, O. (2023). Guest-edited collection: Fungal Evolution and Diversity. *Scientific Reports*, 13, 21438. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-48471-0>
209. Pašakinskienė, I. (2004). Genome reconstruction and analysis within ryegrass (*Lolium* L.) and fescue (*Festuca* L.) species. In Y. Yamada & T. Takamizo (Eds.), *Development of a novel grass with environmental stress*

- tolerance and high forage quality through intergeneric hybridization between Lolium and Festuca.* (pp. 31–41). Japan: National Agriculture and Bio-oriented Research Organization (NARO).
210. Pašakinskienė, I. (2023). *Festuca pratensis*-like subgenome reassembly from a “chromosomal cocktail” in the intergeneric *Festulolium* (Poaceae) hybrid: A rare chromoanagenesis event in grasses. *Plants*, 12(5), 984. <https://doi.org/10.3390/plants12050984>
 211. Pašakinskienė, I., & Jones, N. A. (2005). A decade of "chromosome painting" in *Lolium* and *Festuca*. *Cytogenet and Genome Research*, 109(1–3): 393–399. <https://doi.org/10.1159/000082425>
 212. Pašakinskienė, I., & Jones, R. N. (2003). Challenging genome integrity. *Biologija*, 1: 3–9.
 213. Pašakinskienė, I., Anamthawat-Jónsson, K., Humphreys, M. W., & Jones, R. N. (1997). Novel diploids following chromosome elimination and somatic recombination in *Lolium multiflorum* × *Festuca arundinacea* hybrids. *Heredity*, 78: 464–469. <https://doi.org/10.1038/hdy.1997.74>
 214. Pašakinskienė, I., Anamthawat-Jónsson, K., Humphreys, M. W., Paplauskienė, V., & Jones, R. N. (1998). New molecular evidence on genome relationships and chromosome identification in fescue (*Festuca*) and ryegrass (*Lolium*). *Heredity*, 81(6), 659–665. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.1998.00446.x>
 215. 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, 453. <https://doi.org/10.3390/d16080453>
 216. Pašakinskienė, I., Stakelienė, V., Matijošiūtė, S., Martūnas, J., Rimkevičius, M., Būdienė, J., Aučina, A., & Skridaila, A. (2024). Growth-Promoting Effects of Grass Root-Derived Fungi *Cadophora fastigiata*, *Paraphoma fimeti* and *Plectosphaerella cucumerina* on Spring Barley (*Hordeum vulgare*) and Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum*). *Microorganisms*, 13, 25. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13010025>
 217. Pereira, E., Vázquez de Aldana, B. R., San Emeterio, L., & Zabalgogezcoa, I. (2019). A survey of culturable fungal endophytes from *Festuca rubra* subsp. *pruinosa*, a grass from marine cliffs, reveals a core microbiome. *Frontiers in Microbiology*, 9, 3321. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03321>

218. Petrini, O. (1991). Fungal endophytes of tree leaves. In J. Andrews & Hirano S. (Eds.) *Microbial ecology of leaves* (pp. 179–197). Netherlands: Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3168-4_9
219. Peska, V., & Garcia, S. (2020). Origin, diversity, and evolution of telomere sequences in plants. *Frontiers in Plant Science*, 11, 117. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00117>
220. Pikaard, C. S. (1999). Nucleolar dominance and silencing of transcription. *Trends in Plant Science*, 4(12): 478–483. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(99\)01501-0](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(99)01501-0)
221. Piperidis, G., Piperidis, N., & D'Hont, A. (2010). Molecular cytogenetic investigation of chromosome composition and transmission in sugarcane. *Molecular Genetics and Genomics*, 284: 65–73. <https://doi.org/10.1007/s00438-010-0546-3>
222. Popkova, E. G., & Blagoveshchenskaya, E. Yu. (2019). Fungal endophyte colonization within different organs of *Festuca gigantea* (L.) VILL. *Bulletin of Moscow Society of Naturalists*, 124(5): 65–69. <https://moip-bio.msu.ru/en/articles/fungal-endophyte-colonization-within-different-organs-of-festuca-gigantea-l-vill/>
223. Porras-Alfaro, A., Herrera, J., Sinsabaugh, R. L., Odenbach, K. J., Lowrey, T., & Natvig, D. O. (2008). Novel root fungal consortium associated with a dominant desert grass. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(9): 2805–2813. <https://doi.org/10.1128/AEM.02769-07>
224. Potvin, L. R., Richter, D. L., Jurgensen, M. F., & Dumroese, R. K. (2012). Association of *Pinus Banksiana* Lamb. and *Populus Tremuloides* Michx. seedling fine roots with *Sistotrema Brinkmannii* (Bres.) J. Erikss. (Basidiomycotina). *Mycorrhiza*, 22: 631–638. <https://doi.org/10.1007/s00572-012-0440-4>
225. Pouokam, M., Cruz, B., Burgess, S., Segal, M. R., Vazquez, M., & Arsuaga, J. (2019). The Rab1 configuration limits topological entanglement of chromosomes in budding yeast. *Scientific Reports*, 9, 6795. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42967-4>
226. Przemieniecki, S. W., Damszel, M., Kurowski, T. P., Mastalerz, J., & Kotlarz, K. (2019). Identification, ecological evaluation and phylogenetic analysis of non-symbiotic endophytic fungi colonizing timothy grass and perennial ryegrass grown in adjacent plots. *Grass and Forage Science*, 74(1): 42–52. <https://doi.org/10.1111/gfs.12404>
227. Purahong, W., & Hyde, K. D. (2011). Effects of fungal endophytes on grass and non-grass litter decomposition rates. *Fungal Divers*, 47: 1–7. <https://doi.org/10.1007/s13225-010-0083-8>

228. Rajamanikyam, M., Vadlapudi, V., Amanchy, R., & Upadhyayula, S. M. (2017). Endophytic fungi as novel resources of natural therapeutics. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 60, e17160542. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2017160542>
229. Raman, A., & Suryanarayanan, T. S. (2017). Fungus–plant interaction influences plant-feeding insects. *Fungal Ecol.*, 29: 123–132. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funeco.2017.06.004>
230. Ramsey, J., & Ramsey, T. S. (2014). Ecological studies of polyploidy in the 100 years following its discovery. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 369(1648), 20130352. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0352>
231. Rashmi, M., Kushveer, J. S., & Sarma, V. V. (2019). A worldwide list of endophytic fungi with notes on ecology and diversity. *Mycosphere*, 10(1): 798–1079. doi: 10.5943/mycosphere/10/1/19
232. Rawlins, D. J., Highett, M. I., & Shaw, P. J. (1991). Localization of telomeres in plant interphase nuclei by *in situ* hybridization and 3D confocal microscopy. *Chromosoma*, 100: 424–431. <https://doi.org/10.1007/BF00364552>
233. Rayburn, A. L., & Gill, B. S. (1985). Use of biotin-labeled probes to map specific DNA sequences on wheat chromosomes. *Journal of Heredity*, 76(2): 78–81. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a110049>
234. Renugadevi, R., Ayyappadas, M. P., Priya, V. S., Shobana M. F., & Vivekanandhan, K. (2021). Applications of bacterial endophytes and their advanced identification methodologies. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 9(6): 51–55. DOI: 10.7324/JABB.2021.9606
235. Riseh, R. S., Fathi, F., Vazvani, M. G., & Tarkka, M. T. (2025). Plant Colonization by Biocontrol Bacteria and Improved Plant Health: A Review. *Frontiers in Bioscience (Landmark Ed.)*, 30(1): 23223. <https://doi.org/10.31083/FBL23223>
236. Riva, V., Mapelli, F., Bagnasco, A., Mengoli, A., & Borin, S. (2022). A meta-analysis approach to defining the culturable core of plant endophytic bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(6), e02537-21. <https://doi.org/10.1128/aem.02537-21>
237. Roberts, E. L. (2022). Plant growth promoting fungal and bacterial endophytes of Tall Fescue: A Review. *Grass Research*, 2, 2. <https://doi.org/10.48130/GR-2022-0002>
238. Rodriguez, R. J., Henson, J., Van Volkenburgh, E., Hoy, M., Wright, L., Beckwith, F., Kim, Y.-O., & Redman, R. S. (2008). Stress tolerance in

- plants via habitat-adapted symbiosis. *The ISME Journal*, 2(4): 404–416.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2007.106>
239. Rodríguez, R. J., White, J., Arnold, A., & Redman, R. (2009). Fungal endophytes: Diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182(2): 314–330. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x>
 240. Roohi, J., Cammer, M., Montagna, C., & Hatchwell, E. (2008). An improved method for generating BAC DNA suitable for FISH. *Cytogenetic and Genome Research*, 121(1): 7–9. DOI:10.1159/000124374
 241. Rosato, M., Kovařík, A., Garilleti, R., & Rosselló, J. A. (2016). Conserved organisation of 45S rDNA sites and rDNA gene copy number among major clades of early land plants. *PLoS ONE*, 11(9), e0162544. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162544>
 242. Roustae, A., Dechamp-Guillaume, G., Gelie, B., Savy, C., Dargent, R., & Barrault, G. (2000). Ultrastructural Studies of the Mode of Penetration by *Phoma macdonaldii* in Sunflower Seedlings. *Phytopathology*, 90(8): 915–920.
<https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.8.915>
 243. Salvi, P., Mahawar, H., Agarrwal, R., Kajal, Gautam, V., & Deshmukh, R. (2022). Advancement in the molecular perspective of plant-endophytic interaction to mitigate drought stress in plants. *Frontiers in Microbiology*, 13, 981355.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.981355>
 244. Sánchez Márquez, S., Bills, G. F., Domínguez Acuña, L., & Zabalgoeazcoa, I. (2010). Endophytic mycobiota of leaves and roots of the grass *Holcus lanatus*. *Fungal Diversity*, 41: 115–123.
<https://doi.org/10.1007/s13225-009-0015-7>
 245. Sánchez Márquez, S., Bills, G., Herrero, N., & Zabalgoeazcoa, I. (2011). Non-systemic fungal endophytes of grasses. *Fungal Ecology*, 5(3): 289–297. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2010.12.001>
 246. Sánchez Márquez, S., Bills, G., & Zabalgoeazcoa, I. (2007). The endophytic mycobiota of the grass *Dactylis glomerata*. *Fungal Diversity*, 27: 171–195. https://digital.csic.es/bitstream/10261/17021/1/27_11.pdf
 247. Sánchez-Morán, E., Benavente, E., & Orellana, J. (1999). Simultaneous identification of A, B, D and R genomes by genomic *in situ* hybridisation in wheat-rye derivatives. *Heredity*, 83: 249–252.
<https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6885570>
 248. Santos, A. P., & Shaw, P. (2004). Interphase chromosomes and the Rabl configuration: does genome size matter? *Journal of Microscopy*, 214(2): 201–206. <https://doi.org/10.1111/j.0022-2720.2004.01324.x>

249. Schardl, C. L. (2009). Fungal Endophytes in *Lolium* and *Festuca* Species. In T. Yamada & G. Spangenberg (Eds.), *Molecular Breeding of Forage and Turf* (pp. 285–298). Netherlands: Springer.
https://doi.org/10.1007/978-0-387-79144-9_26
250. Schleifer, K. H. (2009). Classification of *Bacteria* and *Archaea*: Past, present and future. *Systematic and Applied Microbiology*, 32(8): 533–542.
<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2009.09.002>
251. Schnable, J., & Lyons, E. (2015). *Plant Paleopolyploidy*. Dataset. Figshare. <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.1538627.v1>
252. Schoch, C. L., Sung, G.-H., López-Giráldez, F., Townsend, J. P., Miadlikowska, J., Hofstetter, V., Robbertse, B., Matheny, P. B., Kauff, F., Wang, Z., Gueidan, C., Andrie, R. M., Trippe, K., Ciufetti, L. M., Wynns, A., Fraker, E., Hodkinson, B. P., Bonito, G., Groenewald, J. Z., Arzanlou, M., de Hoog, G. S., Crous, P. W., Hewitt, D., Pfister, D. H., Peterson, K., Gryzenhout, M., Wingfield, M. J., Aptroot, A., Suh, S.-O., Blackwell, M., Hillis, D. M., Griffith, G. W., Castlebury, L. A., Rossman, A. Y., Lumbsch, H. T., Lücking, R., Büdel, B., Rauhut, A., Diederich, P., Ertz, D., Geiser, D. M., Hosaka, K., Inderbitzin, P., Kohlmeyer, J., Volkmann-Kohlmeyer, B., Mostert, L., O'Donnell, K., Sipman, H., Rogers, J. D., Shoemaker, R. A., Sugiyama, J., Summerbell, R. C., Untereiner, W., Johnston, P. R., Stenroos, S., Zuccaro, A., Dyer, P. S., Crittenden, P. D., Cole, M. S., Hansen, K., Trappe, J. M., Yahr, R., Lutzoni, F., & Spatafora, J. W. (2009). The Ascomycota tree of life: a phylum-wide phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. *Systematic Biology*, 58(2): 224–239.
<https://doi.org/10.1093/sysbio/syp020>
253. Schol-Schwarz, M. B. (1970). Revision of the genus *Phialophora* (Moniliales). *Persoonia – Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 6(1): 59–94.
<https://repository.naturalis.nl/pub/531755/PERS1970006001004.pdf>
254. Schubert, I., & Wobus, U. (1985). In situ hybridisation confirms jumping nucleolus organizing regions in *Allium*. *Chromosoma*, 92: 143–148. <https://doi.org/10.1007/BF00328466>
255. Schwarzacher, T., Leitch, A. R., Bennett, M. D., & Heslop-Harrison, J. S. (1989). In situ localization of parental genomes in wide hybrid. *Annals of Botany*, 64(3): 315–324. <http://www.jstor.org/stable/42764348>
256. Selvarasu, A., & Kandhasamy, R. (2013). Intraspecific hybridization in glory lily. *Floriculture and Ornamental Biotechnology*, 7(1): 99–102.

https://www.researchgate.net/publication/286832973_Intraspecific_hybridization_in_glory_lily

257. Sette, L. D., Passarini, M. R. Z., Delarmelina, C., Salati, F., & Duarte, M. C. T. (2006). Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22: 1185–1195.
<https://doi.org/10.1007/s11274-006-9160-2>
258. Sezgin, M., & Kahya, M. (2018). Phytohormones. *Journal of Science and Technology*, 8(1): 35–39.
<https://doi.org/10.17678/beusciotech.386726>
259. Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., & D'Ari, R. (2007). *Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth. *Journal of bacteriology*, 189(23): 8746–8749. <https://doi.org/10.1128/jb.01368-07>
260. Shahzad, R., Waqas, M., Khan, A. L., Al-Hosni, K., Kang, S.-M., Seo, C.-W., & Lee, I.-J. (2017). Indoleacetic acid production and plant growth promoting potential of bacterial endophytes isolated from rice (*Oryza sativa* L.) seeds. *Acta Biologica Hungarica*, 68: 175–186.
<https://doi.org/10.1556/018.68.2017.2.5>
261. Shakirov, E. V., Chen J. J.-L., & Shippen, D. E. (2022). Plant telomere biology: The green solution to the end-replication problem. *The Plant Cell*, 34(7): 2492–2504. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac122>
262. Sharma, P., Pandey, R., & Chauhan, N. S. (2014). Biofertilizer and biocontrol properties of *Stenotrophomonas maltophilia* BCM emphasize its potential application for sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1364807. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1364807>
263. Shaw, P. J., Abranches, R., Santos, A. P., Beven, A. F., Stoger, E., Wegel, E., & González-Melendi, P. (2002). The architecture of interphase chromosomes and nucleolar transcription sites in plants. *Journal of Structural Biology*, 140(1–3): 31–38. [https://doi.org/10.1016/S1047-8477\(02\)00537-3](https://doi.org/10.1016/S1047-8477(02)00537-3)
264. Siegel, M. R., Latch, G. C. M., Bush, L. P., Fannin, F. F., Rowan, D. D., Tapper, B. A., Bacon, C. W., & Johnson, M. C. (1990). Fungal endophyte-infected grasses: Alkaloid accumulation and aphid response. *Journal of Chemical Ecology*, 16, 3301–3315.
<https://doi.org/10.1007/BF00982100>
265. Silva, G. S., & Souza, M. M. (2013). Genomic *in situ* hybridisation in plants. *Genetics and Molecular Research*, 12(3): 2953–2965.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24065651/>

266. Sinclair, J. B. (1991). Latent Infection of Soybean Plants and Seeds by Fungi. *Plant Disease*, 75(3): 220–224.
https://www.apsnet.org/publications/plantdisease/backissues/Documents/1991Articles/PlantDisease75n03_220.pdf
267. Smeets, D. F. C. M. (2004). Historical prospective of human cytogenetics: from microscope to microarray. *Clinical Biochemistry*, 37(6): 439–446. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2004.03.006>
268. Soltis, D. E., Soltis, P. S., Schemske, D. W., Hancock, J. F., John, N., Thompson, J. N., Husband, B. C., & Judd, S. W. (2007). Autopolyploidy in angiosperms: have we grossly underestimated the number of species? *Taxon*, 56(1): 13–30.
<https://doi.org/10.2307/25065732>
269. Soltis, P. S., & Soltis, D. E. (2009). The role of hybridization in plant speciation. *Annual Review of Plant Biology*, 60: 561–588.
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.043008.092039>
270. Son, E., Kim, J.-J., Lim, Y. W., Au-Yeung, T. T., Yang, C. Y. H., & Breuil, C. (2011). Diversity and decay ability of basidiomycetes isolated from lodgepole pines killed by the mountain pine beetle. *Canadian Journal of Microbiology*, 57(1): 33–41. <https://doi.org/10.1139/W10-102>
271. Song, L.-s., Huo, J., Wan, L., Pan, L., Jiang, N., Fu, J., Wei, S., & He, L. (2023). Differences and biocontrol potential of haustorial endophytic fungi from *Taxillus chinensis* on different host plants. *BMC Microbiology*, 23, 128. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02878-x>
272. Stakelienė, V., & Pašakinskienė, I. (2022). Fluorescent *in situ* hybridisation in plants: new ways to link DNA sequence resources and chromosome loci – a review. *Zemdirbyste-Agriculture*, 109: 171–178. DOI 10.13080/z-a.2022.109.022
273. 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), 799.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms13040799>
274. Steiner, U., Ahimsa-Müller, M. A., Markert, A., Kucht, S., Groß, J., Kauf, N., Kuzma, M., Zych, M., Lamshöft, M., Furmanowa, M., Knoop, V., Drewke, C., & Leistner, E. (2006). Molecular characterization of a seed transmitted clavicipitaceous fungus occurring on dicotyledoneous plants (Convolvulaceae). *Planta*, 224: 533–544.
<https://doi.org/10.1007/s00425-006-0241-0>

275. Stone, J. K., Polishook, J. D., White, J. F. & Jr. (2012). Endophytic Fungi. *Encyclopedia of Science & Technology*, 241–270. DOI: 10.13140/2.1.3835.2169
276. Strobel, G., & Daisy, B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4): 491–502.
<https://doi.org/10.1128/mmmbr.67.4.491-502.2003>
277. Suebrasri, T., Harada, H., Jogloy, S., Ekprasert, J., & Boonlue, S. (2020). Auxin-producing fungal endophytes promote growth of sunchoke. *Rhizosphere*, 16(5), 100271.
<https://dx.doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100271>
278. Sun, R.-T., Zhang, Z.-Z., Feng, X.-C., Zhou, N., Feng, H.-D., Liu, Y.-M., Harsonowati, W., Hashem, A., Abd_Allah, E. F., & Wu, Q.-S. (2022). Endophytic Fungi Accelerate Leaf Physiological Activity and Resveratrol Accumulation in *Polygonum cuspidatum* by Up-Regulating Expression of Associated Genes. *Agronomy*, 12(5), 1220.
<https://doi.org/10.3390/agronomy12051220>
279. Suzuki, G., Ura, A., Saito, N., Do, G. S., Seo, B. B., Yamoto, M., & Mukai, Y. (2001). BAC FISH analysis in *Allium cepa*. *Genes & Genetic Systems*, 76(4): 251–255. <https://doi.org/10.1266/ggs.76.251>
280. Tan, H., Man, C., Xie, Y., Yan, J., Chu, J., & Huang, J. (2019). A Crucial Role of GA-Regulated Flavonol Biosynthesis in Root Growth of *Arabidopsis*. *Molecular plant*, 12(4): 521–537.
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.12.021>
281. Tang, Z., Yang, Z., & Fu, S. (2014). Oligonucleotides replacing the roles of repetitive sequences pAs1, pSc119.2, pTa-535, pTa71, CCS1, and pAWRC.1 for FISH analysis. *Journal of Applied Genetics*, 55: 313–318.
<https://doi.org/10.1007/s13353-014-0215-z>
282. Tang, S., Tang, Z., Yang, Z., Li, G., Lang, T., Zhu, W., Zhang, J., & Fu, S. (2018). Developing New Oligo Probes Distinguish Specific Chromosomal Segments and the A, B, D Genomes of Wheat (*Triticum aestivum* L.) ND-FISH. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1104.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01104>
283. Tate, J. A., Soltis, D. E., & Soltis, P. S. (2005). Chapter 7 – Polyploidy in Plants. In T. R. Gregory (eds.), *The Evolution of the Genome* (pp. 371–426). London: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012301463-4/50009-7>
284. Taylor, T. N., Krings, M., & Taylor, E. L. (2015). 8 – Ascomycota. In N. T. Thomas, K. Michael & L. T. Edith (Eds.), *Fossil Fungi* (pp. 129–

- 171). Academic Press. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-387731-4.00008-6>
285. Tetteh, J. N. A., Matthäus, F., & Hernandez-Vargas, E. A. (2020). A survey of within-host and between-hosts modelling for antibiotic resistance. *Biosystems*, 196, 104182. <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2020.104182>
286. The Angiosperm Phylogeny Group. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181(1): 1–20. <https://doi.org/10.1111/boj.12385>
287. Thomas, H. M., Harper, J. A., Meredith, M. R., Morgan, W. G., & King, I. P. (1997). Physical mapping of ribosomal DNA sites in *Festuca arundinacea* and related species by in situ hybridization. *Genome*, 40(3): 406–410. <https://doi.org/10.1139/g97-054>
288. Thomas, H. M., Harper, J. A., Meredith, M. R., Morgan, W. G., Thomas, I. D., Timms, E., & King, I. P. (1996). Comparison of ribosomal DNA sites in *Lolium* species by fluorescence *in situ* hybridisation. *Chromosome Research*, 4: 486–490. <https://doi.org/10.1007/BF02261775>
289. Thomas, H. M., Morgan, W. G., Meredith, M. R., Humphreys, M. W., & Leggett, J. M. (1994). Identification of parental and recombined chromosomes in hybrid derivatives of *Lolium multiflorum* × *Festuca pratensis* by genomic *in situ* hybridization. *TAG. Theoretical and Applied Genetics*, 88(8): 909–913. <https://doi.org/10.1007/BF00220795>
290. Thomma, B. P. H. J. (2003). *Alternaria* spp.: From general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*, 4(4): 225–236. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00173.x>
291. Tiang, C.-L., He, Y., & Pawlowski, W. P. (2012). Chromosome Organization and Dynamics during Interphase, Mitosis and Meiosis in Plants. *Plant Physiology*, 158(1): 26–34. <https://doi.org/10.1104/pp.111.187161>
292. Tiwari, P., Bajpai, M., Singh, L. K., Mishra, S., & Yadav, A. N. (2020). Chapter 8. Phytohormones Producing Fungal Communities: Metabolic Engineering for Abiotic Stress Tolerance in Crops. In A. Yadav, S. Mishra, D. Kour, N. Yadav & A. Kumar (Eds.) *Agriculturally Important Fungi for Sustainable Agriculture* (pp. 171–197). Netherlands: Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-45971-0_8
293. Toju, H., Yamamoto, S., Sato, H., Tanabe, A. S., Gilbert, G. S., & Kadowaki, K. (2013). Community composition of root-associated fungi in a *Quercus*-dominated temperate forest: “codominance” of mycorrhizal and

- root-endophytic fungi. *Ecology and Evolution*, 3(5): 1281–1293.
<https://doi.org/10.1002/ece3.546>
294. Toju, H., Kurokawa, H., & Kenta, T. (2019). Factors influencing leaf- and root-associated communities of bacteria and fungi across 33 plant orders in a grassland. *Frontiers in Microbiology*, 10, 241.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00241>
295. Toju, H., Tanabe, A. S., Yamamoto, S., & Sato, H. (2012). High-Coverage ITS Primers for the DNA-Based Identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in Environmental Samples. *PLoS ONE*, 7(7), e40863.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040863>
296. Toppo, P., Jangir, P., Mehra, N., Kapoor, R., & Mathur, P. (2024). Bioprospecting of endophytic fungi from medicinal plant *Anisomeles indica* L. for their diverse role in agricultural and industrial sectors. *Scientific Reports*, 14, 588. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-51057-5>
297. 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 Bioogy*, 119(1): 53–66.
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.11.002>
298. Tsotetsi, T., Nephali, L., Malebe, M., & Tugizimana, F. (2022). *Bacillus* for Plant Growth Promotion and Stress Resilience: What Have We Learned? *Plants (Basel)*, 11(19), 2482.
<https://doi.org/10.3390/plants11192482>
299. Uecker, F. A. (1993). Development and Cytology of *Plectosphaerella cucumerina*. *Mycologia*, 85(3): 470–479.
<https://doi.org/10.1080/00275514.1993.12026297>
300. Vandegrift, R., Roy, B. A., Pfeifer-Meister, L., Johnson, B. R., & Bridgham, S. D. (2015). The herbaceous landlord: integrating the effects of symbiont consortia within a single host. *PeerJ*, 3, e1379.
<https://doi.org/10.7717/peerj.1379>
301. Vega, F. E. (2018). The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control: a review. *Mycologia*, 110(1): 4–30.
<https://doi.org/10.1080/00275514.2017.1418578>
302. Vergara, C., Araujo, K. E. C., Urquiaga, S., Schultz, N., Balieiro, F. C., Medeiros, P. S., Santos, L. A., Xavier, G. R., & Zilli, J. E. (2017). Dark Septate Endophytic Fungi Help Tomato to Acquire Nutrients from Ground Plant Material. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2437.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02437>

303. Vergara, C., Campos Araujo, K. E., Alves, L. S., de Souza, S. R., Santos, L. A., Santa-Catarina, C., da Silva, K., Duarte Pereira, G. M., Xavier, G. R., & Zilli, E. J. (2018). Contribution of dark septate fungi to the nutrient uptake and growth of rice plants. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(1): 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.04.010>
304. Vergara, C., Campos Araujo, K. E., Sperandio, M. C. L., Santos, L. A., Urquiaga, S., & Zilli, J. É. (2019). Dark septate endophytic fungi increase the activity of proton pumps, efficiency of 15N recovery from ammonium sulphate, N content, and micronutrient levels in rice plants. *Brazilian Journal of Microbiology*, 50: 825–838. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00092-4>
305. Větrovský, T., Kolařík, M., Žifčáková, L., Zelenka, T., & Baldrian, O. (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>
306. Vilkonis, K. K. (2001). *Lietuvos žaliasis rūbas*. Lututė.
307. Volkov, R. A., Panchuk, I. I., Borisjuk, N. V., Hosiawa-Baranska, M., Maluszynska, J., & Hemleben, V. (2017). Evolutional dynamics of 45S and 5S ribosomal DNA in ancient allohexaploid *Atropa belladonna*. *BMC Plant Biology*, 17, 21. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-0978-6>
308. Vu, D., Groenewald, M., de Vries, M., Gehrmann, T., Stielow, B., Eberhardt, U., Al-Hatmi, A., Groenewald, J. Z., Cardinali, G., Houbroken, J., Boekhout, T., Crous, P. W., Robert, V., & Verkley, G. J. M. (2019). Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. *Studies in Mycology*, 92(1): 135–154. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.05.001>
309. Wang, X., Liang, J., Liu, Z., Kuang, Y., Han, L., Chen, H., Xie, X., Hu, W., & Tang, M. (2022). Transcriptional regulation of metal metabolism- and nutrient absorption-related genes in *Eucalyptus grandis* by arbuscular mycorrhizal fungi at different zinc concentrations. *BMS Plant Ecology*, 22, 76. <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03456-5>
310. War, A. F., Bashir, I., Reshi, Z. A., Kardol, P., & Rashid, I. (2023). Insights into the seed microbiome and its ecological significance in plant life. *Microbiological Research*, 269, 127318. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127318>
311. Wardani, R. K., Ahsan, R., & Shin, M. K. (2025). Evolutionary patterns of the SSU rRNA (V4 region) secondary structure in genus

- Euplotes* (Ciliophora, Spirotrichea): insights into cryptic species and primitive traits. *PeerJ*, 13, e18852. <https://doi.org/10.7717/peerj.18852>
312. Watts, D., Palombo, E. A., Jaimes Castillo, A., & Zaferanloo, B. (2023). Endophytes in Agriculture: Potential to Improve Yields and Tolerances of Agricultural Crops. *Microorganisms*, 11(5), 1276. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051276>
 313. Wearn, J. A., Sutton, B. C., Morley, N. J., & Gange, A. C. (2012). Species and organ specificity of fungal endophytes in herbaceous grassland plants. *Journal of Ecology*, 100(5): 1085–1092. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2012.01997.x>
 314. Weber, B., & Schmidt, T. (2009). Nested Ty3-gypsy retrotransposons of a single *Beta procumbens* centromere contain a putative chromodomain. *Chromosome Research*, 17: 379–396. <https://doi.org/10.1007/S10577-009-9029-Y>
 315. Wei, X. K., Xue, L. H., & Li, C. J. (2021). First report of leaf spot caused by *Alternaria alternata* on italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) in China. *Plant Disease*, 105(4): 1211. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-20-1737-PDN>
 316. Weinhold, B. (2006). Epigenetics: The Science of Change. *Environmental Health Perspectives*, 114(3), 160–167. <https://doi.org/10.1289/ehp.114-a160>
 317. White, J. F., Jr, & Cole, G. T. (1985). Endophyte-Host Associations in Forage Grasses. I. Distribution of Fungal Endophytes in Some Species of *Lolium* and *Festuca*. *Mycologia*, 77(2): 323–327. DOI: 10.2307/3793087
 318. Wippel, K. (2023). Plant and microbial features governing an endophytic lifestyle. *Current Opinion in Plant Biology*, 76, 102483. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2023.102483>
 319. Wirsal, S. G. R., Leibinger, W., Ernst, M., & Mendgen, K. (2001). Genetic diversity of fungi closely associated with common reed. *New Phytologist*, 149(3): 589–598. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2001.00038.x>
 320. Wu, F.-L., Li, Y., Tian, W., Sun, Y., Chen, F., Zhang, Y., Zhai, Y., Zhang, J., Su, H., & Wang, L. (2020). A novel dark septate fungal endophyte positively affected blueberry growth and changed the expression of plant genes involved in phytohormone and flavonoid biosynthesis. *Tree Physiology*, 40(8): 1080–1094. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpaa047>

321. Xia, C., Li, N., Zhang, X., Feng, Y., Christensen, M. J., & Nan, Z. (2016). An *Epichloë* endophyte improves photosynthetic ability and dry matter production of its host *Achnatherum inebrians* infected by *Blumeria graminis* under various soil water conditions. *Fungal Ecology*, 22: 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2016.04.002>
322. Xu, L., Wu, C., Oelmüller, R., & Zhang, W. (2018). Role of Phytohormones in *Piriformospora indica*-Induced Growth Promotion and Stress Tolerance in Plants: More Questions Than Answers. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1646. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01646>
323. Yagame, T., Funabiki, E., Yukawa, T., & Nagasawa, E. (2018). Identification of mycobionts in an achlorophyllous orchid, *Cremastra aphylla* (Orchidaceae), based on molecular analysis and basidioma morphology. *Mycoscience*, 59(1): 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.myc.2017.08.001>
324. Yakti, W., Kovács, G. M., Vági, P., & Franken, P. (2018). Impact of dark septate endophytes on tomato growth and nutrient uptake. *Plant Ecology & Diversity*, 11(5–6), 637–648. <https://doi.org/10.1080/17550874.2019.1610912>
325. Yamada, T. (2011). *Festuca*. In C. Kole. (Eds.), *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources* (pp. 153–164). Netherlands: Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-14255-0_9
326. Yao, H., Sun, X., He, C., Maitra, P., Li, X.-C., & Guo, L.-D. (2019). Phyllosphere epiphytic and endophytic fungal community and network structures differ in a tropical mangrove ecosystem. *Microbiome*, 7, 57. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0671-0>
327. Younis, A., Ramzan, F., Hwang, Y.-J., & Lim, K.-B. (2015). FISH and GISH: molecular cytogenetic tools and their applications in ornamental plants. *Plant Cell Reports*, 34: 1477–1488. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1828-3>
328. Yuan, J., Zhang, T., Hu, Y., Bai, L., Zhang, L., Yang, J., Zheng, Y., Qin, Y., Xu, Z., Han, T., Sun, P., Han, W., & Fu, J. (2025). Effects of plant growth regulators and endogenous phytohormone profiles on the rooting of tissue culture raised shoots of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.). *Scientia Horticulturae*, 339, 113917. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2024.113917>
329. Yuang, K. D. (2007). Bacterial morphology: why have different shapes? *Current Opinion in Microbiology*, 10(6): 596–600. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.09.009>

330. Zapun, A., Vernet, T., & Pinho, M. G. (2008). The different shapes of cocci. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2): 345–360. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00098.x>
331. Zhang, T., Liu, G., Zhao, H., Braz, G. T., & Jiang, J. (2021). Chorus2: design of genome-scale oligonucleotide-based probes for fluorescence *in situ* hybridization. *Plant Biotechnology Journal*, 19(10): 1967–1978. <https://doi.org/10.1111/pbi.13610>
332. Zhao, J., Zhao, X., Wang, J., Gong, Q., Zhang, X., & Zhang, G. (2020). Isolation, Identification and Characterization of Endophytic Bacterium *Rhizobium oryzihabitans* sp. nov., from Rice Root with Biotechnological potential in agriculture. *Microorganisms*, 8(4), 608. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040608>
333. Zhou, J., Li, X., Huang, P.-W., & Dai, C.-C. (2018). Endophytism or saprophytism: Decoding the lifestyle transition of the generalist fungus *Phomopsis liquidambari*. *Microbiological Research*, 206: 99–112. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.10.005>
334. Zwyrťková, J., Němečková, A., Čížková, J., Holušová, K., Kapustová, V., Svačina, R., Kopecký, D., Till, B. J., Doležel, J., & Hřibová, E. (2020). Comparative analyses of DNA repeats and identification of a novel Fesreba centromeric element in fescues and ryegrasses. *BMC Plant Biology*, 20, 280. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02495-0>
335. Zwierzykowski, Z. (1996). Interspecific and intergeneric hybrids of the *Lolium–Festuca* complex obtained in Poland in the years 1964–1994 and maintained in the collection at the Institute of Plant Genetics in Poznań. *Journal of Applied Genetics*, 37(1): 79–100. <https://bibliotekanauki.pl/articles/2047713>
336. Zwierzykowski, Z., Kosmala, A., Zwierzykowska, E., Jones, N., Jokś, W., & Bocianowski, J. (2006). Genome balance in six successive generations of the allotetraploid *Lolium perenne* × *Festuca pratensis*. *Theoretical and Applied Genetics*, 113: 539–547. <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0322-2>
337. Zwierzykowski, Z., Tayyar, M., Brunell, M., & Lukaszewski, A. J. (1998). Genome recombination in intergeneric hybrids between tetraploid *Festuca pratensis* and *Lolium multiflorum*. *Journal of Heredity*, 89(4): 324–328. <https://doi.org/10.1093/jhered/89.4.324>
338. Zwierzykowski, Z., Lukaszewski, A. J., Naganowska, B. & Lesniewska, A. (1991). The pattern of homoeologous recombination in triploid hybrids of *Lolium multiflorum* with *Festuca pratensis*. *Genome*, 42(4): 720–726. <https://doi.org/10.1139/g98-169>

SUMMARY

INTRODUCTION

Plant crossbreeding is a common phenomenon in nature. It is estimated that allopolyploids account for roughly 70% of all angiosperms. Due to the hybridisation and whole genome duplication that has occurred, allopolyploidy is considered to be one of the most important evolutionary events in the emergence of angiosperm species diversity (Moreno-Aguilar et al., 2022). One of the most polymorphic plant groups in the family Poaceae is the genus *Festuca* (Bivilienė, 2010). This genus includes the natural allopolyploid *Festuca gigantea* (Hand et al., 2010; Zwyrková et al., 2020), which is found in deciduous forest communities and parks (Chorlton et al., 1997). Incidentally, due to its waterlogging tolerance and nutritional value, this species is sometimes selected for the development of *Lolium* spp. × *Festuca* spp. hybrids (Chorlton et al., 1997). The allopolyploid species *F. gigantea* is also a suitable subject for studying the mechanisms of polyploid evolution. Unfortunately, there is still insufficient research that fully reveals the components of genome composition in natural allopolyploids formed in nature by crossing *Lolium* and *Festuca* species (Humphreys et al., 1995; Pašakinskienė et al., 1997).

One of the most common methods used in cytogenetics to determine the genome composition and specific sequence rearrangements of polyploid species is differential chromosome staining using the FISH/GISH techniques. Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) uses fluorochrome-labelled DNA sequences to identify specific chromosomal regions (O'Connor, 2008). Meanwhile, genomic *in situ* hybridisation (GISH) uses fluorescent-labelled genomic DNA (gDNA) as a probe to differentiate chromosomes of different species (Schwarzacher et al., 1989). These techniques began to be used as far back as 1994 to determine the allopolyploid origin and rearrangements of *Festuca* species and *Festulolium* hybrids (Thomas et al., 1994). Using these methods, the components of the genome composition of the natural allohexaploid *F. arundinacea* have been revealed (Humphreys et al., 1995; Pašakinskienė et al., 1997, 1998). Moreover, the recombination frequency of *L. perenne* × *F. pratensis* chromosomes (Canter et al., 1999), the fragile sites of *Lolium* chromosomes through which DNA strand breaks and recombination occur (Majka et al., 2018, 2019), the dominance of the *Lolium* genome in *Festulolium* hybrids (Canter et al., 1999; Glombik et al., 2021) and the rediploidisation of the *F. pratensis* subgenome (Pašakinskienė, 2023;

Pašakinskienė & Jones, 2005) have been determined. Although molecular phylogenetic studies of ryegrass and fescue have shown that *F. gigantea* is closely related to *F. pratensis* and species of the *Lolium* genus – *L. multiflorum*, *L. temulentum* and *L. perenne* (Hand et al., 2010), no studies have been conducted to date on the origin of the giant fescue genome.

The research data show that almost all plants have symbiotic relationships with endophytes (Arnold, 2007), which help plants adapt to their environment (Maciá-Vicente et al., 2008). Incidentally, this is an example of an important mutually beneficial relationship formed during evolution (Dimijian, 2000). However, the assessment of endophytic colonisation in *Festuca* and *Lolium* species has long been limited to the part of these plants that is above ground (Leyronas & Raynal, 2001; Leuchtman, 1994; Leuchtman et al., 2000; Roberts, 2022; Siegel et al., 1990). In light of this research gap, we initiated studies on root endophytes in *F. gigantea* and closely related species. This research is the first of its kind in the *Festuca* and *Lolium* plant group that we are studying.

This work comprises two parts. The first part sought to reveal the origin of the natural allohexaploid *F. gigantea* genome. Genetic origin studies were performed on cytological chromosome preparations from *F. gigantea* and its possible diploid *Lolium* and *Festuca* species as well as *L. perenne* × *F. gigantea* using the FISH/GISH technique. This allowed for the differentiation of giant fescue genome components and the identification of the centromere and telomere changes that occurred in *L. perenne* × *F. gigantea* hybrids. The second part involved the study of the root endophytes, fungi and bacteria in *F. gigantea* and related species. The isolation of endophytes from plant root tissue was used to reveal the relationship between giant fescue and endophytes. The study was expanded to include the related species of the genera *Festuca* and *Lolium*. Furthermore, the seed inoculation experiment with endophytic fungal spore suspension allowed for a better understanding of the biological role of endophytes in plant growth.

The aim of the study – to reveal the phylogenetic origin of natural *F. gigantea* ($2n = 6x = 42$) allopolyploids and their relationships with endophytes.

The main tasks:

1. Explore the genome structure of *F. gigantea* based on the chromosome ratios and recombination frequency of its presumed parent species, *F. pratensis*, *L. perenne*, *L. multiflorum* and *L. temulentum*, using the GISH technique on metaphase chromosome preparations.

2. Identify the changes in specific DNA sequences – ribosomal DNA, centromeres and telomeres – in *F. gigantea* × *Lolium* spp. hybrids in order to reveal the patterns of genome rearrangement.
3. Isolate root endophytic fungi and bacteria isolates from parent species and hybrids as well as compare the distribution and colonisation frequency of endophytic species in roots.
4. Test the effect of seed inoculation and endophytic fungi suspension on the growth of herbaceous plants.

SCIENTIFIC NOVELTY

The first study to:

1. Establish that two-thirds of the *Festuca gigantea* ($2n = 6x = 42$) genome consists of *Lolium* spp. and *F. pratensis* origin chromosomal novel;
2. Detecte the diffusion of the centromeric Fesreba RT sequence in the *L. perenne* $\times$ *F. gigantea* hybrids ($2n = 4x = 28$) through the seven chromosomes that were derived from *L. perenne*;
3. Isolate root endophytes from *F. gigantea* and related *Festuca* spp. and *Lolium* spp. as well as *L. perenne* $\times$ *F. gigantea* hybrids. A relationship was established between the plant habitat type and endophyte biodiversity;
4. Inoculate the endophytic fungi *Cadophora fastigiata*, *Paraphoma fimeti* and *Plectosphaerella cucumerina* into *L. multiflorum* seeds and demonstrate their positive effects on plant growth.

STATEMENTS TO BE DEFENDED

1. One of the *Lolium* species (*L. perenne* or *L. multiflorum*) and *Festuca pratensis* took part in the formation of the *F. gigantea* genome ($2n = 6x = 42$); 28 *F. gigantea* chromosomes are a novel chromosomal variant of *Lolium* spp. and *F. pratensis*.
2. In the *L. perenne* $\times$ *F. gigantea* hybrids ($2n = 4x = 28$), dispersive expansion of the centromeric Fesreba RT sequence was observed in chromosomes originating from *L. perenne*.
3. *F. gigantea* and the *L. perenne* $\times$ *F. gigantea* hybrids were also characterised by interstitial insertions of telomeric sequences. All of the 5S and 45S rDNA loci are stably transmitted to the *L. perenne* $\times$ *F. gigantea* hybrids.
4. Diversity and abundance of root endophytic microorganisms differs in the studied annuals and perennials and of different ploidy in the *Festuca* and *Lolium* species.
5. There is no correspondence according to the species composition of root endophytic microorganisms between *F. gigantea*, *L. perenne* and their *L. perenne* $\times$ *F. gigantea* hybrids.
6. Inoculation of *Cadophora fastigiata*, *Paraphoma fimeti* and *Plectosphaerella cucumerina* promotes root and shoot growth in *L. multiflorum* plants.

MATERIALS AND METHODS

Plant emasculation and crossbreeding

The pistils of the diploid plants: *Lolium temulentum*, *L. perenne* Ev and *L. multiflorum* pollinated with the pollen of hexaploid *Festuca gigantea*. Embryos were isolated after 10 days and grown *in vitro* on Murashige & Skoog medium. The agar prepared for embryo culture: 30 g sacrose, 6 g agar, 500 mL deionized water, autoclaved at 121 °C for 20 min. 3g of MS dissolved in 400 mL of deionized water. 400 µL IBA (50 mg of IBA dissolved in a few drops of 100% ethyl alcohol and then 50 mL of deionized water was added) and 100 µL BAP (50 mg of BAP dissolved in a few drops of 1N NaOH and then 50 mL of deionized water was added), and 50 mL deionized water were added in 400 mL MS medium (pH 5.5). Then, hormones solution was added in 500 mL of autoclaved agar and thoroughly mixed and autoclaved at 121 °C for 20 min.

Before isolating the embryos, immature seeds were sterilized for 5 minutes in 5% NaOCl and sterile water (1:1) ratio, and washed twice with sterile water. The embryos were transferred to MS medium. After three months of a sustained growth period hybrids (*Lolium* spp. × *F. gigantea*) were transferred to the experimental field of Vilnius University Botanical Garden: *L. perenne* × *F. gigantea*, three hybrids, *L. multiflorum* × *F. gigantea* – twenty-three, and *L. temulentum* × *F. gigantea* one hybrid. *L. perenne* × *F. gigantea* hybrids were used for studies of FISH/GISH and endophyte microorganisms.

Morphological characteristics

We used *F. gigantea* (20 plants), *L. perenne* 'Veja' (6 plants), and three *L. perenne* × *F. gigantea* hybrids (6 plants each). Morphological measurements were taken twice: in the vegetative and generative development phases.

The analysis was conducted using the quantitative and qualitative data of the plants. Quantitative characteristics: (a) plant height (cm) during vegetative development phases; (b) plant height (cm) during generative development phases; (c) inflorescence length (cm); (d) leaf auricle length (cm); (e) central leaf length (cm); (f) width of the base and central part of the same central leaf (cm). The qualitative characteristics: 1) inflorescence type (spike, panicle or drooping panicle) (Fig. 2.1); 2) leaf auricle characteristics (non-enveloping, enveloping or fully enveloping) (Fig. 2.2); 3) pollen dispersal (poor or good).

Inflorescences were grouped by type: 1) drooping panicle – *Festuca*-like; 2) spike – *Lolium*-like; 3) panicle – intermediate type. For each plant, $N = 5$ –

10 inflorescences, leaf auricle and leaf lengths and leaf width were measured. Measurements were taken: 1) by choosing the auricles on the central leaf of the stem, when measuring them from the end of the auricle to the base axil of the leaf; 2) the length and width of the leaf were measured by choosing the central leaf of the stem; 3) the plant height was measured by choosing the longest stem of the plant.

FISH/GISH Method

FISH/GISH method was used to study metaphases and interphase nuclei plates of the plant roots: *F. gigantea*, *F. pratensis* 'Alanta', *L. perenne* 'Veja', *L. perenne* × *F. gigantea*, *L. multiflorum* 'Grazer' and *L. temulentum*.

The cytology slides preparation from the root meristems

The old roots of the plant tillers were removed and put in tap water in glass tubes (Fig. 2.3). When roots grew up to 1–2 cm long, they were collected and placed in ice-cold water for 24 h, at 2–4 °C, followed by fixation in ratio of 1:9 acetic acid and ethanol. The collected roots were stored at RT for 24 h, then placed in a refrigerator at 2–4 °C.

The roots were placed in a mixture of 0.5% Pectolyase Y-23 and 0.5% Cellulase R-10 for 10 minutes or 0.5% Macerozyme R-10 for 25 minutes at 37 °C, 350 rpm (used Thermo-Shaker TS-100C, *Thermo Fisher Scientific Baltics*, Vilnius, Lithuania) and squashed in 45% acetic acid. Mitotic chromosome spreads were checked by phase-contrast microscopy (Nikon ECLIPSE Ci-L (*Nikon*, Tokyo, Japan)), using ×400 and ×1000 magnification. Mitotic chromosome spreads were stored by freezing at –20 °C for a few days, then by freezing at –80 °C for 30 minutes. The coverslips were removed and stored at –20 °C. The metaphase slides (all chromosomes, the image in one plane, the chromosomes do not overlap or adhere to each other) were used for FISH/GISH analysis.

Amplification of telomeric, centromeric, and 5S rDNA sequences

Telomeric sequences were amplified using two METABION pairs of telomeric primers (Table 2.1). The primers are complementary to each other; consequently, gDNA was not used, but *F. gigantea*, *F. pratensis*, *L. multiflorum*, *L. perenne* and *L. temulentum* gDNA were used for Fesreba and 5S rDNA amplification. METABION performed the synthesis of the primers (Table 2.1). The genomic DNA of plants was extracted using the "DNeasy Plant Mini Kit", and DNA concentration was checked by using a

spectrophotometer "NanoDrop™ One/One^C" (*Thermo Fisher Scientific Baltics*, Vilnius, Lithuania).

The PCR reaction was performed in a 50 µL Eppendorf test tube. Reaction mixture for telomeric sequences amplification: 5 µL each of dNTP mix (2.0 mM) and DreamTaq polymerase buffer (10×), 10 µL each of F and R primers (2.5 mM), 19.6 µL of deionized sterile water and 0.4 µL DreamTaq polymerase (5 U/µL). Reaction mixture for Fesreba and 5S sequences amplification: 7.5 µL gDNA (10 ng/µL), 5 µL each of dNTP mix (2.0 mM), DreamTaq polymerase buffer (10×), F and R primer (2.5 mM), 22.1 µL deionized sterile water and 0.4 µL DreamTaq polymerase (5 U/µL). The PCR reaction was performed in the "ProFlex™ PCR System, 3 x 32-well" thermal cycler (*Thermo Fisher Scientific Baltics*, Vilnius, Lithuania).

PCR program of telomeric sequences: 3 min/94 °C; 15 cycles: 1 min/94 °C, 30 s/55 °C, 1 min/72 °C; 40 cycles: 1 min/94 °C, 30 s/60 °C, 1 min/72 °C; 4 min/72 °C.

PCR program of Fesreba and 5S rDNA sequences: 3 min/94 °C; 35 cycles: 1 min/94 °C, 30 s/55 °C, 1 min/72 °C; 4 min/72 °C.

The PCR products were purified using the "GeneJET PCR Purification Kit".

pTA71 plasmid

We used *Escherichia coli* DH5α in which a 9 kb wheat rDNA fragment was inserted (Gerlach & Bedbrook, 1979). *E. coli* DH5α was grown on LB medium (25 g LB, 15 g agar, 1 L deionized water, autoclaved at 121 °C for 15 minutes, then ampicillin (~50 µg/mL) was added. The bacterial culture was grown for about 16 h at 37 °C. The discrete colony was transferred to 5 mL liquid LB medium with ampicillin (~50 µg/mL) and grown for 16 h at 37 °C in an "Eppendorf New Brunswick Innova® 42/42R" (*Thermo Fisher Scientific Baltics*, Vilnius, Lithuania). The plasmid DNA was extracted from *E. coli* DH5α using the "GeneJet Plasmid Miniprep Kit".

The pTA71 plasmid was cut with *EcoRI* restriction enzyme, used for the probe production: 10 µL DNA of plasmid, 5 µL *EcoRI* buffer, 3 µL *EcoRI* restriction enzyme, 32 µL deionized water and incubated at 37 °C for 1 h in the thermostat.

Fluorescent probes

The *L. multiflorum*, *L. perenne*, *L. temulentum*, *F. pratensis* and *F. gigantea* genomic DNA (more than 400 ng/µL) were boiled in water for 10 min, checked on 1% agarose gel. The 300–2500 bp DNA fraction was chosen for

labelling of the probes. Two dNTP mix were mixed with tetramethyl-rhodamine-5-dUTP or fluorescein-12-dUTP. Tetramethyl-rhodamine-5-dUTP for preparation: 4 μ L tetramethyl-rhodamine-5-dUTP (1 mM), 5 μ L each of dATP (2.5 mM), dCTP (2.5 mM) and dGTP (2.5 mM), 3.4 μ L dTTP, 19 μ L deionized sterile water. Fluorescein-12-dUTP for preparation: 10 μ L fluorescein-12-dUTP (1 mM), each of 5 μ L dATP (2.5 mM), dCTP (2.5 mM) and dGTP (2.5 mM), 1 μ L dTTP, 9 μ L deionized sterile water.

Tetramethyl-rhodamine-5-dUTP labeled mixtures: 5 μ L boiled DNA or PCR product (Fesreba, 5S rDNA or telomeric sequence) or 45S rDNA, 8 μ L 5 $\times$ dNTP mix, 8 μ L Nick translation mix, 19 μ L deionized sterile water. Fluorescein-12-dUTP labeled mixtures: 10 μ L boiled DNA or PCR product (Fesreba, 5S rDNA or telomeric sequence) or 45S rDNA, 12 μ L 5 $\times$ dNTP mix, 8 μ L Nick translation mix, 1 μ L DNA polymerase I and 9 μ L deionized sterile water.

Labeled probe mixtures were incubated for 3 h at 15 $^{\circ}$ C. After incubation, the reaction was stopped with 2 μ L EDTA (0,5M pH 8.0) for 5 min at 65 $^{\circ}$ C in a water bath. The DNA was then precipitated by adding 4 μ L sodium acetate (3M) and 120 μ L 100% -20° C ethyl alcohol. The mixtures were stored at -20° C overnight. The samples were centrifuged at 13000 $\times$ g for 20 min (Eppendorf centrifuge 5425, *Thermo Fisher Scientific Baltics*, Vilnius, Lithuania). The supernatant was removed using Eppendorf pipette (*Thermo Fisher Scientific Baltics*, kat. Nr. P005-03, Vilnius, Lithuania) and incubated at 37 $^{\circ}$ C. Then 400 μ L 70% -20° C ethyl alcohol was added and incubated at RT for 30 min, centrifuged at 13000 $\times$ g for 15 min. The supernatant was removed and incubated at 37 $^{\circ}$ C. The pellet was dissolved in 20–25 μ L deionized sterile water.

Fluorescent in situ hybridization

The mitotic slides were dried at RT, then washed twice in 2 $\times$ SSC for 5 minutes at 37 $^{\circ}$ C. The slides were soaked in 70% formamide (42 mL formamide : 18 mL 2 $\times$ SSC) and denatured at 70 $^{\circ}$ C for 2 minutes, washed with cold ethanol series (70%, 90% and 100%), 2 min each, and air-dried. In the Eppendorf test tube was added 25 μ L FISH hybridization mix (25 mL 100% formamide, 5 g 10% dextran sulfate (2.5 g dextran sulfate and 5 mL deionized water), 5 mL 20 $\times$ SSC, 0.13 g sodium dodecylsulfate; V = 50 mL) and 2 μ L probe which labeled with rhodamine or fluorescein. The hybridization mix was denatured at 73 $^{\circ}$ C for 10 minutes, then moved on ice for 5 minutes and 27 μ L of hybridization mix was added on the slide and incubated at 37 $^{\circ}$ C overnight. After incubation, the slide was washed twice in 37 $^{\circ}$ C 2 $\times$ SSC for 5 minutes

and twice with deionized water, and air-dried. The slide was mounted with 35 μ L Mount, DAPI or Vectashield mix (1:1:1). The hybridization signals were analyzed with a Nikon ECLIPSE Ci-L fluorescence microscope (Nikon, Tokyo, Japan). Three Semrock filters were used for detection: DAPI (excitation – 330–380 nm, emission – 400 nm, barrier – 410 nm); fluorescein (excitation – 470–500 nm, emission – 505 nm, barrier – 510 nm); rhodamine (excitation – 540–570 nm, emission – 575 nm, barrier – 580 nm).

Endophyte identification

Root sampling and sterilization

The plants were grown from young tiller transplants grown in the experimental field of the Botanical Garden of Vilnius University (Table 2.2). Plant tillers were collected from the experimental field in May–June. In each species, root samples were obtained from 25–30 plants, with each plant represented by three tillers. For preparation of the root samples, the collected tillers were washed under running tap water, and the old roots were removed (Fig. 2.4). New healthy roots, 1–2 cm long, were collected and surface-sterilized accordingly using 50% ethanol for 90 s and 1.25% NaOCl for 90 s; after this, the samples were washed 3 times for 3 minutes with sterile water. In addition, 200 μ L of final wash water was added to three Petri dishes with the Potato Dextrose Agar (PDA) or Luria Broth (Miller's LB broth) (LB) medium during the fungal and bacterial culture from the roots. This was used as a negative control to confirm that the root sterilization was adequate.

Endophytic fungi evaluation in the grass roots

For the microscopic evaluation, newly grown roots, as described in Section 2.4.1 (excluding the sterilization step), were used. Root segments were collected and placed in 1.5 mL Eppendorf test tubes with a fixative of ethanol–glacial acetic acid (3:1) and kept in a refrigerator (at 2–3 °C) until their further use. Prior to microscopy, all of the roots were softened using the following enzyme treatment: the sampled roots were washed twice with citrate buffer (0.1 M, pH 4.8) at 27–28 °C for 10 min and treated with 0.5% Macerozyme R-10 at 37 °C for 25 min. After the enzyme treatment, the roots were washed with citric citrate buffer and stained with 0.025% Trypan Blue at 90 °C for 30 min and then bleached with a lactic acid–glycerol (1:1) mixture, repeating this three times. The first two bleaches took place at 37 °C for 30 min, while during the third, they were left at RT for 24 h before the microscopic analysis. To determine the frequency of fungal endophyte colonization and compare it

between species, root tip cuttings from $N = 120$ roots were analyzed microscopically for each species. The root tip cuttings were analyzed using lactic acid–glycerol (4:1) and assessed using a Nikon ECLICE Ci-L phase contrast microscope (Nikon, Tokyo, Japan) in 10 fields of view for each root at $\times 400$ magnification.

Isolation of the Fungi

To make the PDA medium, 200 g of peeled, sliced potatoes was boiled in 1 L of distilled water for 30 min. The potato mass was filtered through a cheesecloth, saving the effluent. The potato infusion was poured into flasks 200 mL. A total of 4 g of dextrose and 4 g of agar were added into each flask. The mixtures were autoclaved at 121 °C for 20 min. Ampicillin sodium salt (final concentration – 100 $\mu\text{g/Lm}$) and streptomycin sulfate (final concentration – 100 $\mu\text{g/mL}$) were added prior to distribution of the agar into the plates to inhibit the bacterial growth selectively.

For cultivation of the fungal endophytes, $N = 200$ –250 root tip fragments per species were used; these samples were collected from 25–30 plants. Five cuttings of the surface-sterilized roots were placed into each Petri dish with the PDA medium. The samples were incubated in the dark at 27 °C. After 7–14 days, we observed the growth of fungal colonies in proximity to the root segments.

Isolation of the Bacteria

A total of 25 g of LB powder was dissolved in 1 L of purified water, heated and agitated until it completely dissolved, and then sterilized through autoclaving at 121 °C for 15 min. The surface-sterilized roots were prepared as described in Section 2.4.1. For cultivation of the bacterial endophytes, $N = 100$ root tip fragments per species were used; these samples were collected from 25–30 plants. Root cuttings were incubated in Petri dishes with the LB medium at 37 °C in the dark. After 1–2 days, we observed the bacterial colonies in proximity to the root segments.

DNA Extraction from the Fungi and Bacteria

The fungal and bacterial genomic DNA was isolated using the Quick-DNA™ HMW MagBead Kit. For the extraction of genomic DNA from the fungi, 10-day-old fungal colonies grown on the PDA medium were used, sampling 100 mg of mycelial biomass. For bacteria, 1- to 2-day-old colonies were sampled and transferred into the liquid LB medium for growth. The next day, genomic DNA was extracted from these cultures.

Standard DNA Amplification and Sequencing

For standard DNA amplification, the primer pairs used in the PCR reactions are listed in Table 2.1 for fungi and bacteria, respectively. The total volume of the PCR mix for amplification was 50 μ L. PCR was conducted under a temperature profile of 94 °C for 3 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 30 s, 49–61 °C [calculated according to the primer's $T_a = T_m - (0-4\text{ }^{\circ}\text{C})$] for 30 s, and 72 °C for 1 min, and a final extension at 72 °C for 5 min.

The PCR products were purified using the GeneJET PCR Purification Kit. The sequencing was performed by BaseClear B.V., Leiden, the Netherlands. The sequences from the fungal and bacterial isolates were analyzed against NCBI reference data using the BLAST tool (version 2.16.0) at <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (accessed on 26 August 2024).

Morphological Characterization of the Endophytic Microorganisms

The fungal and bacterial isolates were characterized according to their morphological features, including their structure, color, and colony edge. The microscopic fungal characteristics were described by hyphal pigmentation and presence or absence of segments, spore size and shape. The images of the colonies were taken by a Sony Alpha a6300 camera (*Sony Corporation*, Tokyo, Japan) with a Sigma 56 mm f/1.4 lens (*Sony Corporation*, Tokyo, Japan). Root section cuttings and mycelium samples were analyzed under the phase-contrast microscope, and the NIS-Elements D software (version 6.02.01) program was used for microscopic photography and analysis. A mixture of lactic acid–glycerol (4:1) was used to analyze and photograph the fungal mycelium in each specimen. A microscopic Nikon ECLIPSE Ci-L phase-contrast microscope (*Nikon*, Tokyo, Japan) was used for viewing.

Statistical Analysis

Isolation frequency (IF): The percentage of the number of endophytic fungal and bacterial strains isolated out of the total number of isolates was obtained. This parameter was used to determine the dominance of the endophytic species accessed.

Margalef's index $D = (S - 1)/\ln N$ was used to analyze taxon richness. S here is the total number of taxa, while N is the total number of isolates. These parameters were calculated by applying the formula used by Song et al. (2023).

Lolium multiflorum seeds inoculation with endophytic fungi

Preparation of Cadophora fastigiata, Paraphoma fimeti, Plectosphaerella cucumerina spore suspension

For inoculation of *L. multiflorum* 'Druva' seeds, we used the following fungal isolates from our laboratory collection: *C. fastigiata* isolate BSG003 was obtained from *F. gigantea*, *P. fimeti* BSG010 and *P. cucumerina* BSG006 from *L. perenne* × *F. gigantea* hybrids. The spore suspensions were prepared from 14-day-old cultures on the PDA medium. Fifteen Petri plates were prepared for each fungus strain. Four mL of sterile water were dispensed on each Petri plate; spores were spread and collected in sterile tubes by gently brushing them with the tip of an automatic pipette (*Thermo Fisher Scientific Baltics*, Cat. No. P005-03, Vilnius, Lithuania) (Fig. 2.5). Spore density was calculated by hemocytometer (*Precicolor HBG*, Giessen, Germany) according to the recommendations of Avin (2019) and stained by Trypan Blue. Quantification was conducted in triplicate ($N = 3$) for statistical accuracy. Spore concentrations were calculated in spores/mL to ensure clarity and reproducibility. The spore inocula were adjusted to $\sim 3.5\text{--}4 \times 10^5$ per mL density. The mixture of the three fungal strains was prepared to a ratio of 1:1:1. About 50 mL of a spore suspension was made for each inoculation treatment.

Lolium multiflorum seeds sterilization and inoculation

A laboratory protocol was applied for inoculation as follows: after sterilization, the seeds ($N = 120$ for ryegrass) were mixed with endophytic fungal spore suspension and the tubes were placed in a rotor shaker (*Eppendorf SE*, Hamburg, Germany) at 140 rpm at 28 °C for 30 min. After the inoculation treatment, the seeds were treated with 50% sulfuric acid (diluted with water) for 10 min, rinsed twice with sterile water, and surface-sterilized as follows: 70% ethanol for 2 min, sterile water wash, ½ dilution of 5% sodium hypochlorite for 10 min, three times sterile water wash, last wash for 10 min.

Lolium multiflorum grown in a cylinder elements system and morphological characteristics

Inoculation seeds were germinated for seven days in the Petri dishes at RT, then roots ($N = 50$) were collected in 1,5 mL Eppendorf test tubes with acetic acid and ethanol (1:9), which used for microscopical analysis (described in the 2.4.2 Methods Section). Germinated seeds were pre-grown for 2 weeks in multi-cavity trays in the greenhouse. Later seedlings ($N = 30$ for each treatment and control) were transplanted into $h50 \times \varnothing 11$ cm plastic cylinders (two plants per cylinder) filled with a growth substrate, which was a 1:4:1

ratio mixture of peat, compost soil, and perlite autoclaved at 121 °C for 30 min. In this original construction of cylindric elements, hand-made geotextile fabric bags fitting the cylinder volume were used. Fifteen cylindric elements for each inoculation treatment and control were arranged in 35 × 65 × h30 cm plastic containers, numbering 5 in total. Holes were punched at the bottom of the textile bags before filling them up with the growth substrate, and plastic Honeycomb panels were placed in the bottom of the container to have the water properly drained. The plants were watered twice a week with 115 mL for a period of 2 weeks, twice a week with 330 mL of water for a period of one week, and then, for the last three weeks, with 370 mL of water twice a week. The plants were grown in September–October 2023 in a polypropylene-covered greenhouse under conditions of natural light and temperatures of 24–28 °C/12–16 °C (day/night). After 63 days of post-inoculation growth, the plant shoots and roots were harvested and evaluated. The root length and shoot height were measured and the number of shoots was counted. The shoot green biomass was weighed immediately after harvesting. For shoot and root (washed soil) dry biomass was measured, the root and shoot samples were dried at ~35 °C for 48 h.

Evaluation of fungi abundance after inoculation

For abundance of endophytic fungi after inoculation we used 7-day *L. multiflorum* root fragments ($N = 50$ per treatment), which were prepared for microscopic analysis according to 2.4.2 Section description leaving new roots to grow during this stage of the experiment. A microscopic Nikon ECLIPSE Ci-L phase-contrast microscope (*Nikon*, Tokyo, Japan) was used for viewing, using at ×400 magnification. We calculated frequency of endophytic fungi, low abundance – to 10%, medium abundance from 11% to 20% and large abundance from 21% to 30%.

Software

The analysis of microscopic view and bioinformatics software

The Nikon ECLIPSE Ci-L fluorescence microscope (*Nikon*, Tokyo, Japan) was used to analyse the metaphase plates. NIS-Elements D software (version 6.02.01) was used for analysis of microscopic images. The Nikon ECLIPSE Ci-L phase-contrast microscope (*Nikon*, Tokyo, Japan) was used for the analysis of endophytic fungi mycelium. Image Focus Alpha Properties software (version 1.3.7.2444.6.20240114) was used for calculations of fungi

spore suspensions. BLAST was used for DNA sequences of the endophytic fungi and bacterial colonies analyse from NCBI database.

Statistical analysis and visualization

The credibility of *Lolium*, *Festuca* and *L. perenne* × *F. gigantea* morphological characteristic differences were counted using Student's test ($p \leq 0.05$). The measurement of endophytic fungi frequency, biodiversity and inoculation effects differences between groups were analyzed using a one-way ANOVA in STATISTICA 12. The statistical significance of the differences between the means was assessed using a post-hoc Tukey's test. Differences were considered to be significant at $p \leq 0.05$.

STATISTICA 12 and MS Excel were used for the statistical analysis. Charts were drawn using MS Excel software 2016. The methodological diagrams drawn using BioRender.com.

RESULTS

Obtaining and evaluating intergeneric Lolium perenne × Festuca gigantea hybrids

In one experiment, the diploid *L. perenne* ($2n = 2x = 14$) was crossed with the hexaploid *F. gigantea* ($2n = 6x = 42$), using *L. perenne* as the mother plant (pistils) and the hexaploid *F. gigantea* as the parent species (stamens). The results obtained show that *L. perenne*, as the mother plant, formed immature seeds in 21.05% of the 171 emasculated and pollinated flowers. Three *L. perenne* × *F. gigantea* ($2n = 4x = 28$) hybrids were obtained *in vitro*.

The data obtained confirm that the *L. perenne* ovaries were effectively stimulated by pollination with the *F. gigantea* pollen, indicating that these species are mutually compatible.

After evaluating the qualitative and quantitative morphological parameters of *F. gigantea*, *L. perenne* and the *L. perenne* × *F. gigantea* F1 hybrids (Tables 3.1 and 3.2), it was found that the *L. perenne* × *F. gigantea* hybrids are characterised by an intermediate type of inflorescence – a panicle (Fig. 2.1 B). Although it was possible to create *L. perenne* × *F. gigantea* F1 hybrids, all of the F1 hybrids were male-sterile and none of them set seeds (Table 3.1). In terms of leaf auricles, *F. gigantea* individuals are characterised by stem-enveloping and intersecting auricles (Fig. 2.2 C), in contrast to *L. perenne* (Fig. 2.2 A). *L. perenne* × *F. gigantea* individuals are characterised by an intermediate type of auricle – stem-enveloping auricles (Fig. 2.2 B).

When evaluating quantitative parameters, it was found that the difference between *F. gigantea* and *L. perenne* in terms of inflorescence, auricle and leaf lengths, and leaf width was statistically significant (Table 3.2). According to these traits, *F. gigantea* is superior to *L. perenne*. As shown in Table 3.2, *L. perenne* × *F. gigantea* hybrids had intermediate leaf types in terms of width, auricle, inflorescence and leaf lengths, but were closer to the *F. gigantea* parent species in these traits and are considered to have intermediate type traits.

The auricle and inflorescence lengths of *L. perenne* × *F. gigantea* N1 individuals differed significantly from the group of N2 and N3 individuals, while *L. perenne* × *F. gigantea* N2 differed in leaf length. All of the intergeneric hybrids obtained were significantly taller than *F. gigantea* and *L. perenne*; only the *L. perenne* × *F. gigantea* N3 hybrid did not differ significantly in height from the parent species at the generative stage, but it was closer to the *F. gigantea* parent species (Table 3.2). This shows that, according to this trait, the *L. perenne* × *F. gigantea* N1 and N2 hybrids were

more superior to the parent species than the *L. perenne* × *F. gigantea* N3 hybrid.

In all cases, the quantitative morphological parameters of the natural hybrid allopolyploid *F. gigantea* were superior to that of *L. perenne* in terms of leaf width and leaf auricle, inflorescence and leaf length. The results show that the *L. perenne* × *F. gigantea* F1 hybrids were phenotypically more similar to the *F. gigantea* parent species in terms of panicle-type inflorescence, auricle expression, inflorescence and leaf lengths, and leaf width.

FISH AND GISH

Investigation of the allopolyploid origin of F. gigantea using the GISH technique and the possible relationships with diploid Lolium and Festuca species

To determine the composition of the *F. gigantea* hexaploid genome, *L. perenne*, *L. multiflorum*, *L. temulentum* and *F. pratensis* gDNA probes were used, labelled with different fluorochromes and hybridised on *F. gigantea* metaphase plates ($N = 453$) and interphase nuclei ($N = 120$).

The *L. perenne*, *L. multiflorum* and *L. temulentum* gDNA probes hybridised on 28 giant fescue chromosomes, of which 14 chromosomes had an intense hybridisation signal and 14 had an average signal. GISH showed that *L. perenne* hybridisation was uniform along the entire length of the chromosomes (Fig. 3.1 A, Table 3.3). The nature of *L. multiflorum* gDNA hybridisation was different from that of *L. perenne* (Fig. 3.1 B). The appearance of recombinant chromosomes was observed in three chromosome pairs. In addition, there were intense hybridisation signals at the centromeric regions of four chromosomes (Fig. 3.1 B). When labelling with the *L. temulentum* gDNA probe, 14 more intense signals were observed in the centromeric regions on chromosomes with moderate hybridisation strength (Fig. 3.1 C). After using the *F. pratensis* gDNA probe, four pairs of chromosomes with intense signals in the centromeric regions were visible (Fig. 3.1 D). In all cases, the *Lolium* and *F. pratensis* probes showed a signal on 28 chromosomes and did not show a signal on 14 *F. gigantea* chromosomes.

To determine whether the 14 unlabelled chromosomes might be inherited from *F. pratensis*, the cytological preparations of *F. gigantea* were hybridised repeatedly. *L. perenne* and *L. multiflorum* gDNA probes which were labelled with different fluorochromes were used for the first time, $N = 50$ for each probe (Fig. 3.2 A1, B1). After the analysis of the initial hybridisation, the cytological preparations were washed with 2×SSC solution and hybridised

again using the *F. pratensis* gDNA probe. The GISH analysis revealed that the hybridisation of the *F. pratensis* gDNA probe occurred in the same 28 *F. gigantea* chromosomes (Fig. 3.2 A2, B2) as the *L. perenne* and *L. multiflorum* probes.

The intensity of the hybridisation of giant fescue interphase nuclei was also evaluated. It was found that the chromosomes from *Lolium* spp. and *F. pratensis* were spread throughout the interphase nucleus of *F. gigantea* (Fig. 3.3). Two-thirds of the *F. gigantea* genome is closely related to *L. perenne* (Fig. 3.3 A), *L. multiflorum* (Fig. 3.3 B), *L. temulentum* (Fig. 3.3 C) and *F. pratensis* (Fig. 3.3 D), while the remaining third is genetically distant.

A comparison of the hybridisation intensity of metaphase plates and interphase nuclei found that the extent of genomic probe signal distribution in interphase nuclei corresponded to the ratio observed in the hybridised metaphase chromosomes of *F. gigantea*.

Summarising the results obtained, it was established that the *F. gigantea* genome contains 28 chromosomes that show a hybridisation signal when hybridised with *L. perenne*, *L. multiflorum*, *L. temulentum* and *F. pratensis* gDNA probes. In interphase nuclei, the chromosomes of these species are not concentrated in certain regions but are spread throughout the nucleus. Comparative analysis of the metaphase chromosomes and interphase nuclei indicates that two-thirds of the *F. gigantea* genome is closely related to one of the three *Lolium* species (*L. perenne*, *L. multiflorum* or *L. temulentum*) and *F. pratensis*. Since the hybridisation of the *F. pratensis* gDNA probe occurs in the same 28 *F. gigantea* chromosomes as the *Lolium* gDNA probe, it can be argued that these 28 *F. gigantea* chromosomes are in some way novel subgenomic variants.

Cytogenetic characteristics of L. perenne × F. gigantea hybrids

Cytological preparations of tetraploid *L. perenne* × *F. gigantea* F1 hybrids ($N = 228$ metaphase plates and $N = 150$ interphase nuclei) were used and hybridised with *Lolium* spp. and *Festuca* spp. gDNA probes using the GISH technique.

After performing the hybridisation of metaphase chromosomes and interphase nuclei of *L. perenne* × *F. gigantea* hybrids, strong hybridisation of the *L. perenne* gDNA probe was detected on seven chromosomes originating from *L. perenne*, while 21 chromosomes had no signal (Table 3.4, Fig. 3.4 A). In addition, *L. perenne* originated chromosomes showing distinct localisation in interphase nuclei (Fig. 3.5 A).

Using an *F. gigantea* gDNA probe, hybridisation occurred on 21 chromosomes (Table 3.4, Fig. 3.4 B), and in interphase nuclei, the chromosomes were spread throughout the nucleus (Fig. 3.5 B).

During the experiment, after using gDNA probes from other species related to *Lolium* and *F. pratensis*, a strong hybridisation signal was observed in all cases on seven chromosomes (Table 3.4, Fig. 3.4 C–E). In interphase nuclei, chromosomes with the *Lolium* probe signal were concentrated in certain regions (Fig. 3.5 C and D), while chromosomes with the *F. pratensis* signal were spread throughout the nucleus (Fig. 3.5 E).

In summary, the results obtained showed that three-fourths of the hybrid genome consisted of *F. gigantea*, and the remaining one-fourth consisted of *L. perenne*. Therefore, as expected, its genomic formula is *LpFgFgFg*. In the interphase nuclei of the hybrids, the chromosomes originated from ryegrass were concentrated in specific regions, while those originated from fescue were not concentrated in a specific region of the interphase nuclei.

FISH of centromeric Fesreba sequences in diploid Lolium and Festuca species associated with the formation of allopolyploid F. gigantea

Analysis of centromeric Fesreba RT sequence probes from the possible diploid ancestor species of *F. gigantea*, *L. perenne*, *L. multiflorum*, *L. temulentum* and *F. pratensis* showed that, in the metaphase chromosomes of *L. perenne*, strong hybridisation signals were observed in the centromeric regions as well as less intense signals along the entire length of the chromosome (Fig. 3.6 A). On *L. multiflorum* chromosomes, weak signals were observed in the centromeric regions and weak signals were spread along the entire length of the chromosomes (Fig. 3.6 B).

Weaker signals were visible at the centromeric regions in metaphase chromosomes of *L. temulentum* than in *L. perenne* (Fig. 3.6 C). On the *F. pratensis* chromosomes, intense hybridisation signals of the RT probe were only visible in the centromeric regions (Fig. 3.6 D).

The results indicate that Fesreba retrotransposon sequences are more abundant in the genome of diploid *Lolium* species than in *F. pratensis*, as the Fesreba RT probe showed stronger and more abundant hybridisation signals in *L. perenne*, *L. multiflorum* and *L. temulentum* species.

FISH comparison of centromeric and telomeric sequences in F. gigantea and L. perenne × F. gigantea hybrids

This study attempted to identify changes in the centromeres and telomeres in metaphase chromosomes of the natural allopolyploid *F. gigantea* and the

intergeneric *L. perenne* × *F. gigantea* F1 hybrids that we created in order to reveal the patterns of genome rearrangement.

According to the research data, the *L. perenne* RT probe showed strong hybridisation signals in 42 centromeric regions of *F. gigantea* (Table 3.5, Fig. 3.7 A), while the hybridisation signals of the *L. multiflorum*, *F. pratensis* and *F. gigantea* RT probes were weaker (Table 3.5, Fig. 3.7 B, D–F). The weakest hybridisation signals at the centromeric regions of *F. gigantea* were obtained using the *L. temulentum* RT probe (Table 3.5, Fig. 3.7 C). The telomeric probe signals were localised to telomeric regions, with additional signals in interstitial regions only visible in a few chromosomes (Fig. 3.7 A).

Using *L. perenne* and *L. multiflorum* RT probes in the metaphase plates of the *L. perenne* × *F. gigantea* (2n = 4x = 28) hybrids, strong hybridisation was observed in 21 centromeric regions, while seven centromeric regions had no signals or were only barely visible (Fig. 3.8 A, B). Pronounced hybridisation signals were sometimes spread over the entire length of the seven chromosomes (Fig. 3.9 A1, B1). When using the *L. temulentum* RT probe, hybridisation signals were intense in the centromeric regions and pericentromeric parts of the chromosomes (Table 3.5, Fig. 3.8 C). The *F. pratensis* RT probe was the weakest (Table 3.5, Fig. 3.8 D). The *F. pratensis* RT probe hybridisation signals were also weak in the centromeric regions of *F. gigantea*, with six weak signals visible from 42 centromeric regions (Fig. 3.7 D). A similar result was obtained using the *F. gigantea* RT probe, which had less intense hybridisation signals than the *L. perenne*, *L. multiflorum* and *L. temulentum* RT probes (Table 3.5, Fig. 3.8 E and F).

Hybridisation of the Fesreba sequence was further investigated using the same *L. perenne* × *F. gigantea* metaphase plate for two consecutive FISH experiments, hybridising it with different probes. It was observed that the *L. perenne* and *L. multiflorum* RT probes hybridised in the centromeric regions of 21 chromosomes and along the entire length of seven chromosomes (Fig. 3.9 A1, B1). Hybridisation of the *L. perenne* gDNA probe was also observed on seven chromosomes, where the hybridisation of the *L. perenne* and *L. multiflorum* RT probe was previously visible (Fig. 3.9 A2, B2).

The FISH technique revealed that, in the metaphase plates of both *F. gigantea* (Fig. 3.7) and the *L. perenne* × *F. gigantea* hybrids (Fig. 3.8), the Fesreba retrotransposon RT probe hybridises in centromeric regions, but the signal strength and nature differ. In some *L. perenne* × *F. gigantea* metaphases, the RT probe signal is distributed diffusely – it is scattered along the entire length of seven chromosomes (Fig. 3.9), suggesting that the retrotransposon RT sequences are interspersed along the entire length of these chromosomes.

In terms of telomeric sequences, both *F. gigantea* and the *L. perenne* × *F. gigantea* hybrids are characterised by interstitial insertions of telomeric sequences (Fig. 3.4 C, 3.7 A).

FISH features of chromosome centromeres and telomeres in interphase nuclei

To determine the position of the organisational centres (centromeres and telomeres) of the chromosome territories (CTs), cytological preparations of *Festuca* and *Lolium* species with different ploidy and *L. perenne* × *F. gigantea* hybrids were used, hybridised with centromeric and telomeric probes. The *F. gigantea* and *L. perenne* × *F. gigantea* species were evaluated with $N = 160\text{--}200$, and the *L. perenne*, *L. multiflorum*, *L. temulentum* and *F. pratensis* – with $N = 20$ interphase nuclei each. The number and intensity of Fesreba RT probe hybridisation signals were evaluated.

When analysing the nuclei of the diploid *Festuca* and *Lolium* species, it was observed that the number of centromeric signals did not always correspond to the number of 14 mitotic chromosomes (Table 3.6, Fig. 3.10) – sometimes they formed groups of signals. The centromeres and telomeres were located at opposite poles of the nucleus (Fig. 3.10).

Analysis of the interphase nuclei of the *F. gigantea*, using the genomic DNA of its possible parent species *L. perenne*, *L. multiflorum*, *L. temulentum* and *F. pratensis* as well as *F. gigantea* (control) as a matrix for RT probe production, revealed that the maximum number of centromeric signals was 28 (Table 3.6). The hybridisation signals were usually intense and formed large groups. This result is seen regardless of which *Festuca* and *Lolium* species RT probe was used (Fig. 3.11). Centromeric and telomeric signals were visible on opposite sides of the nucleus (Fig. 3.11).

This pattern was also maintained in the interphase nuclei of the tetraploid *L. perenne* × *F. gigantea* hybrids, where the maximum visible number of centromeric signals was 20 (Table 3.6, Fig. 3.12). The intensity of their hybridisation signals was less often weak, and more often formed large groups. The organisational centres of the CTs were concentrated on opposite sides of the nucleus (Fig. 3.12).

In summary, the number of centromeric signals in polyploid *F. gigantea* and *L. perenne* × *F. gigantea* plants did not correspond to the number of mitotic chromosomes, since the intensity of the Fesreba RT probe hybridisation signals formed larger groups. The results of the study confirmed that, during the interphase, the chromosomes of giant fescue and its possible parent species and their hybrids assume a Rab1 configuration, where the

centromeres and telomeres are aligned at opposite sides of the inner interphase nuclear membrane.

Distribution of rDNA sequences in F. gigantea and L. perenne × F. gigantea hybrids

Studies of rDNA regions are important for understanding the chromosomal rearrangements that occurred during the evolution of allopolyploid species. For the present study, we used cytological preparations of the hybrids we created and their parent species, which we hybridised with 5S and 45S rDNA probes. The number of signals from these rDNA sequences was determined. A combination of *F. gigantea* gDNA and 5S rDNA probes was used to determine the number of 5S rDNA regions inherited from *F. gigantea* and the stability of this sequence in F1 *L. perenne* × *F. gigantea* hybrids.

The FISH results showed that *F. gigantea* has four characteristic pairs of chromosomes containing 5S rDNA regions (eight signals). Four regions localise at the secondary constrictions of the chromosomes, while the other four localise at the ends of the chromosome arms. Two pairs of chromosomes contain 45S rDNA (Table 3.7, Fig. 3.13 A and 3.14 A). In the *L. perenne* chromosomes, two 5S rDNA signals were observed, localised on the secondary constrictions of the chromosomes. One hybridisation signal generated a larger area; the other signal was less intense. In this chromosome pair, 45S rDNA signals were also visible. Five 45S rDNA signals localised on the secondary constrictions (Table 3.7, Fig. 3.13 B and 3.14 B), four of which were more intense and generated a larger area. Five 5S and five 45S rDNA loci were localised in the chromosomes of the *L. perenne* × *F. gigantea* hybrids. Of the 45S rDNA hybridisation signals, two were intense and three were weak; of the 5S rDNA hybridisation signals, three were intense and two were weak (Table 3.7, Fig. 3.13 C and 3.14 C).

A combination of *F. gigantea* gDNA and 5S rDNA probes was used to analyse the changes in the position of 5S rDNA in the metaphase chromosomes of the *L. perenne* × *F. gigantea* hybrids. One intense 5S rDNA hybridisation signal was visible on the chromosome arm, which did not have a hybridisation signal from the *F. gigantea* gDNA probe (Fig. 3.13 D). This chromosome is derived from *L. perenne*. In the other four chromosomes with the 5S rDNA signal, hybridisation also occurred with the *F. gigantea* gDNA probe (Fig. 3.13 D). The data obtained confirmed the assumption that the hybrids must have inherited one chromosome containing a 5S rDNA region from the perennial ryegrass, and four chromosomes containing this region from the giant fescue.

FISH made it possible to determine the number and localisation in the metaphase chromosomes of the ribosomal DNA sequences inherited by the *L. perenne* × *F. gigantea* hybrids. Analysis revealed that the hybrids inherited five 5S and five 45S rDNA loci each. Furthermore, there was neither loss nor gain of 5S rDNA loci compared to the parent species, which shows the stability of this sequence element in these hybrids.

Isolation and identification of endophytic microorganisms

Cytological morphostructures of endophytes and their abundance in roots

Festuca gigantea root apex cross-section preparations were examined microscopically. Fungal morphostructures were grouped into six different cytomorphotypes: (1) thick, dematiaceous (with dark pigmentation) and highly branched hyphae (Fig. 3.15 A); (2) hyaline (with no pigmentation), cystidia-like hyphae ~130 µm long that are dichotomously branched at one end (Fig. 3.15 B); (3) thin, melanised (with pigmentation), dichotomously branched hyphae (Fig. 3.15 C, D); (4) dark hyphae with septa (Fig. 3.15 E); (5) *Alternaria*-type multicellular conidia (Fig. 3.15 F); (6) fungal spore agglomerations (spore clusters; Fig. 3.18 G). Most of the fungal structures were extracellular (Fig. 3.15 A–C, E, H and I), although intracellular ones were occasionally detected as well (Fig. 3.15 D). Some hyphae were concentrated in dense groups (Fig. 3.15 H and I).

Endophytic bacterial structures were also detected: large bunches of bacilli-like bacteria and bacterial chains (Fig. 3.15 J and K).

The frequency of endophytic fungi in the roots of *F. gigantea* and perennial *Festuca* and *Lolium* species and their hybrids as well as annual *Lolium* spp. plants were evaluated using Trypan blue dye, assessing $N = 120$ each in the root apex cross-section preparations (hereinafter referred to as “roots”). Fungal structures were observed in 44% of the *F. gigantea* roots that were examined. In the other *Festuca* species, fungal structures were visible in 52–56% of the roots examined (Fig. 3.16).

The highest colonisation of endophytic fungal structures was found in the roots of the annual species *L. temulentum* (94%) and *L. multiflorum* (84%), in contrast to the perennial *L. perenne* plants (48%). The frequency of fungal colonisation in the *L. perenne* × *F. gigantea* hybrids was the same as in the parent species.

Diversity and distribution of endophytic fungi in F. gigantea and related species

Endophytic fungi isolates were grown on PDA medium. A total of $N = 200$ – 250 root fragments were evaluated for each species, with 8–10 plantings. No colony growth was detected in control Petri dishes with 200 μ L of final root wash water. This shows that the root surface was sterile, and the fungi growing on the medium originated from the internal tissues of the roots.

The taxonomic assignment of the species was based on the colony morphology and mycelial cytomorphology (Appendix S1), and it was taxonomically confirmed by way of a comparison with the DNA sequence data of the ITS, *RPB2*, *SSU* and *TEF1-a* regions within the range of 98–100% using the BLAST tool (Table S1).

From the *F. gigantea* and related *Festuca* and *Lolium* species as well as the *L. perenne* $\times$ *F. gigantea* hybrids, 60 colonies of endophytic fungi attributed to 21 taxa were isolated (Fig. 3.17–3.19, Table S1). Of these, 18 species were representatives of the Ascomycota division (Fig. 3.17 and 3.23). Two species of Basidiomycota, *Coprinellus disseminatus* and *Sistotrema brinkmannii*, were only isolated from the roots of *F. gigantea* (Fig. 3.18 and 3.20). Of the *Festuca* plant group studied, *F. gigantea* had the highest fungal diversity, with six fungal species isolated (IF = 29%), while Basidiomycota fungi accounted for one-third of the species (Fig. 3.20). *Mucor circinelloides*, which belongs to the Mucoromycota division, was isolated from the roots of *L. multiflorum* (Fig. 3.18 and 3.20).

Of the *Lolium* species studied, the annual *L. multiflorum* had the highest fungal diversity. In this case, nine taxa were isolated, IF = 43% (Fig. 3.20). Meanwhile, *L. temulentum* and the *L. perenne* $\times$ *F. gigantea* hybrids had a lower rate of fungal diversity, with five and four taxa, respectively (IF = 24% and IF = 19%). The lowest diversity was observed in *L. perenne*, *F. arundinacea* and *F. pratensis* plants. Only one or two species of endophytic fungi were identified in these species, producing one or two colonies each (Fig. 3.20).

The species of endophytic fungi are presented hierarchically in Table S2 according to isolation frequency (IF, %). The most common species was *Microdochium bolleyi*, which was detected in five of the seven species – 12 isolates were obtained (IF = 20%; Fig. 3.20). Another widespread species was *Alternaria alternata* – nine colonies were isolated (IF = 15%; Fig. 3.20). Both *M. bolleyi* and *A. alternata* were most commonly isolated from *L. multiflorum*, each with seven isolates obtained, IF = 12% for each (Fig. 3.20). The largest number of isolates (27) was obtained from *L. multiflorum*, followed by *L. temulentum* with 15 isolates, IF = 45% and IF = 25%, respectively (Fig. 3.20). These results confirm the data from our cytological analysis showing a high

frequency of endophytic fungal colonisation in the roots of these two annual species (Fig. 3.16). Seven colonies each were isolated in *F. gigantea* and the *L. perenne* × *F. gigantea* hybrids. When comparing the root endophytes of *L. perenne* and *F. gigantea* with their *L. perenne* × *F. gigantea* hybrids, no correspondence between fungal taxa was found, i.e. the distribution of endophyte species was different.

Our study showed that *F. gigantea* and other *Festuca* and *Lolium* species as well as *L. perenne* × *F. gigantea* hybrids serve as hosts to various endophytic fungi. The roots of these plants are colonised by endophytic fungi from different fungal divisions. The largest number of species belonged to the Ascomycota phylum, where the most common species were *A. alternata* and *M. bolleyi*. *F. gigantea* stood out from other species for having the highest fungal diversity compared to other perennial *Festuca/Lolium* species. Furthermore, as many as a third of the fungal species identified in the roots of *F. gigantea* were Basidiomycota. The annual *L. multiflorum* and *L. temulentum* species stood out for having a large number of fungal species and isolates.

Diversity and distribution of endophytic bacteria in F. gigantea and related species

From the root fragments of *F. gigantea* and related *Festuca* and *Lolium* species and the *L. perenne* × *F. gigantea* hybrids ($N = 100$), 59 isolates were grown on LB medium and identified as 26 bacterial taxa. Their assignment was confirmed by the BLAST results of 16S rDNA sequences (Table S3). The 16S DNA sequences of bacterial isolates obtained were deposited in the GenBank (Table S4). No bacterial colony growth was detected in control Petri dishes with 200 µL of final root wash water. This shows that the root surface was sterile, and the bacteria growing on the medium originated from the internal tissues of the roots.

The genera of endophytic bacteria are presented hierarchically in Table S2 according to isolation frequency (IF, %). During the study, seven bacterial taxa each were isolated from the roots of *F. gigantea*, *F. pratensis* and *L. temulentum*, with seven (12%), eight (14%) and 12 (20%) isolates, respectively. It was found that *F. arundinacea* had the highest bacterial diversity – nine species and 18 isolates (31%) were taxonomically confirmed (Fig. 3.21). The fewest bacterial taxa were isolated from the roots of *L. multiflorum*, *L. perenne* × *F. gigantea* and *L. perenne*, with four, four and three taxa, respectively (Fig. 3.21). When comparing endophytic bacteria from the *F. gigantea* and *L. perenne* roots with those isolated from the *L. perenne*

× *F. gigantea* hybrids, no correspondence between the bacterial taxa was found, i.e. the distribution of endophyte species was different (Fig. 3.21).

After assessing the distribution of bacteria in the roots of the plants studied, it was found that the most common were Gram-positive bacteria of the Bacillota (synonym Firmicutes) phylum (15 species), belonging to the following eight genera: *Bacillus*, *Heyndrickxia*, *Lysinibacillus*, *Niallia*, *Paenibacillus*, *Peribacillus*, *Priestia* and *Robertmurraya* (Fig. 3.21, Table S3). From the Bacillota phylum, the most common were representatives of the genera *Bacillus* (IF = 37%), *Priestia* (IF = 14%) and *Paenibacillus* (IF = 7%).

Another group of bacteria with high colonisation rates was that of Gram-negative bacteria belonging to the Pseudomonadota (synonym Proteobacteria) phylum (nine species). Representatives of eight genera have been identified in this phylum – *Achromobacter* (Burkholderiales), *Kosakonia* (Enterobacterales), *Novosphingobium* (Sphingomonadales), *Pantoea* (Enterobacterales), *Pseudomonas* (Pseudomonadales), *Sphingomonas* (Sphingomonadales), *Stenotrophomonas* (Lysobacterales) and *Variovorax* (Burkholderiales) (Fig. 3.21). From the Pseudomonadota phylum, *Kosakonia* and *Pseudomonas* bacteria were most commonly isolated, with IF = 8% and IF = 7%, respectively (Fig. 3.21). Strains from Actinomycetota and Bacteroidota/Chlorobiota were rare, with one species isolated each; two isolates of *Actinoallomurus* sp. (Streptosporangiales) and one isolate of *Pedobacter* sp. (Sphingobacteriales) were obtained, respectively (Fig. 3.21).

Abundance and taxa richness of endophytes in F. gigantea and related species

Calculations were performed of the diversity and taxa richness of endophytic fungi and bacteria in different host plants. The results obtained show that *F. gigantea* had the highest endophyte richness indices, with D = 2.57 for fungi and D = 3.08 for bacteria (Table 3.8). Another species that stood out for having high endophytic fungal species richness was the annual *L. multiflorum*, D = 2.43. The analysis revealed that *F. gigantea*, *F. arundinacea*, *F. pratensis* and *L. temulentum* had higher endophytic bacterial species richness (D > 2) than *L. perenne*, *L. perenne* × *F. gigantea* and *L. multiflorum* (D < 2; Table 3.8).

It can be argued that the perennial polyploid species *F. gigantea* and *F. arundinacea* are characterised by a higher diversity and abundance of endophytes than the related diploid species *F. pratensis* and *L. perenne*. In terms of their microbial abundance and diversity, the annual *Lolium* species

significantly outperformed the perennial diploid species *F. pratensis* and *L. perenne* as well as the *L. perenne* × *F. gigantea* hybrids.

Effect of endophytic fungi inoculation on L. multiflorum plant growth

To determine the effect of endophytic fungi on the growth of Italian ryegrass, endophytic fungal isolates from *Festuca* and *Lolium* roots were selected for seed inoculation: *Cadophora fastigiata* (BSG003), *Paraphoma fimeti* (BSG010) and *Plectosphaerella cucumerina* (BSG006).

In assessing the abundance of fungi in the roots seven days after inoculation, it was found that, in different inoculation variants, the frequency of endophytic fungi in the roots of *L. multiflorum* seedlings increased from 94% to 96%, while in the seedlings of the control group, the frequency of endophytes reached 84% (Fig. 3.22). Furthermore, when assessing the abundance of endophytic fungi in the samples, it was observed that the abundance of all inoculants, in 21–30% of the field number, increased more than twofold. This accounted for 32–48% of the root samples. However, the abundance of *P. cucumerina* in the roots of *L. multiflorum* seedlings was close to that of the control group of plants at 20% and 14% of the samples, respectively (Fig. 3.22). These results indicate that inoculation with endophytic fungal spore suspensions increased the abundance of endophytes in the roots of Italian ryegrass.

To assess the effect of endophytic fungal inoculation, Italian ryegrass seeds were inoculated, and the resulting plants were grown for 63 days in a greenhouse in a cylinder elements system filled with a mixture of sterile peat and compost substrate (Fig. 3.23 A–D).

Germinated seed counts showed that inoculation with different endophytic fungal spore suspensions and their mixture increased *L. multiflorum* seed germination from 78% to 82% in all the inoculated plant groups, while seed germination in the control group reached 68%. The measurements performed showed that seed inoculation increased the shoot height of Italian ryegrass by ~10% in all plant groups, but it did not have a significant effect on the root length (Fig. 3.24 A). Shoot counts showed that inoculation did not significantly affect the total number of stems in different inoculation variants (Fig. 3.24 C), but it had a significant effect on the increase in the number of budding shoots in all the groups of inoculated plants. These results indicate that inoculated plants developed faster and transitioned more quickly from vegetative growth to the flowering phase.

After weighing the shoots and roots, it was found that, in all cases of inoculation, endophytic fungi had a strong stimulating effect on the biomass

of Italian ryegrass shoots and roots. *C. fastigiata* and *P. fimeti* increased the fresh and dry shoot biomass of the plants by 20% and 26%, respectively, while *P. cucumerina* increased it by 11% (Fig. 3.24 B). This shows that *P. cucumerina* had the least stimulating effect on the shoot biomass of Italian ryegrass compared to the other inoculation variants.

Summarising the obtained data, it can be argued that all of the endophytic fungal inoculation variants significantly stimulated the growth of *L. multiflorum* roots. Compared to the plants in the control group, a 20–30% increase in plants root dry weight was observed (Fig. 3.24 D). Although inoculation with a mixture of three endophytic fungal spores also had a plant growth-promoting effect, the effect of individual isolates was superior (Fig. 3.24 A–D).

DISCUSSION

Investigation of the allopolyploid origin of Festuca gigantea using the GISH technique: Possible relationships with diploid Lolium and Festuca species

Studies show that *Festuca* and *Lolium* species are closely related and, therefore, can interbreed, creating intergeneric hybrids with different ploidy (Kosmala et al., 2006; Zwierzykowski et al., 1998). Although these genera are close, they have enough genomic sequence divergence that the parental genomes of the intergeneric hybrids can be distinguished with the GISH technique (Kopecký et al., 2008; Kosmala et al., 2006; Zwierzykowski et al., 1998). The GISH technique has already been used to determine the genome components of *Festulolium* hybrids (Kopecký et al., 2006; 2008; Morgan et al., 1988) and the natural hexaploid *F. arundinacea* (Kopecký et al., 2010; Pašakinskienė et al., 1997, 1998), but knowledge about the genomic composition of another natural allohexaploid, *F. gigantea*, is still very limited. The rDNA ITS region sequence studies conducted by Hand et al. (2010) show that the diploid species *Lolium perenne*, *L. multiflorum*, *L. temulentum* and *F. pratensis* and the hexaploid *F. gigantea* are closely related and belongs to *Schedonorus* group.

Differential staining of chromosomes made it possible to separate the chromosome sets of the *F. gigantea* genome and the individual key components of its genome originating from diploid *Lolium* and *Festuca* species. Our study showed that the giant fescue genome is two-thirds composed of diploid *L. perenne*, *L. multiflorum* or *L. temulentum* and *F. pratensis* subgenomes, which are a certain of novel variants. We first demonstrated their affinity by crossbreeding diploid *Lolium* species (mother plant) with *F. gigantea* (father plant), thus creating tetraploid *Lolium* spp. × *F. gigantea* hybrids. Therefore, have no doubt that these species are mutually compatible and related, as the hybrids created were viable. A number of such experiments demonstrating the affinity of *Lolium* and *Festuca* species and their ability to easily crossbreed were conducted. They are presented in the review by Zwierzykowski (1996).

During GISH analysis using different diploid *L. perenne*, *L. multiflorum*, *L. temulentum* and *F. pratensis* shared gDNA probes, a set of 28 chromosomes was labelled out of 42 *F. gigantea* chromosomes. The chromosomes had an intense and average uniform hybridisation signal. They were easily distinguishable from the other 14 chromosomes that did not have a hybridisation signal. Hence, one of the three *Lolium* species (most likely *L. multiflorum*) and *F. pratensis* participated in the formation of the giant

fescue genome. No reshuffling (recombination) of the *Lolium* and *Festuca* genomes was observed in the *L. perenne* × *F. gigantea* F1 hybrids that we created. The gDNA signal was uniform across all of the chromosomes. As expected, the giant fescue genome dominated and accounted for three-fourths of the hybrid genome. At the same time, the hybrids were closer to the *F. gigantea* parent species in terms of morphological characteristics. However, the research conducted by Zwierzykowski et al. (2006) shows that, in *Festulolium* hybrids, the *Lolium* genome becomes increasingly dominant with each generation (the number of chromosomes inherited from ryegrass increased), while the fescue genome was displaced (the number of chromosomes decreased). In addition, there was an increase in recombinant chromosomes and chromosome breakpoints, which were more common in the chromosomes inherited from fescue (Zwierzykowski et al., 2006). Similar trends were revealed in Lithuanian *Festulolium* hybrids by Pašakinskienė and Jones (2003), and in Polish hybrids by Zwierzykowski et al. (1991, 1998).

Repeated hybridisation of *F. gigantea* metaphase plates using *L. perenne*, *L. multiflorum* and *F. pratensis* shared gDNA probes showed that the *F. pratensis* gDNA probe hybridises to the same 28 *F. gigantea* chromosomes as the *L. perenne* and *L. multiflorum* gDNA probes. This shows that the set of 28 chromosomes is a certain type of novel *F. gigantea* chromosomal variant composed of the subgenomes *L. perenne*, *L. multiflorum*, *L. temulentum* and *F. pratensis*. The research conducted by Humphreys et al. (1995) analysing the genome components of tall fescue (*F. arundinacea*) revealed that *F. glaucescens* and *F. pratensis* participated in the formation of the genome of this natural allohexaploid hybrid ($2n = 6x = 42$). *F. glaucescens* comprised two-thirds and *F. pratensis* comprised one-third of the tall fescue genome. Later, Pašakinskienė et al. (1997) proved that *L. multiflorum* also participated in the formation of the tall fescue genome: its genomic DNA cross-hybridised and painted 14 chromosomes, which were inherited from *F. pratensis*. Hence, the degree of genome homology between the ancestor species of giant fescue, *Lolium* spp. and *F. pratensis*, is quite high, which indicates that they are closely related and evolutionarily close, and that, in terms of evolution, the divergence of the species occurred not so long ago.

Summarising the GISH results obtained, it was determined that *F. gigantea* is derived from a *Lolium* ancestor species (*L. perenne*, *L. multiflorum* or *L. temulentum*), which together with *F. pratensis* constitutes two-thirds of its genome (28 chromosomes out of 42). This proves the allopolyploid origin of giant fescue, but these results only partially fill the gap in its genome composition. Therefore, further studies are needed to help reveal

another component of its genome composition. This parent species, which participated in the origin of giant fescue, should grow in the same forest habitats as *F. gigantea* and be close to giant fescue in terms of morphological characteristics.

Features of the distribution of specific chromosomal sequences in F. gigantea, related diploid species and L. perenne × F. gigantea hybrids

Specific regions of chromosomes, such as the centromere, telomere, 5S and 45S rDNA, are composed of tandem repeats (Garcia et al., 2012; Luo et al., 2022; Nagaki et al., 2015; Peska & Garcia, 2020; Zwyrková et al., 2020), which are important elements of the molecular structure of the chromosomes and important for cell division. It is known that plants are characterised by 45S rDNA loci, which are also called secondary constrictions or nucleolus organiser regions (NORs). These regions are fragile because chromosome often breaks (Huang et al., 2012; Pikaard, 1999). Thus, chromosomal recombination can occur through these sites and new combinations can be formed, resulting in increased population diversity. Using the FISH technique, these fragile 45S rDNA regions were observed at high frequency in diploid and polyploid *L. multiflorum* and *L. perenne* mitotic chromosomes (Bustamante et al., 2014; Huang et al., 2009). As a result, more than one 45S rDNA site was observed on the chromosome (Bustamante et al., 2014), while the 5S rDNA region was invariant. Our study observed a stable number of 45S rDNA loci on *F. gigantea* chromosomes, which was consistent with the research conducted by Thomas et al. (1996, 1997), where they examined the number of 5S and 45S rDNA loci and their localisation on chromosomes in *L. perenne* and *F. gigantea*. A similar trend was found in the metaphase chromosomes and interphase nuclei of the intergeneric *L. perenne* × *F. gigantea* hybrids that we created, where, using 5S and 45S rDNA probes, we established that the hybrids inherited half of the rDNA regions from perennial ryegrass, and the other half from giant fescue. The number of these regions did not change, and the location on the chromosome was conservative. Thus, all the rDNA loci of the hybrids were equally transmitted from the parents to the hybrids.

Another important region of plant chromosomes is the centromere. During cell division, it is particularly important for the correct distribution of chromosomes in anaphase (Jannink et al., 1996; Pouokam et al., 2019). Our analysis showed that, in allopolyploid *F. gigantea* and *L. perenne* × *F. gigantea* plants, the number of centromeric probe signals on *F. gigantea* mitotic chromosomes was stable. While, in hybrids, it varied from 21 to 28, depending

on the centromeric RT probe used. In interphase nuclei, the centromeric probe hybridisation signals clustered, resulting in a lower number of centromeric signals being observed. In the mitotic chromosomes of the *Lolium* and *F. pratensis* species, RT probe hybridisation was observed in the centromeric regions of all the chromosomes, and in interphase nuclei, the signals clustered into groups sometimes. Studies have shown that chromosomes in interphase nuclei are topologically organised into different territories, thus preventing the entanglement of DNA molecules (Pouokam et al., 2019); this is evidenced by the lower number of centromere signals.

Previous studies have shown that pericentromeric heterochromatin in the chromosome arms constrains the genome and helps maintain chromosome territoriality and stability (Mizuguchi et al., 2015), while centromere-specific satellite sequences (Jiang et al., 2003) ensure a compact chromatin structure (Neumann et al., 2011). Satellite sequences are associated with heterochromatin, which is located in the pericentromeric parts of chromosomes (Ambrožová et al., 2011), and retrotransposons often co-localise with satellite sequences (Neumann et al., 2011). In addition, plants commonly contain the retrotransposons of Ty3/gypsy origin (Ambrožová et al., 2011; Neumann et al., 2011). Our experiment used the Fesreba sequence, which belongs to a retrotransposon of Ty3/gypsy origin. Therefore, the RT probes hybridised in the centromeric and pericentromeric regions in the *Festuca* and *Lolium* species. The result confirms that the *Festuca* and *Lolium* species are characterised by retrotransposon sequences of Ty3/gypsy origin in their centromeric regions.

When performing the hybridisation of the Fesreba sequence (*L. perenne* and *L. multiflorum* RT probes) and the *L. perenne* shared gDNA probe in the metaphase plates of the *L. perenne* × *F. gigantea* F1 hybrids that we created, an unusual and interesting result was obtained when using probe combinations. During primary hybridisation with the Fesreba RT probe, a Fesreba hybridisation signal was observed along the entire length of seven chromosomes, while a normal local centromeric signal was observed in the other 21 chromosomes. Repeated hybridisation revealed that the Fesreba sequence hybridises on the seven chromosomes of the hybrid inherited from the *L. perenne* parent species. In the study by Zwyrtková et al. (2020), no spread of the Fesreba sequence was observed on specific chromosomes of tetraploid *Lolium* and *Festuca* species. Presumably, this is related to a genome rearrangement that occurred in our *L. perenne* × *F. gigantea* F1 hybrids when the centromeric Fesreba RT sequence spread throughout the entire perennial ryegrass genome (seven chromosomes) in the hybrids.

By observing the arrangement of centromeres and telomeres in interphase nuclei, we determined that ryegrass and fescue along with their hybrids have a classic Rabl configuration, where the centromeres and telomeres in interphase nuclei are aligned at opposite sides of the nucleus. A review by Tiang et al. (2012) argues that this configuration is a remnant of a preceding anaphase. This arrangement of centromeres and telomeres is characteristic of many plants with a larger genome size. The classic Rabl configuration has been found in the mitotic cells of plants of agricultural importance, such as wheat (Dong & Jiang, 1998; Shaw et al., 2002), rye, barley, oats (Dong & Jiang, 1998), beans and peas (Rawlins et al., 1991). It was found that sorghum centromeres and telomeres mix in the interphase nuclear region and are not characterised by a Rabl configuration, while maize has an intermediate configuration (between Rabl and non-Rabl). An interesting trend was observed in rice, where the Rabl configuration was only seen in xylem cells after DNA replication without cell division had occurred (endoreduplication) (Dong & Jiang, 1998; Santos & Shaw, 2004). According to our data, this configuration has not yet been documented by other authors in the somatic cells of the *Lolium* and *Festuca* species.

The telomeres at the ends of plant chromosomes are an important element of the chromosome structure, and the FISH technique can be used to identify the various structural rearrangements that occurred over the course of evolution in allopolyploid species. Using an *Arabidopsis*-type telomeric sequence probe in *F. pratensis*, *L. perenne*, *L. multiflorum* and *L. temulentum*, we found that these telomeric sequences are at the ends of all chromosomes. Majka et al. (2018) also found that an *Arabidopsis*-type telomeric sequence is characteristic of chromosomes in *Lolium* and *Festuca* plants. Our analysis revealed that, in allopolyploid *F. gigantea* and *L. perenne* $\times$ *F. gigantea* hybrids, telomeric sequences are characteristic not only in the usual locations on chromosomes (at their ends), but also in the inner part of the chromosome arms (interstitial telomeric repeats, ITRs), which were also found by Majka et al. (2018) in *F. pratensis* $\times$ *L. perenne* F2–F9 hybrids. They examined the relationship between ITR regions and the genomic rearrangements that occurred in the metaphase chromosomes of these hybrids. Hence, in the natural hybrid *F. gigantea* and the *L. perenne* $\times$ *F. gigantea* hybrids that we created, ITRs may also contribute to genome instability and influence karyotype rearrangement. It is likely that ITR sequences in allopolyploids arise as a result of DNA strand break repaired, when, in crossbreeding different species, the recombination of homeologous chromosomes occurs through chromosome end joining or as a result of inversions and translocations

(Majka et al., 2018; Maravilla et al., 2021). To the best of our knowledge, ITR sequences have not yet been identified in *F. gigantea* by any other authors.

In summary, the chromosomes of the *L. perenne* × *F. gigantea* hybrids contain five 5S and 45S rDNA regions each, including four 5S and two 45S from giant fescue, and one 5S and three 45S rDNA from perennial ryegrass. Therefore, their number is stable in these hybrids. Furthermore, the analysis of telomeric sequences showed that the allopolyploid species that we studied have characteristic ITR regions. It was found that *F. gigantea* and its parent species as well as the *L. perenne* × *F. gigantea* hybrids have the Rab1 configuration. For studying genome rearrangements in allopolyploid species, the following chromosomal structural elements are important: interstitial regions, which are more mobile than centromeres (Tiang et al., 2012), and the 45S rDNA region, which is characterised by a higher recombination frequency due to its fragility (Huang et al., 2012; Lideikytė et al., 2006; Pikaard, 1999). The dynamics of these chromosomal structural elements in interphase nuclei have not been fully ascertained. More detailed studies are needed to help understand the changes in specific DNA sequences in tetraploid *Festulolium* hybrids following the genome rearrangements that occur when crossbreeding *Lolium* spp. and *F. gigantea*.

Endophytic species diversity and distribution in the roots of F. gigantea and related species

Many studies suggest that grass roots are habitats for endophytic fungi (Addy et al., 2005; Hardoim et al., 2015; Knapp et al., 2019; Mandyam et al., 2010; Porras-Alfaro et al., 2008; Wearn et al., 2012), and that their fundamental role is to positively influence the growth and survival of host plants (Mandyam et al., 2010; Porras-Alfaro et al., 2008). Studies show that the endophytic fungi *Acremonium* and *Epichloë/Neotyphodium* are common in the seeds and leaves of the *Festuca* and *Lolium* species (Christensen et al., 1993; Leuchtman, 1994; Schardl, 2009; White et al., 1985). Meanwhile, data on *F. gigantea* root endophytes are limited to a brief report in which the structures of fungal hyphae were microscopically evaluated, but species descriptions were not provided (Popkova & Blagoveshchenskaya, 2019). Of the species we studied, *F. arundinacea* is still the only one where endophytic bacteria have been isolated and taxonomically identified from its roots (de los Santos et al., 2016).

In this study, we isolated 21 fungal species (60 isolates), mainly from the Ascomycota division – 18 species and two Basidiomycota species – *Coprinellus disseminatus* and *Sistotrema brinkmannii* – were exclusively isolated from giant fescue roots. Another fungal species was taxonomically

assigned to the Mucoromycota division. These data are consistent with previous studies showing the dominance of Ascomycota representatives among fungal endophytes, which are usually symbionts and saprophytes of plant roots (Przemieniecki et al., 2019; Rashmi et al., 2019; Sánchez Márquez et al., 2007; Toju et al., 2013, 2019), and account for approximately 90% of the community, while Basidiomycota representatives constitute a minor component (Rashmi et al., 2019; Sánchez Márquez et al., 2007; Toju et al., 2013, 2019). Meanwhile, this proportion was different in *F. gigantea* roots – one-third was made up of Basidiomycota species, i.e. two of the six identified. This can be explained by the fact that *F. gigantea* grows in forest habitats where Basidiomycota representatives are likely to be found.

In our study, the isolation of *C. disseminatus* (Agaricales) from *F. gigantea* roots was quite unexpected, as *C. disseminatus* is not normally found as an endophyte, even though it has been found forming mycorrhizal structures on the tropical forest floor, thereby facilitating orchid germination and seedling formation (Gao et al., 2022a; Yagame et al., 2018). In herbaceous plants, this endophyte has been isolated from the leaves of *Phleum pratense* (Przemieniecki et al., 2019) and *Holcus lanatus* (Sánchez Márquez et al., 2010) as well as from the stems and other parts of tropical trees (de Errasti et al., 2010; Martin et al., 2015).

Sistotrema brinkmannii (Cantharellales) is also not a typical endophyte in herbaceous plants. It is a wood-decay fungus that is widespread on the bark of trees and is also found in soil (Hallenberg, 1991; Potvin et al., 2012). It has been isolated from decayed roots of *Pinus sylvestris* (Menkis et al., 2006) and *P. contorta* wood (Son et al., 2011), and it was also found in the healthy leaves of *Ipomea* (Steiner et al., 2006). Given the widespread colonisation of *C. disseminatus* and *S. brinkmannii* (Hallenberg, 1991), it seems that the presence of these endophytes in the roots of forest herbaceous plants is quite possible.

Cordyceps fumosorosea was only isolated from the roots of the annual weed *L. temulentum* (five isolates). Even though *Cordyceps* species are usually known as parasites that live in insect larvae (Lei et al., 2021; Nikoh & Fukatsu, 2000), some species have also been isolated from plant tissues (Vega, 2018). It should be noted that the horizontal transmission of endophytic fungi between insects and plants is a well-known phenomenon (Raman & Suryanarayanan, 2017). Given that *L. temulentum* grows in various disturbed ecological niches that are rich in organic compost, which attracts a wide range of insects and their larvae, the presence of *C. fumosorosea* in these niches seems very possible. It is known that plant endophytes can be transmitted

vertically (directly from parents via seeds) or horizontally (from the surrounding environment; Baron & Rigobelo, 2022; Bastías et al., 2022; War et al., 2023). Detailed studies are needed to understand the origin of root endophytes in *Festuca* and *Lolium* species.

The most common root endophytic fungus was *Microdochium bolleyi*, found in five of the seven plant species, IF = 20%. Another widely detected fungus was *Alternaria alternata* (IF = 15%), with a particular abundance in *L. multiflorum* (seven isolates). Both *M. bolleyi* (David et al., 2016; Gao et al., 2022b; Przemieniecki et al., 2019; Wirsal et al., 2001) and *A. alternata* (Pereira et al., 2019; Przemieniecki et al., 2019; Rashmi et al., 2019; Thomma, 2003) are classified as generalist plant endophytes and are widely distributed in various plant species.

In the present study, when comparing the colonisation of endophytes in various plant species, the forest herbaceous plant *F. gigantea* exhibited the highest fungal diversity among perennial species. Other species that stood out for high fungal diversity were the annual *L. multiflorum* and *L. temulentum*, with nine and five taxa, respectively. It should be emphasised that this coincided with the highest number of fungal structures observed in root tissues microscopically (trypan blue staining). The higher colonisation rates of fungi in annual *Lolium* plants suggests a potential benefit of endophytes to hosts. It is likely that the abundance of endophytic fungi in roots has a positive effect on the absorption of nutrients, supporting the rapid growth of these short-lived plants during the short season.

In contrast, the open-grassland perennial species *F. pratensis*, *F. arundinacea* and *L. perenne* had the lowest fungal diversity. This indicates that the habitat type is important in the formation of fungal endophyte communities. It should be emphasised that forest habitats are more favourable for the establishment of various endophytic fungi than open-grassland.

In this study, we also isolated 26 bacterial taxa (59 isolates) belonging to four bacterial divisions. The most prevalent were Gram-positive bacteria from the Bacillota (synonym Firmicutes) phylum, accounting for 58% of the isolated bacterial cultures belonging to 15 taxa. Of these, four taxa were isolated from the roots of *F. gigantea*, namely *Bacillus pumilus*, *B. subtilis*, *Lysinibacillus boronitolerans* and *Priestia megaterium*. The bacteria of the genus *Bacillus* were the most prevalent, with five taxa taxonomically confirmed, accounting for 38% of all isolates, and found in all *Lolium* and *Festuca* species (except hybrids). *Bacillus* bacteria are widely distributed in the natural environment and exhibit broad host diversity. They decompose organic matter, promote plant growth and inhibit pathogenic organisms

(Mandic-Mulec et al., 2015; Tsotetsi et al., 2022). Li et al. (2022) infected *Arabidopsis thaliana* plants with a *P. megaterium* strain, thus demonstrating the ability of this species to promote plant growth by increasing the expression of defence-related genes and salicylic acid accumulation.

Another dominant group was Gram-negative bacteria from the Pseudomonadota phylum, which accounted for 35% of the bacterial isolates, belonging to nine taxa. Among these, *Kosaconia cowanii* was isolated from the roots of *F. gigantea* and *Lolium temulentum*. The representatives of this phylum have various functions that affect plant survival. For example, *Stenotrophomonas maltophilia* (Xanthomonadales) is frequently found in agricultural plants and is known for its plant growth-promoting properties (Alexander et al., 2019) and anti-fungal effects against cereal pathogens (Sharma et al., 2014). Meanwhile, *Pseudomonas oryzae* (Pseudomonadales) is a soil bacterium that survives in the damp, silty environment typical of rice fields (Kodama et al., 1985).

In our study, the highest bacterial diversity was found in pasture *F. arundinacea* plants, where nine species (18 isolates) were found, followed by *L. temulentum* with seven species (12 isolates). One of the factors contributing to the higher number of bacterial endophytes rather than fungal endophytes may be the dry soil characteristics in pastures compared to the damp underbrush soil that is typical of *F. gigantea* habitats. Furthermore, certain plant species may be particularly favourable to various endophytes and may benefit from this interaction, which positively affects their growth and stress tolerance. Przemieniecki et al. (2019) previously demonstrated the importance of plant host specificity by comparing the abundance of fungal endophytes in the leaves of *Phleum pratense* and *L. perenne*. In our study, the results obtained from roots are consistent with the results that Przemieniecki et al. (2019) obtained from leaves. The results demonstrated that, among the herbaceous plants used in agricultural grasslands, *L. perenne* stands out for its particularly low abundance of endophytes.

In the comparison of the hybrids and parent species, the absence of endophyte matching between the *L. perenne* × *F. gigantea* hybrids and their parent species suggests that endophyte establishment in plants is influenced by complex host-microbe interactions rather than simple genetic inheritance. On the other hand, the natural hybrid species *F. gigantea* and *F. arundinacea* exhibited higher microbial diversity compared to their diploid relatives *F. pratensis* and *L. perenne*, suggesting a possible link between hybrid genome complexity and higher root microbiota diversity.

The representatives of the Burkholderiales order of bacteria and the fungal *Chaetomium* spp. and *Alternaria* spp. are among the most common keystone taxa in meadow, forest and agricultural ecosystems (Banerjee et al., 2018). We found two representatives of the Burkholderiales order in the roots of herbaceous plants – *Achronobacter spanius* and *Variovorax* sp. In addition, we found *Pedobacter alluvionis* – a representative of the Sphingobacteriales order – in the roots of giant fescue. The representatives of this order are also classified as core forest and meadow taxa (Banerjee et al., 2018). Therefore, although the diversity of the endophytes we identified is relatively low compared to the research data of Banerjee and co-authors (2018), the results obtained confirm that important keystone representatives of microorganism's communities are established in the roots of *Festuca* and *Lolium* species.

Our study shows that *Festuca* and *Lolium* roots are the habitat of many root endophytes, fungi and bacteria, which fills a research gap on *Festuca* spp. and *Lolium* spp. Further studies involving *Festuca* and *Lolium* species in different habitats could demonstrate the differences in the endophyte assemblages of these herbaceous plants and reveal different functional roles of endophyte coexistence.

Growth-promoting effects of endophytic fungal inoculation on the growth of L. multiflorum

Studies show that almost all plants serve as hosts to endophytic fungi (Baron & Rigobelo, 2022); their importance for plant communities became apparent when their plant growth-promoting effect was demonstrated (de Santiago et al., 2009; Hiruma et al., 2016; Vergara et al., 2017, 2018, 2019). Unfortunately, the number of studies on the growth-promoting effects of fungi on *L. multiflorum* is limited. To date, growth-promoting effects have been demonstrated after the inoculation of Italian ryegrass with *Trichoderma harzianum* (Bancaj et al., 2021), *Xerocomus badius* and *Serendipita indica* (Liu et al., 2019).

Studies have shown growth-promoting effects on *Betula pendula*, *Eucalyptus globulus*, *L. perenne* (Berthelot et al., 2016, 2018) and tomatoes (Yakti et al., 2018) after *Cadophora* sp. inoculation. However, the plant growth-promoting effect of *Plectosphaerella cucumerina* and *Paraphoma fimeti* inoculation has not yet been studied. Our study showed that *Cadophora fastigiata*, *P. fimeti* and *P. cucumerina* inoculums promote root and shoot growth in Italian ryegrass. An observation was also made that shoot biomass growth and vegetation rate depended on the fungal species used.

Our study showed that *C. fastigiata* inoculation significantly promotes root growth in Italian ryegrass (25% increase). Berthelot et al. (2016) also revealed that endophytic fungi, in this case *Cadophora* sp., have a stimulating effect on the growth of *L. perenne* – they increase root dry weight; however, there was no statistically significant increase in shoot mass. The studies that have been conducted to date demonstrate that *C. fastigiata* is a root endophyte in herbaceous and woody species (Knapp et al., 2012). Furthermore, *Cadophora* species grow on wood and tree roots as well as in the soil (Bien & Damm, 2020; Schol-Schwarz, 1970; Gramaje et al., 2011; Maciá-Vicente et al., 2020; Sánchez, Márquez et al., 2011; Travadon et al., 2015).

It should be noted that both our study and other studies of herbaceous plants have found the positive effect of fungal inoculation to be greater on root growth than on shoot growth. This is confirmed by an experiment where, when *L. perenne* plants were subjected to drought stress using endophytic bacterial inoculants and their mixture (isolates obtained from poplar and willow), the increment in root growth of perennial ryegrass exceeded the increase in shoot biomass (60% and 48%, respectively; Khan et al., 2012).

Plectosphaerella cucumerina is a soil fungus, a decomposer of plant organic matter, and a common root pathogen that causes root rot infections, while also being prevalent in various plant species (Carlucci et al., 2012; Giraldo & Crous, 2019; Uecker, 1993). This fungus causes pathogenic effects on tomatoes, peppers, asparagus, cabbage, potatoes and many cucurbits (Carlucci et al., 2012; Uecker, 1993). However, there is no evidence to date that *P. cucumerina* can act as a pathogen for Poaceae species or promote plant growth. Several studies suggest that *P. cucumerina* may act as a biological control agent. For example, *P. cucumerina* has shown nematophagic activity against potato cyst nematodes (Atkins et al., 2002, 2003). It has also been found to be effective in controlling *Cirsium arvense* weeds (Bailey et al., 2017). In our study, *P. cucumerina* spore inoculation showed a significant growth-promoting effect on the roots (20% increment) and shoots (10% increment) of Italian ryegrass. In summary, it can be argued that our study was the first to reveal the plant growth-promoting effect of *P. cucumerina* inoculation.

Previous studies have shown that *Paraphoma fimeti* is a common soil fungus with a diverse type of life, from pathogenic to endophytic, and presents on many plant hosts (Moslemi et al., 2018; Roustaei et al., 2000). Several pathogenic *Paraphoma* species are known to cause root infections in *Compositae* plants (Moslemi et al., 2018). However, the plant growth-promoting effects of this fungus have not been confirmed to date. In our study,

P. fimeti effectively promoted growth in the shoots and roots of Italian ryegrass, with 26% and 30% dry weight increment, respectively.

Our research results add to the knowledge about endophytic fungi as plant growth biostimulants. In the future, this will allow to accelerate the selection of fungal isolates and expand research in order to promote the growth of other agricultural plants.

CONCLUSIONS

1. The two-thirds of the natural *Festuca gigantea* ($2n = 6x = 42$) allopolyploid genome consist of *Lolium multiflorum* or *L. perenne* species; *Lolium* and *F. pratensis* DNA probes overlap regularly on the same 28 *F. gigantea* chromosomes. Therefore, these chromosomes are a certain type of novel variant. The 14 remaining chromosomes originate from a genus other than *Festuca* or *Lolium*, as no DNA hybridisation of the studied species was detected in them.
2. The *L. perenne* $\times$ *F. gigantea* hybrids ($2n = 4x = 28$) are characterised by chromosomal rearrangements: dispersive expansion of the centromeric Fesreba sequence across the *L. perenne* chromosomes and the presence of interstitial telomeric sequences, while the number of 5S and 45S rDNA loci is stable. All of the species and hybrids studied are characterised by a specific arrangement of centromeres and telomeres in interphase nuclei – the Rab1 configuration.
3. The roots of *F. gigantea* and its related *Festuca* and *Lolium* plants are usually colonised by the endophytic fungi of the Ascomycota division. Basidiomycota species were exclusively found in the roots of *F. gigantea* plants.
4. The forest plant *F. gigantea* is characterised by a higher diversity of fungal root endophytes than the open-grassland *Festuca* and *Lolium* species. *F. arundinacea* exhibits greater bacterial diversity than other perennial *Lolium* and *Festuca* species.
5. Comparing the distribution of endophytes in the parent species *F. gigantea* and *L. perenne* as well as their hybrids, different assemblages of species were identified, which indicates that the ability to form in roots specific relationships with certain endophytes is not an inherited feature.
6. The annual diploid *Lolium* species, *L. multiflorum* and *L. temulentum*, exhibited a significantly higher abundance of root endophytes than the related perennial *Lolium* and *Festuca* species.
7. Inoculation of the endophytic fungi *Cadophora fastigiata*, *Paraphoma fimeti* and *Plectosphaerella cucumerina* promoted the growth of *L. multiflorum*, which was manifested in higher plant biomass, having a greater effect on roots than shoots.

PADĖKA

Pirmiausia, noriu nuoširdžiai padėkoti savo darbo vadovei, prof. hab. dr. Izoldai Pašakinskienei, už pagalbą įveikiant iškilusius iššūkius rengiant disertaciją, dalinantis savo žiniomis, puikiomis įžvalgomis ir vertingais patarimais. Jūsų vadovavimas ir vertingos įžvalgos ne tik sustiprino mano įgūdžius, bet ir įkvėpė siekti išbaigtumo atliekant kiekvieną užduotį.

Taip pat noriu padėkoti Vilniaus universiteto botanikos sodo direktoriui dr. Audriui Skridailai už suteiktą galimybę atlikti mokslinius eksperimentus Vilniaus universiteto botanikos sodo Mokslo programų skyriaus laboratorijoje ir jų finansavimą, paramą ir pagalbą.

Esu dėkinga visiems Vilniaus universiteto botanikos sodo kolegoms už palaikymą, padėšinimą, pagalbą, supratingumą ir už buvimą šalia. Ypač dėkoju Mokslo programų skyriaus esamiems ir buvusiems darbuotojams: Justui Martūnui, Saulei Matijošiūtei, Domantui Palaveniui, Agnei Balčiūtei, Ievai Malinauskaitei, Mariui Rimkevičiui ir kitiems, kurių nepaminėjau, už teigiamą darbo aplinką, bendradarbiavimą ir draugiškumą. Jūsų palaikymas buvo svarbus mano asmeniniame ir profesiniame augime.

Taip pat noriu padėkoti Gamtos tyrimo centro Ekonominės Botanikos laboratorijos vyr. mokslo darbuotojai dr. Kristinai Ložienei už nenutrūkstamą ryšį ir palaikymą. Jūsų dėka pažinau mokslo vertę ir jos galią, padėjote man tobulėti.

Ačiū visiems, artimiesiems ir draugams, už nuoširdų palaikymą, išklausimą ir padėšinimą visu šiuo laikotarpiu. O ypač dėkoju savo dukroms Lėjai, Astrėjai ir Rimgailei. Jūs esate mano gyvenimo gėlės, kurios jį nuspalvina įvairiomis spalvomis, todėl įkvepiate mane siekti tobulumo ir suprasti, kad mažuose dalykuose slypi dideli atradimai.

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

Publikacijos, išspausdintos žurnaluose, turinčiuose cituojamumo rodiklį (IF) ir priklausančiuose *Clarivate Analytics Web of Science* (CA WoS) duomenų bazėms:

1. **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): 799.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms13040799>
Indelis: Conceptualization: V.S. and I.P. Methodology: V.S., I.P. and J.M. Software: V.S. Validation: V.S. and I.P. Formal analysis: V.S., I.P., S.M. and G.Š. Investigation: V.S., S.M. and J.M. Data curation: V.S. Writing-original draft preparation: V.S., I.P., S.M. and G.Š. Writing-review and editing: V.S. and I.P. Visualization: V.S. Supervision: I.P.
2. Pašakinskienė, I., **Stakelienė, V.**, Matijošiūtė, S., Martūnas, J., Rimkevičius, M., Būdienė, J., Aučina, A., & Skridaila, A. (2024). Growth-Promoting Effects of Grass Root-Derived Fungi *Cadophora fastigiata*, *Paraphoma fimeti* and *Plectosphaerella cucumerina* on Spring Barley (*Hordeum vulgare*) and Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum*). *Microorganisms*, 13, 25.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms13010025>
Indelis: Conceptualization, I.P.; methodology, I.P., V.S., and S.M.; software, V.S. and S.M.; validation, I.P., V.S., and S.M.; formal analysis, I.P., V.S., S.M. and J.B.; investigation, I.P., V.S., S.M., J.M., M.R., J.B., A.A. and A.S.; data curation, I.P., V.S., S.M. and J.M., writing-original draft preparation, I.P., V.S., and S.M.; writing-review and editing, I.P., V.S., and S.M.; visualization, V.S., and S.M.; supervision, I.P.
3. 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, 453.
<https://doi.org/10.3390/d16080453>
Indelis: Conceptualization, I.P. and V.S.; methodology, I.P. and V.S.; validation, V.S. and J.M.; formal analysis, I.P., V.S. and J.M.; investigation, V.S., I.P., J.M. and S.M.; data curation, V.S., I.P., J.M. and S.M.; writing-original draft preparation, I.P. and V.S.; writing-review and editing, I.P. and V.S.; visualization, V.S. and I.P.; supervision, I.P.
4. **Stakelienė, V.**, & Pašakinskienė, I. (2022). Fluorescent *in situ* hybridisation in plants: new ways to link DNA sequence resources and

chromosome loci – a review. *Zemdirbyste-Agriculture*, 109: 171–178.
DOI 10.13080/z-a.2022.109.022

Indelis: autorė atliko literatūros analizę ir parašė publikaciją.

Kitos publikacijos, tiesiogiai nesisiejančios su doktorantūros tema, tačiau išspausdintos žurnaluose, turinčiuose IF ir priklausančiuose *Clarivate Analytics Web of Science* (CA WoS) duomenų bazėms:

1. **Stakalienė, V.**, Pašakinskienė, I., Ložienė, K., Ryliškis, D., & Skridaila, A. (2023). Vertical Columns with Sustainable Green Cover: Meadow Plants in Urban Design. *Plants*, 12, 636.
<https://doi.org/10.3390/plants12030636>

KONFERENCIJŲ SĄRAŠAS

Pašakinskienė I., **Stakalienė V.**, & Matijošiūtė S. Diversity and Growth-Promoting Potential of Root Associated Endophytes in *Festuca* and *Lolium* Grasses from Grassland and Forest Ecosystems. International conference „Rhizosphere 6: Rooting for Earth”. Edinburgh, UK, 2025 birželio 15–19. Abstract book, 2025, p. 85.

Stakalienė, V., & Pašakinskienė, I. Growth-promoting effects of three endophytic fungi on Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*). Conference of Life Sciences „The COINS 2025“, Vilnius (Lietuva) 2025 kovo 17–20 d. *Publikuota: International Conference of Life Sciences The COINS 2025. Book of Abstracts*, 2025, 29.

<https://www.thecoins.eu/static/resources/booksofabstracts/COINS2025.pdf>

Malinauskaitė, I., Pašakinskienė, I., & **Stakalienė, V.** Features of centromeric Fesreba sequences across Poaceae species. International Conference of Life Sciences „The COINS 2025“, Vilnius (Lietuva). Kovo 17–20 d. *Publikuota: International Conference of Life Sciences The COINS 2025. Book of Abstracts*, 2025, 187.

<https://www.thecoins.eu/static/resources/booksofabstracts/COINS2025.pdf>

Stakalienė, V., Martūnas, J., Matijošiūtė, S., & Pašakinskienė, I. Endophytic fungi in the roots of *Festuca* and *Lolium* species and their hybrids. International Conference of Life Sciences „The COINS 2024“, Vilnius (Lietuva) 2024 balandžio 15–18 d. *Publikuota: International Conference of Life Sciences The COINS 2024. Book of Abstracts*, 2024, 88.

<https://thecoins.eu/static/resources/booksofabstracts/COINS2024.pdf>

Matijošiūtė, S., **Stakalienė, V.**, Martūnas, J., & Pašakinskienė, I. Identification of endophytic fungi in *Festuca gigantea* and *Lolium perenne* and their hybrids. International Conference of Life Sciences „The COINS 2024“, Vilnius (Lietuva) 2024 balandžio 15–18 d. *Publikuota: International Conference of Life Sciences The COINS 2024. 2024*, 87.

<https://thecoins.eu/static/resources/booksofabstracts/COINS2024.pdf>

Stakalienė, V., Martūnas, J., & Pašakinskienė, I. Identification of root endophyte fungi in *Festuca gigantea*. International Conference of Life Sciences „The COINS 2023“, Vilnius (Lietuva). 2023 balandžio 24–27 d. *Publikuota: International Conference of Life Sciences The COINS 2023. Book of Abstracts*, 2023, 88.

<https://thecoins.eu/static/resources/booksofabstracts/COINS2023.pdf>

Stakelienė, V., & Pašakinskienė, I. Study of intergeneric hybrids between *Lolium perenne* and *Festuca gigantea* aiming to reveal the origin of *F. gigantea*. VIII Baltic Genetics Congress, BGC, Kaunas (Lietuva). 2023 kovo 29–31 d. *Publikuota: Biologija*. 2023, 69(1): 107. https://bgc.vdu.lt/wp-content/uploads/2023/03/Biologija_Biology_VIII-BGC_abstract-book.pdf

GYVENIMO APRAŠYMAS

ORCID ID: 0009-0005-8351-3710

IŠSILAVINIMAS:

- 2020–2024 doktorantūros studijos (Biologija), Vilniaus universitetas, Gyvybės mokslų centras.
- 2018–2019 papildomos studijos (Mokyklos pedagogika), Vilniaus universitetas, Filosofijos fakultetas.
- 2007–2009 magistro studijos (Botanika), Vilniaus universitetas, Gamtos mokslų fakultetas.
- 2003–2007 bakalauro studijos (Biologija), Vilniaus universitetas, Gamtos mokslų fakultetas.

DARBINĖ VEIKLA:

- 2020–dabar Tyrėja, Mokslo programų skyrius, Vilniaus universiteto botanikos sodas.
- 2016–2020 Vyresnioji botaninių kolekcijų kuratorė, Lietuvos floros grupė, Vilniaus universiteto botanikos sodas.
- 2011–2016 Botaninių kolekcijų kuratorė, Lietuvos floros grupė, Vilniaus universiteto botanikos sodas.
- 2009–2010 Laborantė, UAB „Girios“.

PUBLIKACIJOS:

Septyni moksliniai straipsniai žurnaluose, turinčiuose cituojamumo rodiklį *Clarivate Analytics Web of Science* (CA WoS) duomenų bazėse.

Du straipsniai neturintys cituojamumo rodiklio.

KONFERENCIJOS:

Tyrimų rezultatai žodiniiais ir stendiniais pranešimais pristatyti daugiau nei 10 tarptautinių ir respublikinių konferencijų.

DALYVAVIMAS PROJEKTINĖJE VEIKLOJE:

2015–2016 metų „Smeltės valstybinio botaninio draustinio teritorijoje esančių trijų retųjų Lietuvos raudonosios knygos augalų rūšių (*Tripolium pannonicum* (Jacq.), *Glaux maritima* L., *Juncus gerardii* Loisel) išsaugojimo veiksmų programa“ (vykdytoja).

STAŽUOTĖS:

2015 Mokslinė stažuotė augalų parodoje „Green is Life 2015“, Varšuva, Lenkija.

PRANEŠIMŲ ĮVERTINIMAI:

2025 Stendinis pranešimas „Growth-promoting effects of three endophytic fungi on Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*)“ „The COINS 2025“ konferencijoje įvertintas kaip Excellent.

AKADEMINĖ VEIKLA:

2024–2025 Vilniaus universiteto, Gyvybės mokslų centro, Genetikos studijų programos bakalauro baigiamojo darbo konsultantė.

2022–2023 dviejų Vilniaus universiteto, Gyvybės mokslų centro, Genetikos studijų programos bakalauro baigiamųjų darbų konsultantė.

2012 Biologijos studijų programos bakalauro baigiamojo darbo recenzentė.

PRIEDAI

Priedas S1. Endofitinių grybų kolonijų morfologiniai ir micelio citomorfologiniai aprašymai.

Appendix S1. *Morphological and mycelial cytomorphological characteristics of endophytic fungal colonies.*

Skyrius ASCOMYCOTA – aukšliagrybūnai, 3.20 pav.

Alternaria alternata (Fr.) Keissler (1912) 3.20 pav. A1–4.

Alternaria alternata kolonijos PDA terpėje greitai augančios; viršutinei micelio pusei būdingi balto pigmento hifai kolonijos centre, pereinantys į žaliai pilką pigmentą, apatinei pusei būdinga juodą pigmentą turintys kolonijos centriniai hifai, kurie pereina į rudai geltoną ir žaliai pilką pigmentą; kolonijos kraštas šviesiai pilko pigmento, platus; hifai subhialiniai (turintys pigmento), pertvaros melanizuotos; konidijakočiai pavieniai, kartais telkiasi į nedideles grupes; konidijos atvirkščiai kūginės, kiaušiniškos arba elipsės formos, dažnai su kūgišku snapu, pavienės arba susitelkusios akropetalinėmis grandinėėmis (naujos konidijos būna viršuje, o senos lieka grandinės apačioje), turi iki aštuonių skersines ir 1–2 išilgines pertvaras, nuo šviesiai rudos arba nuo aukso rudos iki rudos spalvos, $\sim 8\text{--}50 \times 6\text{--}10 \mu\text{m}$.

Alternaria infectoria E.G. Simmons (1986) 3.20 pav. B1–4.

PDA terpėje kolonija sparčiai auga; viršutinės pusės hifai pilkai balto pigmento, apatinės nuo tamsiai rudo iki šviesiai rudo pigmento; hifai subhialiniai, pertvaros melanizuotos; pirminiai konidijakočiai paprasti, kartais susidaro ilgi, segmentuoti antriniai konidijakočiai; konidijos retos, elipsės arba pailgos kiaušiniškos formos, kartais beveik vamzdiškos, $28\text{--}41 \times 6\text{--}13 \mu\text{m}$ dydžio, su 3–6 skersinėmis ir iki 2 išilginėmis pertvaromis; konidijos grupuojasi po 4–10 akropetalinėmis grandinėėmis.

Alternaria rosae E.G. Simmons & C.F. Hill (2007) 3.20 pav. C1–3.

Kolonijos sparčiai auga; viršutinės pusės centriniai hifai balto pigmento, pereinantys į pilką su tamsiai žaliu atspalviu pigmentą, apatinės pusės centriniai hifai juodai rudi pereinantys į pilkai žalią pigmentą; kolonijos kraštas labai platus, šviesiai pilkas; hifai oriniai, subhialiniai, segmentuoti; konidijos pavienės, kartais telkiasi į trumpas akropetalines grandinėes, kiaušiniškos arba elipsės formos, su kūgišku snapu, 1–3 skersinėmis ir 0–4 išilginėmis pertvaromis, aukso rudo pigmento, $15\text{--}45 \times 8\text{--}10 \mu\text{m}$.

Aureobasidium pullulans (de Bary) G. Arnaud (1918) 3.20 pav. D1–4.

Izoliato kolonijos PDA terpėje sparčiai auga; hifai šviesiai rudo pigmento, pereinantys į šviesiai pilką pigmentą, kolonijai senstant centriniai hifai tampa juodi; hifai dematiški su melanizuotomis pertvaromis; konidijos vienląstės, melanizuotos, dažniausiai elipsės formos, $4-8 \times 4-4,5 \mu\text{m}$.

Bipolaris sorokiniana (Sacc.) Shoemaker (1959) [= *Drechslera sorokiniana* (Sacc.) Subramanian et Jain (1964)] 3.20 pav. E1–4.

Izoliatų kolonijos labai sparčiai auga; PDA terpėje viršutinės kolonijos pusės centriniai hifai šviesiai pilko pigmento, pereinantys į pilką su tamsiai žaliu atspalviu pigmentą, kolonijos kraštas šviesiai pilkas, spinduliškas, apatinės pusės hifai nuo juodai rudo iki rudai žalio pigmento, kolonijos krašte šviesiai pilki, kolonijos kraštas platus, spinduliškas; hifai dematiški; konidijakočiai pavieniai, tiesūs arba truputį lenkti; konidijos elipsės formos, smailėjančiais galais, su pertvaromis, apie $75 \times 19 \mu\text{m}$ dydžio.

Cadophora fastigiata Lagerb. & Melin (1928) [= *Phialophora fastigiata* (Lagerb. & Melin) Conant (1937)] 3.20 pav. F1–5.

Izoliato grybienos viršutinei pusei būdingi hifai turintys rudą ir pilką pigmentą, apatinei – tamsiai rudą ir tamsiai pilką, kolonijos centrui būdingi šviesiai pilką pigmentą turintys hifai, kraštas siauras, lygus, šviesiai pilko pigmento; hifai subhialiniai su pertvaromis; konidijakočiai tiesūs, formuoja galines atšakas, kurios būna sudėtinės arba pavienės; konidiogeninės ląstelės su apykakle; konidijos kiaušiniškos, kartais elipsiškos formos, dematiškos, $3,2-4,2 \times 1,3-1,8 \mu\text{m}$.

Chaetomium funicola Cooke (1872) [= *Dichotomopilus funicola* (Cooke) X.Wei Wang & Samson (2016)] 3.20 pav. G1–4.

Kolonijos viršutinė pusė balta su pilku atspalviu pigmento, apatinės kolonijos pusės centriniai hifai rudo pigmento, jauni hifai šviesiai rudi, kolonijos kraštas dantytas; hifai hialiniai, subhialiniai, segmentuoti; askoma tamsiai ruda, galinės atšakos dichotomiškai išsišakojusios; askosporos rudos, kiaušiniškos, abiejuose galuose šiek tiek smailėjančios, $4,5-6,8 \times 2,9-3,1 \mu\text{m}$.

Cladosporium cladosporioides (Fresen.) G.A. de Vries (1952) [*Hormodendrum cladosporioides* (Fresen.) Sacc. (1880)] 3.20 pav. H1–5.

Cladosporium cladosporioides kolonijos lėtai augančios; PDA terpėje izoliato viršutinė pusė pilkai žalio pigmento, apatinei pusei būdingi pilką pigmentą turintys hifai, abiejose pusėse kraštas siauras, lygus, baltas; hifai

subhialiniai, reti, nešakoti; konidiogeninės ląstelės pailgos; konidijos dematiškos, elipsiškos, $4,3\text{--}6,4 \times 2,1\text{--}2,5 \mu\text{m}$ dydžio.

Cladosporium halotolerans Zalar, de Hoog & Gunde-Cim. (2007) 3.20 pav. I1–5.

Cladosporium halotolerans kolonijos PDA terpėje lėtai augančios; viršutinės pusės hifai nuo šviesiai pilko iki tamsiai pilko pigmento su tamsiai žaliu atspalviu, apatinės pusės – nuo juodos iki tamsiai pilkos su juodos spalvos hifais, kolonijai būdingas siauras, baltas taisyklingas kraštas; hifai subhialiniai, menkai šakoti su hialinėmis pertvaromis; konidijos rutuliškos formos su nusmailėjusiais galais, nelygiu paviršiumi, aukso rudos spalvos, apie $8,3 \times 5,4 \mu\text{m}$ dydžio.

Cordyceps fumosorosea (Wize) Kepler, B. Shrestha & Spatafora (2017) [*Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) A.H.S. Br. & G. Sm. (1957); *Spicaria fumosorosea* (Wize) Vassiljevsky (1929)] 3.20 pav. J1–3.

Kolonijos PDA terpėje greitai augančios; viršutinės pusės hifai balto pigmento, apatinės šviesiai rudo su gelsvu atspalviu, abiejų pusių kolonijos kraštas siauras, lygus, bespalvis; konidijakočiai netaisyklingai šakoti, jų galuose yra kelios konidiogeninės ląstelės su apykakle; konidijos hialinės, kiaušiniškos formos arba pailgos elipsės formos, $2,7\text{--}4,7 \times 1,7\text{--}3,0 \mu\text{m}$.

Didymella macrostoma (Mont.) Qian Chen & L. Cai (2015) [*Phoma macrostoma* Mont. (1849)] 3.20 pav. K1–3.

Didymella macrostoma izoliatai PDA terpėje greitai augančios; kolonijos viršutinei pusei būdingi rudo pigmento hifai ir siauras, lygus, baltas kraštas, apatinės pusės hifai juodo pigmento pereinantys į rudą pigmentą, kolonijos kraštas platus, baltas su pilku atspalviu; hifai subhialiniai, nesegmentuoti; būdingos pavienės, aukso rudo pigmento, daugialąstės chlamidosporos, $27,9\text{--}46,5 \times 9,3\text{--}14 \mu\text{m}$.

Epicoccum nigrum Link (1816) [*Epicoccum vulgare* Corda (1837)] [*Epicoccum versicolor* var. *nigrum* (Link) Rabenh. (1844)] 3.20 pav. L1–4.

Izoliato kolonijos PDA terpėje labai sparčiai augančios; viršutinės pusės jauni hifai turi šviesiai oranžinį pigmentą, pereinantį į šviesiai geltoną, senstant hifams pigmentas tamsėja, apatinės pusės hifai centrinėje kolonijos dalyje turi juodą pigmentą, pereinantį į ryškiai oranžinį, kolonijos kraštui būdingas šviesiai geltonas pigmentas, kraštas plunksniškas; būdingi subhialiniai pseudohifai; blastokonidijos rudos, deformuotos, $\sim 15\text{--}70 \mu\text{m}$; chlamidosporos pavienės, rutuliškos, tamsiai rudos, $\sim 18\text{--}29 \mu\text{m}$.

Hypoxylon rubiginosum (Pers.) Fr. (1849) [*Discosphaera rubiginosa* (Pers.) Dumort. (1822); *Stromatosphaeria rubiginosa* (Pers.) Grev. (1824); *Euhypoxylon rubiginosum* (Pers.) Füsting (1867); *Hypoxylon calyptra* Bat. (1950)] 3.20 pav. M1–3.

Hypoxylon rubiginosum kolonijos sparčiai augančios; viršutinei pusei būdingi hifai turintys oranžinį su ruda atspalviu pigmentą, apatinei – centrinėje dalyje esantys hifai tamsiai rudo pigmento, jauniems hifams būdingas rudas su oranžiniu atspalviu pigmentas; kolonijos kraštas platus, banguotas, šviesiai pilko pigmento; hifai subhialiniai, nesegmentuoti.

Lomentospora sp. Hennebert & B. G. Desai, (1974) 3.20 pav. N1–3.

Kolonijos PDA terpėje labai lėtai augančios, netaisyklingos formos; būdingas šviesiai pilkas pigmentas; hifai hialiniai, subhialiai, nesegmentuoti; konidijakočiai formuoja mažus, bazinius patynimus; konidijos subhialinės, rutuliškos formos, $\sim 3\text{--}4 \times 2\text{--}4 \mu\text{m}$.

Microdochium bolleyi (R. Sprague) de Hoog & Herm.-Nijh. (1977) [*Aureobasidium bolleyi* (R. Sprague) Arx, (1957); *Idriella bolleyi* (R. Sprague) Arx, (1981)] 3.20 pav. O1–4.

Rūšies kolonijos PDA terpėje greitai augančios; būdingas geltono ir oranžinio pigmento atspalvis su balto pigmento kraštu; hifai subhialiniai su pertvaromis; konidogeninės ląstelės ampuliškos arba cilindrinės; konidijos pusemėnuli formos, subhialinės $\sim 6 \times 2 \mu\text{m}$; chlamidosporos formuoja akropetalines grandinėles, $\sim 14 \times 11 \mu\text{m}$.

Paraphoma fimeti (Brunaud) Gruyter, Aveskamp & Verkley (2010) 3.20 pav. P1–3.

Paraphoma fimeti kolonija PDA terpėje lėtai auganti, gausiai sporifikuojanti; viršutinei pusei būdingas žalsvai rudas pigmentas; apatinei juodas–tamsiai pilkas su melsvu atspalviu pigmentas, kraštas lygus, siauras, balto pigmento; hifai dematiniai, su pertvaromis; konidogeninė ląstelė su pertvaromis; konidijos aukso rudo pigmento, dažniausiai rutuliškos formos, kartais su vienu nusmailėjusiu galu, apie $3\text{--}6 \times 3\text{--}6 \mu\text{m}$ dydžio.

Plectosphaerella cucumerina (Lindf.) W. Gams (1972) [*Monographella cucumerina* (Lindf.) Arx (1984)] 3.20 pav. Q1–4.

Plectosphaerella cucumerina kolonijos PDA terpėje greitai augančios; hifams būdingas šviesiai rudas su gelsvu atspalviu pigmentas; hifai hialiniai, šakoti, su pertvaromis; konidijos dematiškos, elipsiškos formos su nusmailėjusiu vienu ar abiem galais, $3,6\text{--}8,2 \times 1,4\text{--}2,5 \mu\text{m}$.

Pyrenophora dictyoides A.R. Paul & Parbery (1968) [*Drechslera andersenii* Scharif ex A. Lam (1986)] 3.20 pav. R1–4.

Kolonijos PDA terpėje labai sparčiai auga; viršutinei pusei būdingas žalias su pilku atspalviu pigmentas, apatinei – tamsiai pilkas pereinantis į žalsvą su gelsvu atspalviu; kolonijos kraštas platus, šviesiai pilko pigmento, plunksniškas; hifai subhialiniai su pertvaromis; konidijakočiai subhialiniai, tiesūs, kartais lenkti; konidijos nesegmentuotos, aukso rudo pigmento, elipsės formos, šiek tiek išlenktos, vienu dygstančiu galu, $\sim 23 \times 11 \mu\text{m}$.

Skyrius BASIDIOMYCOTA – papėdgrybiai, 3.21 pav.

Coprinellus disseminatus (Pers.) J. E. Lange (1938) 3.21 pav. A1–4.

Rūšies kolonijos PDA terpėje auga greitai; hifams būdingas nuo baltos iki gelsvos spalvos pigmentas, kurie formuoja koncentrinis žiedus ir auga puriais, oriniais grybienos kuokšteliais; hifai subhialiniai, su pertvaromis.

Sistotrema brinkmannii (Bres.) J. Erikss. (1948) 3.21 pav. B1–5.

Izoliatų kolonijos ant PDA greitai augančios, blyškiai gelsvo pigmento; hifai oriniai, purūs; chlamidosporos sukibusios grandinėle; bazidiosporos turinčios tamsų pigmentą, elipsės formos, $2,5\text{--}3 \times 1\text{--}2 \mu\text{m}$.

Skyrius MUCOROMYCOTA – Zygomicetai, 3.22 pav.

Mucor circinelloides Tiegh., Ann. Sci. Nat. (1875) [*Circinomucor circinelloides* (Tiegh.) Arx (1982); *Calyptromyces circinelloides* (Tiegh.) Sumst. (1910)] 3.22 pav. A1–6.

Rūšies kolonija PDA terpėje sparčiai auga, šviesiai rudo pigmento; hifai hialiniai, nesegmentuoti, turintys lipidų kūnus; sporangijos rutuliškos, gelsvai rudos, $36\text{--}48 \times 28\text{--}36 \mu\text{m}$; sporangiosporos hialinės, dažniausiai elipsės formos, $5,8\text{--}6,7 \times 3,3\text{--}4,2 \mu\text{m}$ dydžio.

Pastaba / Notes: Šio priedo *Alternaria alternata*, *Cadophora fastigiata*, *Chaetomium funicola*, *Coprinellus disseminatus*, *Microdochium bolleyi* ir *Sistotrema brinkmannii* endofitinių grybų aprašymai yra publikuoti autorės publikacijoje / *The descriptions of endophytic fungi Alternaria alternata, Cadophora fastigiata, Chaetomium funicola, Coprinellus disseminatus, Microdochium bolleyi and Sistotrema brinkmannii given in author's published article*: 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, 453.

S1 lentelė. Endofitinių grybų, išskirtų iš *Lolium* ir *Festuca* rūšių ir jų hibridų šaknų, taksonomijos priskyrimas pagal standartinius DNR duomenis.

Table S1. Taxonomic assignment of the endophytic fungi isolated from the roots of *Festuca* and *Lolium* and their hybrids according to the standard DNA data.

Grybas / <i>Fungus</i>	Izoliato kodas / <i>Isolate</i> <i>Code</i>	DNR sritis / <i>DNA</i> <i>Locus</i>	DNR sutapimas, bp / <i>DNA</i> <i>Identities, bp</i>	Sutapimas, % / <i>Congruence, %</i>	BLAST ID
<i>Alternaria</i> <i>alternata</i>	BSG001	ITS	440/440	100,00	PP218262.1
	BSG002		453/453	100,00	MN615420.1
	BSG016		578/578	100,00	MK649895.1
	BSG017		559/559	100,00	MN622992.1
	BSG018		390/390	100,00	PP911430.1
	BSG019		486/486	100,00	MN249500.1
	BSG020		487/487	100,00	MT644140.1
	BSG048		486/486	100,00	MT646481.1
	BSG051		520/521	99,81	MT487774.1
			670/672	99,70	OR226484.1
			522/523	99,81	OR662184.1
			671/673	99,70	LC749799.1
			522/522	100,00	MT487769.1
			672/673	99,85	AY154682.1
			522/523	99,81	MN826221.1
			654/656	99,70	MW017709.1
			522/523	99,81	PP499324.1
			670/672	99,70	KX090314.1
		RPB2	916/916	100,00	MK684150.1
			587/587	100,00	MN922279.1
			427/427	100,00	MG873562.1
			448/448	100,00	PP351921.1
			515/516	99,81	MT043354.1
			509/510	99,80	MT043353.1
			912/913	99,89	MN649031.1
			913/913	100,00	MN615843.1
			1041/1043	99,81	MK757628.1
		SSU	647/647	100,00	OR453387.1
			607/607	100,00	PP292027.1
			617/617	100,00	OR366485.1
			581/581	100,00	MN072922.1
			592/592	100,00	OR366486.1
			1051/1054	99,72	ON055699.1
		TEF	829/829	100,00	OM630609.1
			373/373	100,00	MK386655.1

S.1 lentelės tęsinys

Table S.1 Cont.

Grybas / <i>Fungus</i>	Izoliato kodas / <i>Isolate</i> <i>Code</i>	DNR sritis / <i>DNA</i> <i>Locus</i>	DNR sutapimas, bp / <i>DNA</i> <i>Identities, bp</i>	Sutapimas, % / <i>Congruence, %</i>	BLAST ID	
<i>Alternaria infectoria</i>	BSG013	ITS	442/442	100,00	MT635276.1	
	BSG058		523/523	100,00	MN560094.1	
	BSG063		533/533	100,00	MN534845.1	
		SSU	953/953	100,00	U43465.1	
<i>Alternaria rosae</i>	BSG052	ITS	537/537	100,00	LR134073.1	
	BSG050		554/554	100,00	MW288704.1	
			521/521	100,00	LR134076.1	
<i>Aureobasidium pullulans</i>	BSG059	ITS	528/528	100,00	MH931262.1	
	BSG061		533/533	100,00	MN922107.1	
	BSG071		852/853	99,88	XM_029907989.1	
	BSG072	RPB2	495/495	100,00	MG812620.1	
	BSG073		438/438	100,00	PP920516.1	
			SSU	542/542	100,00	KY294714.1
				851/851	100,00	KM388547.1
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	BSG021	ITS	480/481	99,79	MH538292.1	
	BSG022		642/642	100,00	MN097070.1	
		RPB2	650/650	100,00	HF934839.1	
			552/552	100,00	MH014993.1	
			SSU	464/464	100,00	KM111205.1
<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>Cladosporium cladosporioides</i>	BSG037	ITS	508/508	100,00	MW255614.1	
			654/654	100,00	MF472941.1	
		SSU	1058/1061	99,72	OR243761.1	
<i>Cladosporium halotolerans</i>	BSG014	ITS	444/445	99,78	MN859971.1	
	BSG065		448/448	100,00	MF473116.1	
			493/494	99,80	MF473108.1	
		SSU	586/586	100,00	MT000326.1	
		TEF	476/476	100,00	MF473519.1	
<i>Coprinellus</i> sp.	BSG004	ITS	464/471	98,51	FN386275	
			528/535	98,69	MK077856.1	
			691/700	98,71	MZ493094.1	
			390/397	98,24	JN689938	
<i>Cordyceps fumosorosea</i>	BSG015	ITS	652/652	100,00	OY756928.1	
	BSG066		542/543	99,82	OY756922.1	
	BSG067		430/430	100,00	MH532834.1	
	BSG068		491/491	100,00	ON796011.1	

S.1 lentelės tęsinys

Table S.1 Cont.

Grybas / <i>Fungus</i>	Izoliato kodas / <i>Isolate</i> <i>Code</i>	DNR sritis / <i>DNA</i> <i>Locus</i>	DNR sutapimas, bp / <i>DNA</i> <i>Identities, bp</i>	Sutapimas, % / <i>Congruence, %</i>	BLAST ID
	BSG069		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>Didymella</i> <i>macrostoma</i>	BSG023	SSU	489/489	100,00	MT649577.1
			632/632	100,00	KX519725.1
<i>Epicoccum</i> <i>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>Hypoxylon</i> <i>rubiginosum</i>	BSG009	ITS	516/516	100,00	MH319948.1
			604/604	100,00	OQ831968.1
			575/575	100,00	MW907965.1
<i>Lomentospora</i> sp.	BSG012	ITS	626/710	88,17	MT316371.1
		SSU	1048/1058	99,05	U43910.1
<i>Microdochium</i> <i>bolleyi</i>	BSG007	ITS	460/460	100,00	MT276137.1
	BSG008		458/458	100,00	MT276118.1
	BSG011		553/553	100,00	OL898490.1
	BSG024		469/469	100,00	MT446207.1
	BSG026		448/449	99,78	MT446123.1
	BSG027		466/466	100,00	MT446104.1
	BSG028		466/466	100,00	MT446101.1
	BSG029		457/457	100,00	KP859018.1
	BSG036		499/501	99,60	MT102452.1
	BSG054		590/590	100,00	KY305060.1
	BSG055		500/500	100,00	OM647846.1
	BSG064		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
			666/668	99,70	MN817751.1
			503/505	99,60	MK212911.1

S.1 lentelės tęsinys

Table S.1 Cont

Grybas / <i>Fungus</i>	Izoliato kodas / <i>Isolate</i> <i>Code</i>	DNR sritis / <i>DNA</i> <i>Locus</i>	DNR sutapimas, bp / <i>DNA</i> <i>Identities, bp</i>	Sutapimas, % / <i>Congruence, %</i>	BLAST ID
		<i>SSU</i>	810/810	100,00	MN817764.1
			867/870	99,66	OP184897.1
			720/721	99,86	HM216190.1
			835/836	99,88	HM216190.1
<i>Mucor</i>	BSG030	ITS	503/505	99,60	MT603934.1
<i>circinelloides</i>		<i>SSU</i>	518/518	100,00	KM527227.1
<i>Paraphoma</i>	BSG010	ITS	640/649	98,61	AB488489.1
<i>fimeti</i>			710/710	100,00	KF251675.1
			1236/1252	98,72	MF494612.1
<i>Plectosphaerella</i>	BSG006	ITS	426/426	100,00	MT447472.1
<i>cucumerina</i>	BSG062		453/453	100,00	MZ206376.1
	BSG070		573/573	100,00	KC427067.1
			455/456	99,78	LR594792.1
		<i>RPB2</i>	544/544	100,00	GU180612.1
		<i>SSU</i>	522/524	99,62	ON935484.1
<i>Pyrenophora</i>	BSG031	ITS	517/518	99,81	MK044599.1
<i>dictyoides</i>	BSG035		502/505	99,41	JN943653.1
	BSG049		515/518	99,42	MT192329.1
	BSG053		526/530	99,25	MH859312.1
	BSG056		665/670	99,25	MK539981.1
	BSG057		1021/1021	100,00	JN940962.1
		<i>SSU</i>	576/576	100,00	JN940958.1
<i>Sistotrema</i>	BSG005	ITS	514/514	100,00	DQ093653.1
<i>brinkmannii</i>			650/650	100,00	JQ912675.1
			548/548	100,00	MT159987.1
			567/567	100,00	KM222227.1
		<i>SSU</i>	556/556	100,00	R464262.1

S2 lentelė. Endofitinių mikroorganizmų, išskirtų iš *Festuca* spp., *Lolium* spp. ir *Lolium perenne* × *Festuca gigantea*, šaknų, izoliatų dažnis (IF).

Table S2. Isolation frequency (IF) of endophytic microorganisms isolated from the roots of *Festuca* spp., *Lolium* spp. and *Lolium perenne* × *Festuca gigantea*.

Nr. / No.	Endofitinių grybų rūšis / <i>Endophytic fungal species</i>	Izoliatų dažnis (IF), % / Isolation frequency (IF), %	Endofitinių bakterijų gentis / <i>Endophytic bacteria genus</i>	Izoliatų dažnis (IF), % / Isolation frequency (IF), %
1.	<i>Microdochium bolleyi</i>	20,00	<i>Bacillus</i> ^{Bc}	37,29
2.	<i>Alternaria alternata</i>	15,00	<i>Priestia</i> ^{Bc}	13,56
3.	<i>Pyrenophora dictyoides</i>	10,00	<i>Kosakonia</i> ^P	8,47
4.	<i>Aureobasidium pallulans</i>	8,33	<i>Paenibacillus</i> ^{Bc}	6,78
5.	<i>Cordyceps fumosorosea</i>	8,33	<i>Pseudomonas</i> ^P	6,78
6.	<i>Alternaria infectoria</i>	5,00	<i>Actinoallomurus</i> ^A	3,39
7.	<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	5,00	<i>Pantoea</i> ^P	3,39
8.	<i>Alternaria rosea</i>	3,33	<i>Peribacillus</i> ^{Bc}	3,39
9.	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	3,33	<i>Achromobacter</i> ^P	1,69
10.	<i>Cladosporium halotolerans</i>	3,33	<i>Heyndrickxia</i> ^{Bc}	1,69
11.	<i>Cadophora fastigiata</i>	1,67	<i>Lysinibacillus</i> ^{Bc}	1,69
12.	<i>Chaetomium funicola</i>	1,67	<i>Niallia</i> ^{Bc}	1,69
13.	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1,67	<i>Novosphingobium</i> ^P	1,69
14.	<i>Coprinellus</i> sp. ^B	1,67	<i>Pedobacter</i> ^{Bt}	1,69
15.	<i>Didymella macrostoma</i>	1,67	<i>Robertmurraya</i> ^{Bc}	1,69
16.	<i>Epicoccum nigrum</i>	1,67	<i>Sphingomonas</i> ^P	1,69
17.	<i>Hypoxyton rubiginosum</i>	1,67	<i>Stenotrophomonas</i> ^P	1,69
18.	<i>Lomentospora</i> sp.	1,67	<i>Variovorax</i> ^P	1,69
19.	<i>Mucor circinelloides</i> ^M	1,67		
20.	<i>Paraphoma fimeti</i>	1,67		
21.	<i>Sistotrema brinkmannii</i> ^B	1,67		

Visi grybai priklauso Ascomycota skyriui, išskyrus *Coprinellus* sp. ir *Sistotrema brinkmannii* iš Basidiomycota (pažymėta kaip B) ir *Mucor circinelloides* iš Mucoromycota (pažymėta M).

Bakterijų skyriai nurodomi taip: Bacillota (Bc) – (N = 8); Pseudomonadota (P) – (N = 8); Actinomycetota (A) – (N = 1); Bacteroidota (Bt) – (N = 1).

All fungi belong to Ascomycota, except for Coprinellus sp. and Sistotrema brinkmannii from Basidiomycota (indicated as B) and Mucor circinelloides from Mucoromycota (indicated as M).

The bacterial phyla are indicated as follows: Bacillota (Bc) – (N = 8); Pseudomonadota (P) – (N = 8); Actinomycetota (A) – (N = 1); Bacteroidota (Bt) – (N = 1).

S3 lentelė. Endofitinių bakterijų, išskirtų iš *Festuca* ir *Lolium* rūšių ir jų hibridų šaknų pagal standartines 16S rDNR sekas, taksonominis priskyrimas.

Table S3. Taxonomic assignment of the endophytic bacteria isolated from the roots of *Festuca* and *Lolium* and their hybrids according to standard 16S rDNA sequences.

Bakterijos / <i>Bacteria</i>	Kolonijos aprašymas / <i>Colony Characteristics</i>		DNR sutapimas, bp / <i>DNA Identities, bp</i>	Sutapimas, % / <i>Congruence, %</i>	BLAST ID
	Forma, paviršius, kraštas / <i>Colony Shape, Surface, Edge Shape</i>	Spalva / <i>Color</i>			
<i>Achromobacter spanius</i>	Apvalus, šiek tiek iškilus, kraštas lygus	Balta, šviesiai ruda	1077/1079	99,81	KP860309.1
<i>Actinoallomurus</i> sp.	Beveik apvalus, matinis, labai iškilus, kraštas nelygus	Pilkai balta	1082/1085 1089/1090	99,72 99,91	AB604841.1 LC325912.1
<i>Bacillus cereus</i>	Plunksniškas, neiškilus, grublėtas, kraštas lygus	Pilkai balta	1083/1084 1084/1084	99,91 100,00	MH130346.1 OP986940.1
<i>Bacillus licheniformis</i>	Apvalus ir netaisyklingas, šiurkštus ir raukšlėtas, nepermatomas, kraštas nelygus	Balta	1078/1078 1094/1094 1083/1086 1071/1074	100,00 100,00 99,72 99,72	MH305323.1 KP418813.1 MH605434.1 MW487813.1
<i>Bcillus pumilus</i>	Beveik apvalus, nepermatomas, blizgus, kraštas nelygus	Geltona	1088/1088 1088/1088 1090/1093 532/532 1086/1087	100,00 100,00 99,73 100,00 99,91	MK156165.1 MK100782.1 OM698827.1 KX904728.1 MK521063.1
<i>Bacillus subtilis</i>	Apvalus, nepermatomas, šiurkštus, kraštas nelygus	Balta, šiek tiek geltona	1009/1011 1080/1081 1085/1086 1088/1089 1088/1089	99,80 99,91 99,91 99,91 99,91	CP035397.1 PQ061103.1 MH373533.1 CP031693.1 MW380651.1

S.3 lentelės tęsinys

Table S.3 Cont.

Bakterijos / <i>Bacteria</i>	Kolonijos aprašymas / <i>Colony Characteristics</i>		DNR sutapimas, bp / <i>DNA Identities, bp</i>	Sutapimas, % / <i>Congruence, %</i>	BLAST ID
	Forma, paviršius, kraštas / <i>Colony Shape, Surface, Edge Shape</i>	Spalva / <i>Color</i>			
<i>Bacillus</i> sp.	Apvalus, neiškilus, matinis, kraštas lygus, kartais nelygus	Balta	1089/1091	99,82	ON878255.1
			1081/1084	99,72	MT111080.1
			1086/1086	100,00	MT457446.1
			1013/1044	97,03	KC236823.1
			1042/1062	98,49	PQ013662.1
<i>Heyndrickxia oleronia</i>	Apvalus, blizgus, kraštas šiek tiek permatomas	Smėlio	1084/1086	99,82	MT534000.1
			1082/1087	99,54	MF662517.1
<i>Kosakonia cowanii</i>	Apvalus, paviršius lygus, blizgus, kraštas nelygus	Balta	1090/1090	100,00	PP528640.1
			1089/1090	99,91	PP528628.1
			1068/1088	98,16	MG835978.1
			1087/1087	100,00	PP528607.1
			1083/1083	100,00	PP651538.1
<i>Lysinibacillus boronitolerans</i>	Apvalus, plokščias, nepermatomas, kraštas lygus	Balta	1084/1087	99,72	MH385002.1
<i>Niallia circulans</i>	Apvalus, šiurkštus, kraštas nelygus	Balta	1083/1084	99,91	MG988220.1
<i>Novosphingobium</i> sp.	Apvalus, plokščias, blizgus, pusiau permatomas, kraštas lygus	Šviesiai ruda	1097/1097	100,00	KY123877.1
			385/385	100,00	LC436024.1
<i>Paenibacillus barengoltzii</i>	Apvalus, iškilus, nepermatomas, kraštas lygus	Kreminė	1085/1086	99,91	MT509886.1
<i>Paenibacillus</i> sp.	Apvalus, permatomas, išgaubtas, blizgus, kraštas lygus	Balta	1077/1079	99,81	MK456436.1
			1084/1084	100,00	LC769488.1
			1089/1090	99,91	CP126313.1

S.3 lentelės tęsinys

Table S.3 Cont.

Bakterijos / <i>Bacteria</i>	Kolonijos aprašymas / <i>Colony Characteristics</i>				
	Forma, paviršius, kraštas / <i>Colony Shape, Surface, Edge Shape</i>	Spalva / <i>Color</i>	DNR sutapimas, bp / <i>DNA Identities, bp</i>	Sutapimas, % / <i>Congruence, %</i>	BLAST ID
<i>Pantoea agglomerans</i>	Apvalus, plokščias, blizgus, kraštas lygus	Geltona	1086/1088 1091/1091	99,82 100,00	CP048033.1 ON202849.1
<i>Pedobacter alluvionis</i>	Apvalus, išgaubtas, nepermatomas, blizgus, kraštas lygus	Rožinė	1067/1070	99,72	OK090501.1
<i>Peribacillus asahii</i>	Apvalus, blizgus, kraštas netaisyklingas	Balta	1081/1083	99,82	KY660439.1
<i>Peribacillus frigoritolerans</i>	Apvalus, blizgus, kraštas netaisyklingas	Balta	1086/1086	100,00	MN710450.1
<i>Priestia aryabhatai</i>	Apvalus, blizgus, išgaubtas, kraštas lygus	Kreminė	1084/1088 1081/1082	99,63 99,91	MH321608.1 MN543853.1
<i>Priestia megaterium</i>	Apvalus, matinis, kreminės konsistencijos, neiškilus, kraštas lygus	Balkšva	532/532 1088/1090 1091/1092 1077/1078 1090/1093 1082/1082	100,00 99,82 99,91 99,91 99,73 100,00	MK263002.1 MF079370.1 MG430231.1 MN161199.1 GU323374.1 MT487598.1
<i>Pseudomonas oryzae</i>	Ovalus, raukšlėtas, blizgus, kraštas netaisyklingas	Geltona	1083/1084	99,91	PP651577.1
<i>Pseudomonas</i> sp.	Ovalus, nepermatomas, blizgus, plokščias, kraštas netaisyklingas	Geltona	1070/1072 1083/1084 1088/1088	99,81 99,91 100,00	MT102561.1 OR363695.1 MT269585.1
<i>Robertmurraya siralis</i>	Apvalus, blizgus, plokščias, lygus kraštas	Balta	1081/1081	100,00	PP542506.1

S.3 lentelės tęsinys

Table S.3 Cont.

Bakterijos / <i>Bacteria</i>	Kolonijos aprašymas / <i>Colony Characteristics</i>		DNR sutapimas, bp / <i>DNA Identities, bp</i>	Sutapimas, % / <i>Congruence, %</i>	BLAST ID
	Forma, paviršius, kraštas / <i>Colony Shape, Surface, Edge Shape</i>	Spalva / <i>Color</i>			
<i>Sphingomonas</i> sp.	Apvalus, plokščias, blizgus, kraštas lygus	Geltona	1085/1085	100,00	OR363655.1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Apvalus, iškilus, blizgus, kraštas lygus	Balta	1090/1092	99,82	JQ579644.1
<i>Variovorax</i> sp.	Apvalus, išgaubtas, kraštas lygus	Geltona	1081/1095	98,72	OY740253.1

S4 lentelė. Bakterijų izoliatų 16S rDNR sekos, deponuotos į GenBank.
Table S4. The 16S rDNA sequences of bacterial isolates have been deposited into GenBank.

Bakterijos / <i>Bacteria</i>	Izoliato kodas / <i>Isolate Code</i>	GenBank ID	Sekos ilgis, bp / Sequence Length, bp
<i>Achromobacter spanius</i>	BSB062	PQ144546	1079
<i>Actinoallomurus</i> sp.	BSB001	PQ144586	1085
	BSB002	PQ144656	1090
<i>Bacillus cereus</i>	BSB003	PQ152314	1084
	BSB004	PQ152315	1084
<i>Bacillus licheniformis</i>	BSB005	PQ152317	1078
	BSB006	PQ152320	1094
	BSB007	PQ152321	1086
	BSB008	PQ152235	1074
<i>Bacillus pumilus</i>	BSB020	PQ164425	1088
	BSB022	PQ165300	1088
	BSB023	PQ164521	1093
	BSB024	PQ164700	532
<i>Bacillus subtilis</i>	BSB013	PQ186790	1011
	BSB014	PQ164775	1081
	BSB015	PQ169019	1086
	BSB016	PQ186787	1089
	BSB017	PQ186786	1089
	BSB018	PQ186788	1091
	BSB019	PQ186789	1084
<i>Bacillus</i> sp.	BSB009	PQ147042	1086
	BSB010	PQ148862	1044
	BSB011	PQ148153	1062
	BSB057	PQ151653	1086
<i>Heyndrickxia oleronia</i>	BSB012	PQ165299	1087
<i>Kosakonia cowanii</i>	BSB026	PQ182342	1090
	BSB027	PQ182363	1090
	BSB028	PP999032	1088
	BSB029	PQ182576	1087
	BSB030	PQ182595	1083
<i>Lysinibacillus boronitolerans</i>	BSB054	PP999036	1087
<i>Niallia circulans</i>	BSB031	PQ182636	1084
<i>Novosphingobium</i> sp.	BSB060	PQ198551	1097
	BSB021	PQ198548	385
<i>Paenibacillus barengoltzii</i>	BSB035	PQ199303	1086
<i>Paenibacillus</i> sp.	BSB036	PQ203669	1079
	BSB039	PQ198665	1084
	BSB040	PQ203670	1090
<i>Pantoea agglomerans</i>	BSB032	PQ198557	1088
	BSB033	PQ198656	1091
<i>Pedobacter alluvionis</i>	BSB034	PQ203671	1070
<i>Peribacillus asahii</i>	BSB050	PQ203673	1083
<i>Peribacillus frigoritolerans</i>	BSB038	PQ203672	1086
<i>Priestia aryabhattai</i>	BSB045	PP999035	1088
	BSB056	PQ203341	1082

S.4 lentelės tęsinys

Table S.4 Cont.

Bakterijos / <i>Bacteria</i>	Izoliato kodas / <i>Isolate Code</i>	GenBank ID	Sekos ilgis, bp / <i>Sequence Length, bp</i>
<i>Priestia megaterium</i>	BSB041	PQ203348	532
	BSB042	PQ203674	1090
	BSB043	PQ203675	1092
	BSB044	PQ203676	1078
	BSB025	PQ208190	1093
	BSB055	PQ208191	1082
<i>Pseudomonas oryzae</i>	BSB047	PQ212749	1084
<i>Pseudomonas</i> sp.	BSB048	PQ204581	1072
	BSB049	PQ211015	1084
	BSB058	PQ211037	1088
<i>Robertmurraya spiralis</i>	BSB051	PQ213359	1081
<i>Sphingomonas</i> sp.	BSB052	PQ215938	1085
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	BSB053	PQ216291	1092
<i>Variovorax</i> sp.	BSB059	PQ216293	1095

Pastaba / *Note*: S1–S4 lentelių duomenys yra publikuoti autorės publikacijose / *The data of appendix S1–S4 tables was taken from the author's published articles*: 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, 453.; 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): 79.

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
bookshop.vu.lt, journals.vu.lt
Tiražas 15 egz.