

Mikroskopinių grybų įvairovės rizosferoje tyrimai Lietuvoje

Antanina Stankevičienė

Vilija Snieškienė

Vytauto Didžiojo universiteto Kauno botanikos sodas

- Rizosferoje funkcionuojančių grybų įvairovę didele dalimi lemia augalo šaknų metabolitai ir substratas
- Biologiniai procesai vykstantys augalo šaknyno zonoje yra svarbus įtakojantis augalo būklę veiksnys
- 2003 m. prof. A. Lugauskas teigė, kad „pastaruoju metu atliekama mažiau dirvožemio mikroorganizmų tyrimų, be kurių sunku įvertinti procesus, kurie vyksta rizosferoje veikiant įvairiems antropogeniniams veiksniams“
- Dažniausiai yra susitelkiama į aktualiausio tuo metu vieno patogeno paiešką, o įvairovės tyrimai neatliekami

- Augalų šaknyno grybų tyrimai buvo atlikti taikant biologinį grynų kultūrų išskyrimo metodą, kurio metu naudota agarizuotos terpės (pH 6,0).
- Serijinio skiedimo būdu atskiedus iki 1:10 000, apskaičiuotas pradų skaičius 1 grame absoliučiai sauso substrato arba natūralaus drėgnumo mėginiuose



- Bandinys sudaromas imant specialiu gražtu arba tiesiog iškasant iš keturių augalo rizosferos vietų. Etiketuojama. Po to sumaišius paruošiamas vienas mėginys.
- Atsveriamas 10 g substrato ir subėrus į kolbą su 100 ml sterilaus distiliuoto vandens, 10 min. intensyviai purtoma
- Serijinio praskiedimo būdu atskiedžiama iki **1:10 000**: imti 1 ml skiedinio iš kolbutės ir supilamas į pirmą mėgintuvėlį su 10 ml sterilaus distiliuoto vandens; iš jo vėl 1 ml paimamas ir supilamas į antrą mėgintuvėlį (jame 10 ml vandens), o iš pastarojo – 1 ml į trečią
- Tada 1 ml suspensijos (iš trečio mėgintuvėlio) supilama į Petri lėkštelę. Tai atliekama trimis-keturiais pakartojimais. Po to sukamuoju judesiu išsklaidomas ir užpilamas 10 ml agarizuota ir atvėsinta iki 40°C terpe (pH 6).
- Terpei suaušus apverstos lėkštelės talpinamos į termostatą.
- Pasėliai inkubuojami 26°±2°C temperatūroje 5–7 paras.



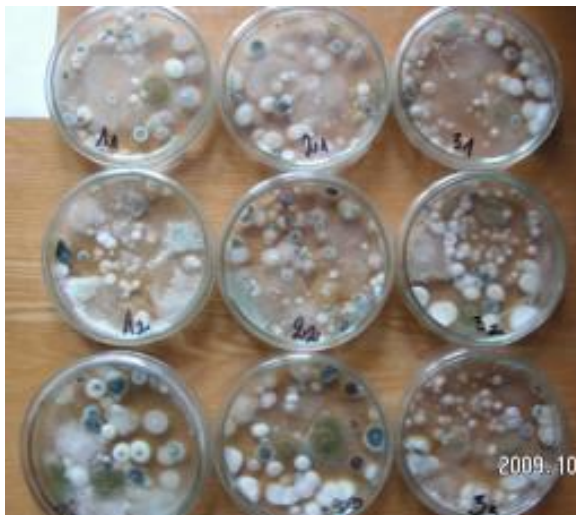
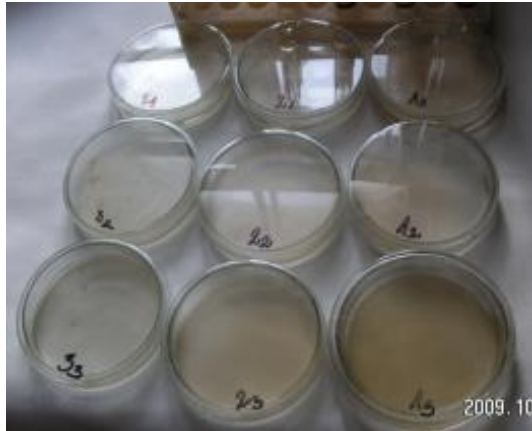
- **Apskaičiuojamas grybų pradų kiekis 1g absoliučiai sauso substrato ($\text{kSV} \cdot \text{g}^{-1}$).**

- Atsvėrus kiekvieno mėginio po 1 g substrato (3 pakartojimai) suberta į biuską (prieš tai užfiksavus jo svorį). Atidengti biuksai džiovinti džiovinimo spintoje prie $105^\circ \pm 2^\circ \text{C}$ iki pastovaus svorio.

- Nustatytas pastovus svoris: po 5 val. su pincetu išėmus iš džiovinimo spintos biuską (uždengtą) talpinama į eksikatorių su drėgmę sugeriančiu skysčiu ir sveriamas.

- Po to vėl atidengiama ir gražinama į termostatą ir kaitinama 2 val. Vėl atliekamas svėrimas.

- Taip kartojama kol svoris nebesikeičia. Svoris matuojamas 0,0001 tikslumu



- Apskaičiuojamas identifikuotų rūšių **aptikimo dažnis**: procentinė išraiška santykio tarp variantų (lėkštelių), kuriuose aptikta grybo rūšis, ir viso tirtų variantų skaičius
- Grybo **rūšies santykinis tankis**: procentinė išraiška santykio tarp tam tikros grybo rūšies izoliatų ir viso aptiktų izoliatų skaičiais

- **1958 m. – rizosferos grybų įvairovės tyrimus pradėjo A.Lugauskas**
- Pašarinių augalų rizosferos tyrimai: grybų kompleksų kitimo dinamika, *Trichoderma* spp. (A.Lugauskas, 1960)
- **1962 m. A. Lugauskas (Autoreferatas). Микромицеты ризосферы кормовых растений и их антагонистические свойства.**
- **1960-1988 m.** tęsiami pašarinių augalų rizosferos tyrimai: grybų įvairovei **sėjomainos įtaka** (A.Mikulskienė, D.Šliaužienė, 1982, 1988), antagonizmas, didelis dėmesys **raudonajam dobilui** (E.Petrauskaitė (1970), O.Špokauskienė (1971), A.Mikulskienė (1972), K.Jankevičius (1972), D.Šliaužienė (1972, 1986), O.Salina (1986); **liucernai** (1979, Z.Rudzevičienė, D.Šliaužienė, nuo 1981 – O.Salina įvairiuose dirvožemiuose, antropogeninis poveikis), **daugiametės žolės** (1981 – Z.Rudzevičienė), sėjomainos įtaka grybų kompleksų formavimuisi (D.Šliaužienė, 1985);

- 1977 m. **javų rizosferos tyrimai**: miežis, (D.Šliaužienė, R.Milkis, Z. Rudzevičienė)
- Nuo 1975 m. **tyrimai šiltnamiuose**: antagonisto (*Trichoderma lignorum*) įtaka grybų kompleksų formavimuisi (Z.Rudzevičienė, A.Makarskas); azoto įtaka *Trichoderma* spp. aktyvumui (O.Salina, 1985)
- Grybų išplitimas: 1985 – **Mucorales** išplitimas pašarinių augalų rizisferoje (D. Šliaužienė); 1986 – **Penicillium** (L.Levinskaitė, 1986), (D.Šliaužienė, L.Levinskaitė); 1987 – **Acremonium** šaknyno zonoje (D.Šliaužienė)
- 1978 -1991m. **Boro, chlorofoso, karbofoso, semazino, trichloracetato, organinių trąšų** įtaka grybų bendrijų formavimuisi (A.Mikulskienė, A.Galvelis, O.Atlavinytė ir kt.); 1982 – grybų reakcija į **nitritinius junginius** (Dėdinas A., Mikulskienė A., Šliaužienė D.); **pesticidų poveikis** grybams (A.Paškevičius, K.Kvietkauskas, 1991)

- 1970-1994 **šaknų puvinų sukėlėjų tyrimai: *Fusarium*** spp. įvairovės tyrimai ir kovos priemonių taikymas (D.Šliaužienė, L.Levinskaitė); daugiamečių žolių (D.Šliaužienė, Z.Rudzevičienė, 1980); pašarinių augalų (D.Šliaužienė, A.Mikulskienė, 1980); dobilo, liucernos (D.Šliaužienė, Mikulskienė A. 1994) šaknų patogenai
- 1985-1987 – pašarinių augalų rizosferoje **nematodų ir grybų** tarpusavio ryšiai; dobilo ir liucernos šaknų puviniai įtakojami nematodų ir grybų (Z.Rudziavičienė, D.Šliaužienė);
- 1974 –1987 - **atliekų skaidymasis** - Z.Bagdanavičienė (1974); R.Vaitkevičius (1982); grybų-skaidytojų įvairovė (A.Mikulskienė, 1987); 1982-1985 celiuliozė skaidantys
- **Sapropeliu** tręšimas: kukurūzai, dobilai (J.Repečkienė, O.Salina ir kt., 1999)
- **Hidroponika** – (E.Survilienė, 1993)

4730
12014
А. ЛУГАУСКАС

МИКРОМИЦЕТЫ
ОКУЛЬТУРЕННЫХ ПОЧВ
ЛИТОВСКОЙ ССР



Botanikos institutas (Vilnius)

- 1984. A. Lugauskas (Autoreferatas). Микромицеты окультуриваемых почв Литовской ССР и их способность адаптироваться к разным субстратам (экологические и прикладные аспекты). Киев
- (Lietuvos sukultūrintų dirvožemių mikromicetai ir jų geba įsisavinti įvairius substratus (ekologiniai ir taikomieji aspektai))

- Vytauto Didžiojo universiteto Kauno botanikos sode **dekoratyvinių** augalų šaknyso zonos mikobiotos tyrimai pradėti 1989 m.
- Iki šiol šių augalų šaknyso zonos tyrimai buvo neatliekami
- Tyrimams vadovavo dirvožemio mikologijos Lietuvoje pradininkas prof. A. Lugauskas (Botanikos institutas).
- Pradžioje tyrimo objektas buvo tikrasis gvazdikas, po to interjere auginami augalai, lauko kolekcijose auginami dekoratyviniai augalai su pažeista antžemine dalimi ir t.t.

- I. 1989–1993 m. buvo atliekami tikrojo gvazdikio (*Dianthus caryophyllus* L. 'Red Sim') grybų įvairovės kitimas vegetacijos tarpsniuose (tik pasodinus augalus, butonizacijos, žydėjimo, vegetacijos pabaigoje). Tik pasodinus augalus buvo parinkti pastovūs stebėjimo taškai; iš jų imami ėminiai visais vegetacijos tarpsniais iki augalo vegetacijos pabaigos.
- Iš viso išskirta 138 rūšys, priklausančios 43 gentims. **Rūšių įvairovė vegetacijos metu mažėjo, o didėjo atskirų rūšių aptinkamumo dažnis.** Antroje vegetacijos pusėje jau buvo aptinkami patogeninių grybų pradai: *Fusarium* spp. – 2,33–6,98%, o vegetacijos pabaigoje padidėjo iki 5,88–47,06%; *Verticillium* spp. nuo 2,33 iki 23,53%; *Sclerotinia* sp. – 10,37–23,26%; *Botrytis cinerea* – 3,51–11,76% (Grincevičienė, Lugauskas, 1993; Snieškienė, Stankevičienė, 1997; Stankevičienė, 2000; Stankevičienė et al., 2006; Лугаускас и др., 1991).

- 1991 m. buvo tiriamas antagonizmu pasižyminčio *Trichoderma viride* Pers. poveikis tikrojo gvazdiko šaknų patogenams (*Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Umbelopsis isabellina* (sin. *Mortierella isabellina*), *Verticillium albo-atrum*).
- Augalų, į kurių substratą buvo įterpta antagonistinio grybo pradais būklė pastebimai buvo geresnė (Снешкене, Гринцявичене, 1991; Grincevičienė, Snieškienė, 1993; Stankevičienė, Lugauskas, 1999)

- II.** 1996–2015 m. buvo tiriamos 3 grupės augalų augančių skirtingose ekologinėse sąlygose:
augantys Vytauto Didžiojo universiteto Kauno botanikos sodo oranžerijoje;
tik iš Nyderlandų atvežti geros būklės augalai
augalai su antžeminės dalies pažeidimais, t.y. įvežti iš užsienio prieš 2–3 mėn., pabuvę prekybos tinkle, sandėliuose, kur jiems augti nepalankios sąlygos (neatitinkantis augalų poreikių oro drėgnis bei temperatūra).

- II. Pradėjus į Lietuvą įvežti įvairius interjero dekoratyvinius augalus, didelę dalį jų sudarė šilkmedinių šeimos (*Moraceae*) augalai, todėl pirmieji gauti rezultatai buvo *Ficus* L. augalų (Stankevičienė ir kt., 1999).

VDU Kauno botanikos sodas (tęsinys 2)

- 1997–2008 m. buvo tiriama **trijų adaptacijos grupių augalai** auginti optimaliose ir nepalankiose sąlygose. Labai svarbus augalų būklei šaknyne zonoje susiformuojantis patogeninių grybų kompleksas.
- Patogenai **suintensyvėja kai augalas nusilpęs**. Ištyrus 46 taksonus sunkios, 26 – vidutiniškos ir 25 lengvos adaptacijos augalų dominavo *Fusarium*, *Pythium*, *Verticillium* genčių grybai-patogenai (Stankevičienė, 2008; Stankevičienė, Lugauskas, 2003a, b; Stankevičienė, Snieškienė, 2010; Stankevičienė et al., 2008; Stankevičienė, Varkulevičienė, 2006; Снешкене и др., 2004; 2006).
- Ištyrus ypač **sunkiai adaptuojamų *Vriesea splendens*** augalų, augančių skirtingose sąlygose, šaknyne zonoje, išskirta 55 rūšys grybų priklausančių 22 gentims, 6 šeimoms, 3 eilėms, 3 klasėms, 3 skyriams ir jokiai taksonominei grupei nepriklausantys anamorfiniai grybai (*Anamorphic fungi*): 4 rūšys, 16 genčių.
- Jau sveikų augalų šaknyne aptiktas šių augalų patogenas *Pythium debaryanum* (Stankevičienė, Lugauskas, 2007).

VDU Kauno botanikos sodas (tęsinys 2)

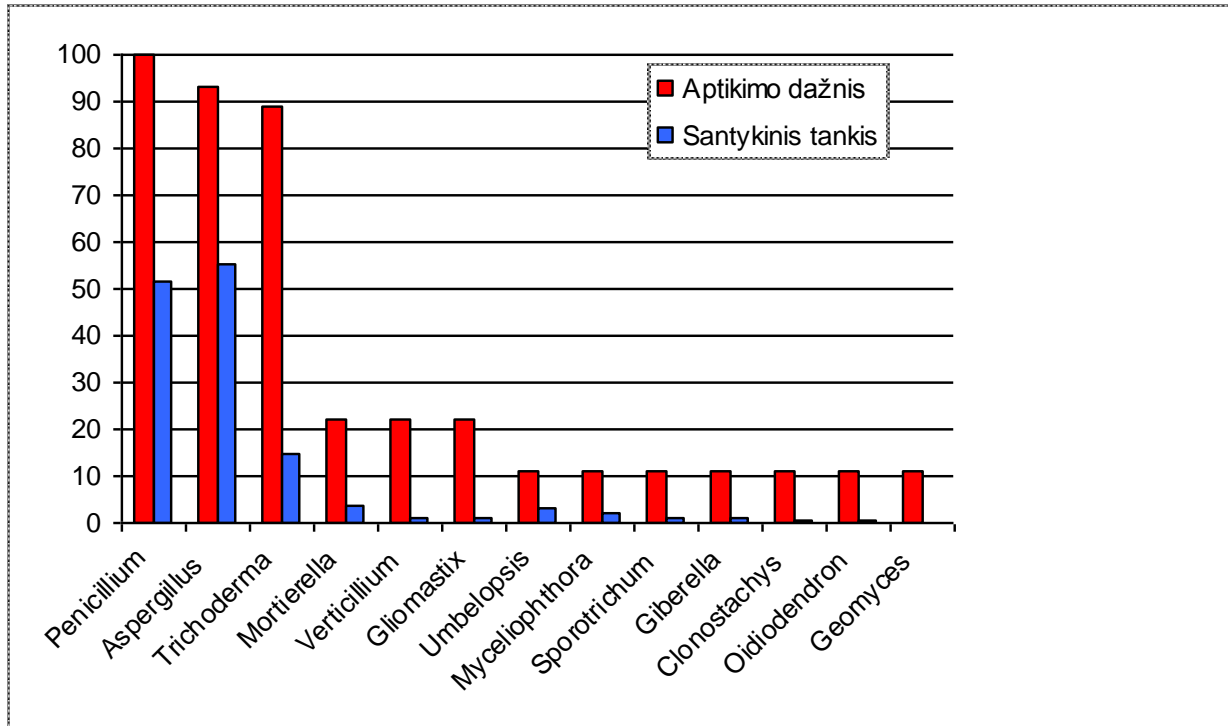
- **Ypatingu dekoratyvumu pasižyminčių *Dizygotheca elegantissima* ir *Schefflera arboricola* be 33 rūšių, 15 genčių grybų-saprotrofų išskirta ir patogeniniai grybai: *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia* (Stankevičienė ir kt., 2010).**
- **Atliekus augalų priklausančių skirtingoms taksonominėms grupėms tyrimus, nustatyta, kad grybų kompleksai šaknyno zonoje skyrėsi tarpusavyje. Buvo tirti: *Dieffenbachia* (Snieškienė, Stankevičienė, 1999); *Bromeliaceae* (Stankevičienė, 2007; Varkulevičienė, Stankevičienė, 2005), *Agavaceae* (Stankevičienė, Lugauskas, 2001; Stankevičienė et al., 2003; Stankevičienė ir kt., 2006), *Dracaena* (Stankevičienė, Snieškienė, 2011), *Marantaceae* (Varkulevičienė, Stankevičienė, 2004)**
- **1999–2007 penkiose oranžerijos sekcijose (atogražų – 18 ėminių, drėgnųjų atogražų – 15, dykumų-pusdykumių – 14, šiltųjų paatogražių – 11, vėsiųjų paatogražių – 10 ėminių) išskirta 115 rūšių, 36 gentys, 3 šeimos, 3 eilės, 3 klasės, 3 skyriai ir anamorfinių: 94 rūšys, 30 genčių. mažiausiai rūšių išskirta vėsiųjų paatogražių sekcijoje (43), o daugiausiai drėgnųjų atogražų (58) (Stankevičienė, Lugauskas, 2006, 2008).**

VDU Kauno botanikos sodas (tęsinys 2)

- 2002 m. tiriant **skirtingų ekologinių poreikių augalus** (*Hibiscus rosa-sinensis*, *Ficus elastica*, *Cyclamen persicum*, *Euphorbia trigona*), kai 6 mėnesius augo optimaliose sąlygose, substratas prisotintas lėtai tirpstančių maisto medžiagų, nustatyta, kad **pradų skaičius buvo atvirkščiai proporcingas maisto medžiagų kiekiui**, t. y. senkant maisto medžiagų atsargoms, daugėjo grybų pradų skaičius šaknyne. Iš viso išskirta 82 rūšys, priklausančios 30 genčių, 3 šeimoms, 1 eilei, 1 klasei, 1 skyriui ir anamorfinių grybų: 71 rūšis, 24 gentys (Stankevičienė ir kt., 2008; Stankevičienė, 2012).
- 2010 m. atlikus arekinių šeimos (*Arecaceae*) augalų, augančių ilgai nekeičiant substrato (iki 20–40 metų) šaknyne zonoje funkcionavo 47 rūšių, 26 genčių grybai, kurių tarpe dominavo: *Mucor* (50%), *Mortierella* (35,4%), *Trichoderma* (35,4%), *Aspergillus* (33,3%) ir *Penicillium* (23%). Aptinkamumo dažnis taip pat buvo nedidelis (nuo 2,1 iki 22,9%). **T.y. ilgalaikis substrato nekeitimas ir konkretaus augalo šaknų metabolitai sąlygojo mažesnę įvairovę ir kiekį grybų pradų šaknyne zonoje** (Stankevičienė, Lugauskas, 2011; Varkulevičienė, Stankevičienė, 2011).

- **III. Lauko kolekcijose augančių, su antžeminės dalies pažeidimais augalų šaknyso grybų tyrimai.**
- 2006–2009 Sumedėjusių augalų (*Abies balsamea*, *Picea* sp., *Thuja* sp., *Rhododendron* spp.) ir žolinių (*Dahlia* sp., *Paeonia* spp.) su antžeminės dalies pažeidimais šaknyso zonoje identifikuota 62 rūšys, priklausančios 26 gentims, 5 šeimoms, 4 eilėms, 3 klasėms bei 3 skyriams ir 20 genčių, 54 rūšys anamorfinių grybų.
- *Paeonia lactiflora* x *hibridus* hort veislių 'Virgilijus' ir 'Darius-Girėnas' šaknyso zonoje **aptikti patogenai**: *Fusarium oxysporum* (pažeidžiantis daugelio augalų šaknis) bei *Botrytis cinerea* (pavoingas bijūno pažeidėjas) (Stankevičienė, Snieškienė, 2010b, c; Stankevičienė ir kt., 2010; Stankevičienė, Varkulevičienė, 2006b; Varkulevičienė, Stankevičienė, 2006).

VDU Kauno botanikos sodas (tęsinys 3)

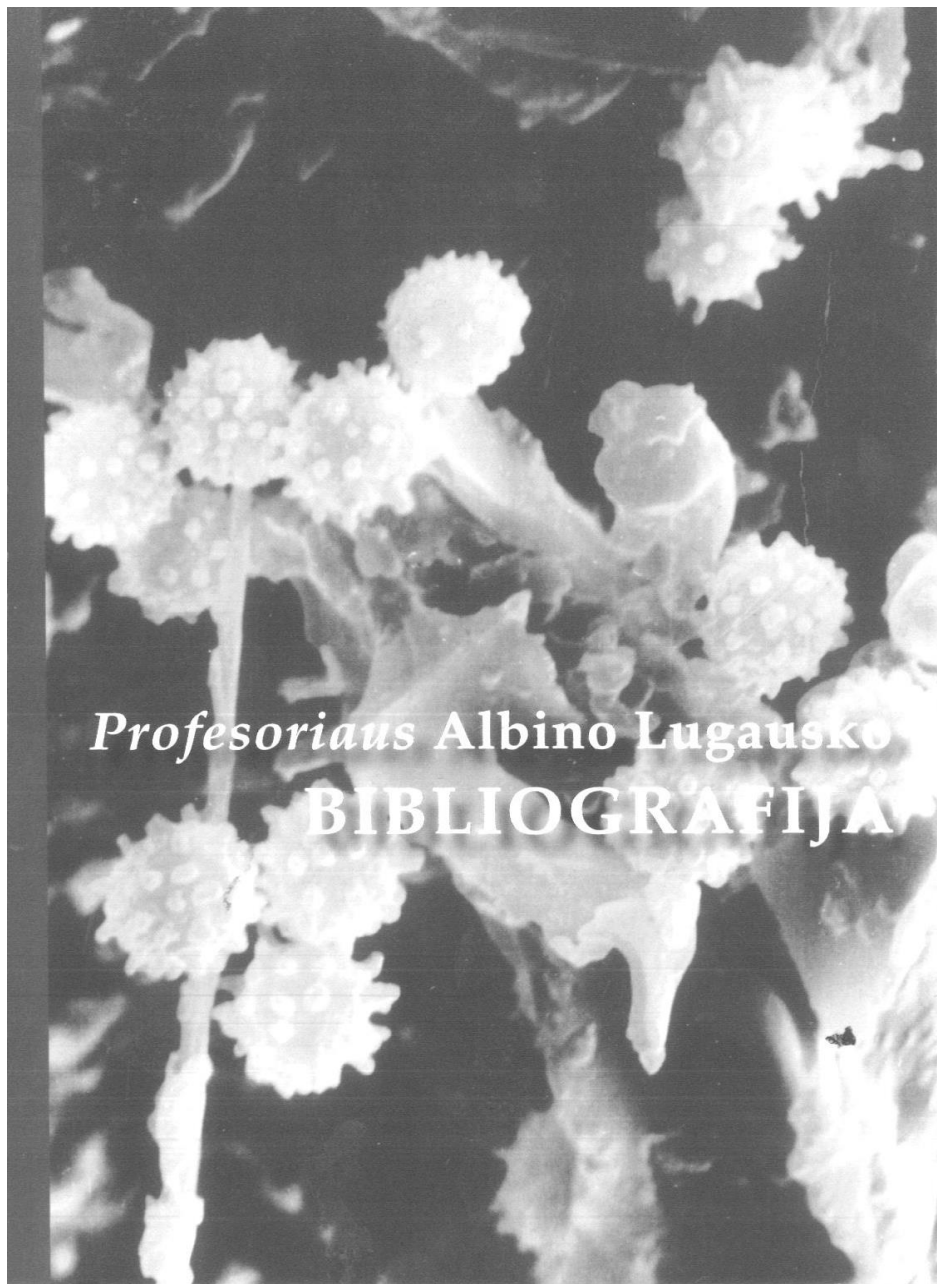


Rododendro rizosferos tyrimai

- **IV.** 2010–2011 m. tyrimai intensyviai plintančio Europoje agresyvaus patogeno *Phytophthora* spp. pažeidimo požymiais (nulinę ūgliai, juoduojančios gyslos ar vystantys lapai, praretėjusi laja) augalų (*Rhododendron* sp., *Pieris* sp., *Alnus glutinosa*) grybų tyrimas.
- Nustatyta *Phytophthora* spp. šaknyo zonoje. Genominės DNR, išskirtos iš dirvožemio, koncentracija (svyravo nuo 5,8 iki 10,0 ng/ml), patvirtino, kad šių augalų šaknyo zonoje yra *Phytophthora* spp. pradai (Snieskienė ir kt., 2012; Vitas et al., 2012).

VDU Kauno botanikos sodas (5)

- V. 2013–2015 m. vykdant projektą „Pabėgių medienos bioremediacijos tyrimai ir technologijų kūrimas“ BIÖREM NR. VPI-3.1-ŠMM-10-V-02-010 (vadovas prof. A. Maruška)
- Atlikti tyrimai augalų (*Tagetes patula*, *Portulaca oleracea*, *Perilla frutescens*, *Poa annua*, *Lupinus luteus*) pasodintų į kreozotu prisotintą substratą. Pavyzdžiai buvo imami iš pradinio ir prisotinto atitinkamais santykiais pabėgių pjuvenomis substrato (1:12,5; 1:25; 1:37,5).
- Didėjant pabėgių pjuvenų kiekiui mažėjo kolonijų skaičius, o augalų, kurių vegetacijos pabaigoje būklė buvo labai bloga (*Portulaca oleracea*, *Poa annua*) – didžiausias kolonijų skaičius buvo vidutiniškai užterštame substrate augančių.
- Mažiausiai reaguojančių į taršalus *Lupinus luteus* ir *Tagetes patula* rizosferoje aptiktas didžiausias kolonijų skaičius, lyginant su analoginiais kitų augalų rizosferos variantais.
- Šie tyrimai yra pirminiai Lietuvoje tiriant grybų, kuriuos būtų galima pritaikyti pabėgių prisotintų kreozotu bioremediacijai, rūšis
- Išskirtos grybų rūšys dalyvaujančios bioremedijacijoje: *Trichoderma viride* (0–16.38 %), *Umbelopsis isabellina* (0–11.84 %), *Yarrowia lipolytica* (0–7.52 %) ir tolerantiškos *Aspergillus fumigatus* (0–7.74%), *Mucor hiemalis* (1.40–8.20%) (Tiso et al., 2015).



Profesoriaus Albino Lugausko
BIBLIOGRAFIJA

Vilnius, 2012

AČIŪ UŽ DĒMESĪ



2009.11.19