



**RODODENDRU UN TO SAKŅU ENDOFĪTISKO
SĒŅU MIJIEDARBĪBAS ANATOMISKI
FIZIOLOĢISKIE ASPEKTI UN IZMANTOŠANA
RODODENDRU PAVAIROŠANĀ**

**Promocijas darbs
bioloģijas doktora zinātniskā grāda iegūšanai
augu fizioloģijas apakšnozarē**

Darba autors: Kristīne Dokāne

Darba vadītājs: Dr. biol., asoc. prof. Uldis Kondratovičs

Darba konsultants: Dr. biol. Dace Megre

Rīga 2019

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Universitātes Bioloģijas fakultātē Augu fizioloģijas katedrā laika posmā no 2010. gada līdz 2019. gadam.



Promocijas darbs izstrādāts ar Eiropas Sociālā fonda projekta „Atbalsts doktora studijām Latvijas Universitātē ” Nr.2009/0138/ 1DP/1.1.2.1.2./ 09/IPIA/ VIAA/004 atbalstu.

Darbs sastāv no ievada, 4 nodaļām, secinājumiem, aizstāvēšanai izvirzītajām tēzēm, literatūras saraksta.

Darba forma: disertācija bioloģijas nozarē, augu fizioloģijas apakšnozarē

Darba zinātniskais vadītājs: Dr. biol., asoc. prof. Uldis Kondratovičs

Darba recenzenti:

- 1) **Traud Winkelmann**, Prof., Dr., Leibniz Universitāt Hannover;
- 2) **Nils Rostoks**, Dr. biol., asoc. prof., Latvijas Universitāte;
- 3) **Ina Alsina**, Dr. biol., prof., Latvijas Lauksaimniecības Universitāte

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2019. gada 2. decembrī plkst. 16.00 Latvijas Universitātes Bioloģijas nozares promocijas padomes atklātā sēdē LU Dabaszinātņu akadēmiskajā centrā, Rīgā, Jelgavas ielā 1, 702. auditorijā.

Ar promocijas darbu un tā kopsavilkumu var iepazīties Latvijas Universitātes Bibliotēkā Rīgā, Kalpaka bulvārī 4.

LU Bioloģijas zinātņu nozares promocijas

padomes priekšsēdētājs _____ / Prof. Ģederts Ieviņš/

promocijas padomes sekretāre _____ /Daina Eze/

KOPSAVILKUMS

Promocijas darba mērķis bija noskaidrot mūžzaļo rododendru vienpumpura spraudēņu ar lapu un audu kultūrā pavairotu dzinumū rizoģenēzes gaitu rododendru sakņu endofītisko sēņu ietekmē. Rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ trīsgadīga auga saknēm kolonizācija sasniedza 37–100% un saknes galvenokārt kolonizēja erikoīdās mikorizas sēnes. No saknēm izolēja *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cylindrocarpon*, *Mortierella*, *Penicillium*, *Trichoderma* ģintīm piederošas sēnes, *Calcarisporium arbuscula* Preuss, kā arī sterilus micēlijus. *In vitro* pavairotu rododendru dzinumiem bija raksturīga augsta anatomiskā heterogenitāte un pastāvēja būtiskas atšķirības anatomisko slāņu biezumā gan starp abām pētījumā izmantotajām šķirnēm, gan katras šķirnes ietvaros. Anatomiskajai uzbūvei, īpaši lūksnes un koksnes slāņa attiecībai bija būtiska ietekme uz adventīvo sakņu attīstību rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ dzinumiem *ex vitro*. Rododendru sakņu endofītiskajām sēnēm bija raksturīga atšķirīga ietekme uz dažādu rododendru šķirņu *in vitro* pavairotiem un inokulētiem dzinumiem. *Acremonium* ģints sēnēm bija negatīva vai neitrāla ietekme uz rododendru dzinumiem *in vitro*, kas bija atkarīgs gan no izmantotā endofīta izolāta, gan rododendru šķirnes. *Mortierella* sp. bija šķirnes specifiska ietekme uz rododendru dzinumiem un pigmentu koncentrāciju dzinumū lapās. *Calcarisporium arbuscula* veicināja rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ meristemoīdu attīstību *in vitro* un pozitīvi ietekmēja pigmentu koncentrāciju dzinumū lapās. Tai bija neitrāla ietekme uz rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ dzinumiem. Apsakņojot *in vitro* pavairotus un ar endofītiskajām sēnēm inokulētus rododendru dzinumū *ex vitro* apstākļos, *Calcarisporium arbuscula* un *Mortierella* sp. veicināja ātrāku adventīvo sakņu attīstību. Pētījumā par endofītisko sēņu ietekmi uz adventīvo sakņu attīstību rododendru vienpumpura spraudēņiem ar lapu rododendru šķirnei ‘Babītes Lavanda’ kontroles, indol-3-sviestskābes (ISS) un *Calcarisporium arbuscula* apstrādes variantiem anatomiskas un fizioloģiskas atšķirības adventīvo sakņu attīstībā nekonstatēja. Savukārt pēc spraudēņu apstrādes ar *Mortierella* sp. konstatēja ātrāku saknes aizmetņu attīstību, taču apsakņošanās procents bija zemāks nekā kontrolei. *Calcarisporium arbuscula* un ISS apstrāde veicināja spraudēņu izdzīvošanu ilgtermiņā. Rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ vienpumpura spraudēņiem ar lapu *Calcarisporium arbuscula* veicināja ātrāku saknes iniciāļu attīstību, kā arī šīs apstrādes ietekmē peroksidāzes aktivitāte spraudēņu lapās bija būtiski augstāka visa eksperimenta laikā. *Calcarisporium arbuscula* un ISS apstrādes pozitīvi ietekmēja spraudēņu apsakņošanās procentu. Rezultāti liecina par *Calcarisporium arbuscula* pozitīvu ietekmi un praktiskās pielietojamības potenciālu rododendru veģetatīvajā pavairošanā.

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the effect of root fungal endophytes on adventitious root development of *in vitro* propagated elepidote rhododendron shoots *ex vitro* and leaf bud cuttings. Colonization of a 3-year-old rhododendron cultivar ‘Babītes Lavanda’ roots was 37–100%, and roots were mostly colonized by fungi of ericoid mycorrhizae. Fungi from genera *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cylindrocarpon*, *Mortierella*, *Penicillium*, *Trichoderma* as well as *Calcarisporium arbuscula* Preuss and some sterile mycelia were isolated. High anatomical heterogeneity and a significant difference in anatomical layer thickness was observed in *in vitro* propagated shoots of both rhododendron cultivars as well as between both cultivars. Shoot anatomy, especially the phloem to xylem ratio, had a significant effect on *ex vitro* adventitious root development in rhododendron cultivar ‘Nova Zembla’. *In vitro* inoculation with rhododendron root fungal endophytes had a different effect on shoots of studied rhododendron cultivars. Fungi from genus *Acremonium* had a negative or neutral effect on rhododendron shoots *in vitro*, the effect was both strain and cultivar specific. *Mortierella* sp. had a cultivar specific effect on pigment concentration in leaves of rhododendron shoots *in vitro*. *Calcarisporium arbuscula* increased pigment concentration and promoted adventitious root meristemoid development *in vitro* in shoots of rhododendron cultivar ‘Nova Zembla’ and had a neutral effect on *in vitro* shoots of rhododendron cultivar ‘Babītes Lavanda’. During *ex vitro* rooting of *in vitro* propagated and inoculated rhododendron shoots *Calcarisporium arbuscula* and *Mortierella* sp. promoted adventitious root development. In the study on the effect of root fungal endophytes on adventitious root development in leaf-bud cuttings of rhododendron cultivar ‘Babītes Lavanda’ anatomical or physiological differences between control, indole-3-butyric acid (IBA) and *Calcarisporium arbuscula* treated leaf-bud cuttings were not observed. *Mortierella* sp. promoted faster root primordia development, but the overall rooting percentage was lower than in control cuttings, IBA and *Calcarisporium arbuscula* treatment promoted long-term survival of rooted cuttings. In leaf-bud cuttings of rhododendron cultivar ‘Nova Zembla’ *Calcarisporium arbuscula* promoted faster root initial development and significantly increased peroxidase activity during the whole experiment. IBA and *Calcarisporium arbuscula* had a positive effect on rooting percentage of leaf-bud cuttings. These results indicate on positive effect and potential of practical use of *Calcarisporium arbuscula* in rhododendron vegetative propagation by cuttings.

SATURS

IEVADS.....	7
1 LITERATŪRAS APSKATS.....	9
1.1 Rododendru ģints vispārīgs raksturojums	9
1.2 Rododendru dzinumu anatomiskais raksturojums.....	10
1.2.1 Rododendru viengadīga dzinuma anatomiskais raksturojums.....	10
1.2.2 Audu kultūrā pavairota rododendru dzinuma anatomiskais raksturojums	12
1.3 Rododendru veģetatīvā pavairošana	13
1.3.1 Rododendru pavairošana ar spraudņiem un to ietekmējošie faktori	13
1.3.2 Rododendru pavairošana audu kultūrā un to ietekmējošie faktori.....	15
1.4 Adventīvo sakņu attīstības anatomiskais raksturojums	17
1.5 Adventīvo sakņu attīstības fizioloģiskais raksturojums	19
1.6 Endofītu definīcija	25
1.7 Rododendru mikroorganismu vispārīgs raksturojums.....	28
1.8 Augu un mikroorganismu mijiedarbības anatomiskais, fizioloģiskais un bioķīmiskais raksturojums	29
1.9 Endofītu ietekme uz augiem	32
1.10 Endofītisko un mikorizālo sēņu izmantošana augu pavairošanā	33
2 MATERIĀLI UN METODES	36
2.1 Eksperimentos izmantotās šķirnes	37
2.2 Mūžzaļo rododendru sakņu mikroskopiskā izpēte	37
2.3 Mūžzaļo rododendru sakņu endofītisko sēņu izolēšana	38
2.4 Mūžzaļo rododendru veģetatīvās pavairošanas metodes	39
2.4.1 Rododendru dzinumu pavairošana <i>in vitro</i> un endofītu inokulācija.....	39
2.4.2 <i>In vitro</i> pavairotu rododendru dzinumu apsākšana <i>ex vitro</i>	39
2.4.3 Rododendru pavairošana ar vienpumpura spraudņiem ar lapu	40
2.5 Anatomisko preparātu pagatavošana un izpēte.....	41
2.6 Pigmentu koncentrācijas spektrofotometriska noteikšana.....	43
2.7 Gvajakola peroksidāzes aktivitātes spektrofotometriska noteikšana.....	43
2.8 Datu statistiskā analīze	44
3 REZULTĀTI.....	45
3.1 Endofītiskās sēnes mūžzaļo rododendru saknēs	45
3.1.1 Sakņu kolonizācijas novērtējums.....	45
3.1.2 No mūžzaļo rododendru saknēm izolētās endofītiskās sēnes	47
3.2 <i>In vitro</i> pavairotu mūžzaļo rododendru dzinumu anatomiskā uzbūve.....	48
3.3 Adventīvo sakņu veidošanās <i>ex vitro</i> anatomiskais raksturojums <i>in vitro</i> pavairotiem mūžzaļo rododendru dzinumiem	50
3.4 Endofītisko sēņu ietekme uz mūžzaļajiem rododendriem <i>in vitro</i>	54

3.4.1 Endofītisko sēņu ietekme uz mūžzaļo rododendru dzinumu vizuālo stāvokli un pigmentu koncentrāciju	54
3.4.2 Anatomiskās izmaiņas mūžzaļo rododendru dzinumos endofītisko sēņu ietekmē <i>in vitro</i> apstākļos.....	57
3.5 <i>In vitro</i> pavairotu mūžzaļo rododendru dzinumu <i>ex vitro</i> apsākšanās sakņu endofītisko sēņu ietekmē	69
3.5.1 Ar adventīvo sakņu veidošanos nesaistītie anatomiskie novērojumi.....	71
3.6 Endofītisko sēņu ietekme uz anatomiskajiem un fizioloģiskajiem procesiem mūžzaļo rododendru vienpumpura sprauņos ar lapu rizoģenēzes laikā	72
3.6.1 Endofītisko sēņu ietekme uz rizoģenēzes procesa anatomisko norisi mūžzaļo rododendru vienpumpura sprauņos ar lapu.....	72
3.6.2 Endofītisko sēņu ietekme uz gvajakola peroksidāzes aktivitātes izmaiņām mūžzaļo rododendru vienpumpura sprauņos ar lapu rizoģenēzes laikā	76
4 DISKUSIJA	79
4.1 Mūžzaļo rododendru sakņu kolonizācija un sakņu endofītiskās sēnes.....	79
4.2 <i>In vitro</i> pavairotu mūžzaļo rododendru dzinumu anatomiskā uzbūve un <i>ex vitro</i> rizoģenēzes anatomiskais raksturojums.....	82
4.3 Endofītisko sēņu ietekme uz <i>in vitro</i> pavairotiem mūžzaļo rododendru dzinumiem ...	86
4.4 Endofītisko sēņu ietekme uz <i>in vitro</i> pavairotu mūžzaļo rododendru dzinumu apsākšanos <i>ex vitro</i>	88
4.5 Endofītisko sēņu ietekme uz adventīvo sakņu attīstību mūžzaļo rododendru vienpumpura sprauņiem ar lapu.....	89
SECINĀJUMI.....	94
AIZSTĀVĒŠANAI IZVIRZĪTĀS TĒZES.....	96
PATEICĪBAS	97
LITERATŪRAS SARAKSTS.....	98

IEVADS

Rhododendri (*Rhododendron* L.) ir ēriku dzimtas (Ericaceae L.) augi, kas savu dekoratīvo īpašību, ziedu formas un krāsas un augu izmēra dažādības dēļ, ir vieni no Eiropas pilsētu apstādījumu un privāto dārzu labiekārtošanā visbiežāk izmantotajiem dekoratīvajiem kokaugiem. Kopš 1957. gada rododendru introdukcijas un selekcijas darbu veic Latvijas Universitātes Botāniskajā dārzā un kopš 1980. gada arī Latvijas Universitātes (LU) Rododendru selekcijas un izmēģinājumu audzētavā "Babīte". Līdz 2018. gadam LU ir izaudzētas un Starptautiskajā rododendru šķirņu reģistrā reģistrētas selekcionētas 117 brīvdabas rododendru šķirnes.

Rhododendru, kā visu ēriku dzimtas augu, saknēm raksturīga kolonizācija ar erikoīdās mikorizas sēnēm, kas saimniekaugiem palīdz izdzīvot to dabiskajos augšanas apstākļos ar raksturīgu zemu substrāta pH, zemu temperatūru un substrāta relatīvo mitruma līmeni. Šīs sēnes pētītas arī saistībā ar to izmantošanu saimniekaugu veģetatīvajā un ģeneratīvajā pavairošanā. Taču bez erikoīdās mikorizas sēnēm rododendru saknēs sastopamas arī endofītiskās sēnes, kas visu savu dzīves ciklu vai kādu tā daļu pavada saimniekauga saknēs, neizsaucot acīmredzamus bojājumus.

Augu endofīti ir plaši pētīti to augu augšanu un biotiskā un abiotiskā stresa izturību veicinošo īpašību dēļ, kas paver plašas šo mikroorganismu praktiskā pielietojuma iespējas. Turklāt endofītiskajām sēnēm raksturīga spēja sintezēt virkni bioloģiski aktīvu savienojumu, kas var būt gan fitohormoni vai fitohormonu dabas savienojumi, gan savienojumi ar antimikrobiālu iedarbību. Tādējādi šo simbiotu izmantošana augu pavairošanā var sniegt iespēju iegūt veselīgāku, izturīgāku augu materiālu. Īpaši saistoša ir endofītu izmantošana augu audu kultūrā, kas tīri teorētiski ļautu iegūt ar labvēlīgiem mikroorganismiem inokulētu stādu materiālu, kas savukārt atvieglotu šo augu aklimatizācijas procesu *ex vitro* apstākļos. Literatūrā trūkst informācijas par rododendru sakņu endofītiskajām sēnēm, turklāt endofītu pielietojums klasiskajā augu veģetatīvajā pavairošanā nav pētīts vispār.

Promocijas darba mērķis bija noskaidrot mūžzaļo rododendru vienpumpura spraudēnu ar lapu un audu kultūrā pavairotu dzinumumu rizoģenēzes gaitu rododendru sakņu endofītisko sēņu ietekmē.

Atbilstoši darba mērķim izvirzīti šādi uzdevumi:

- 1) analizēt mūžzaļo rododendru sakņu kolonizāciju un izolēt mūžzaļo rododendru saknes kolonizējošās endofītiskās sēnes;
- 2) noskaidrot audu kultūrā pavairotu mūžzaļo rododendru dzinumumu anatomisko uzbūvi;

- 3) analizēt anatomiskos procesus *in vitro* pavairotu mūžzaļo rododendru dzinumu adventīvo sakņu attīstības laikā *ex vitro*;
- 4) izvērtēt sakņu endofītisko sēņu ietekmi uz divu mūžzaļo rododendru šķirņu *in vitro* pavairotiem dzinumiem un pigmentu daudzumu dzinumu lapās;
- 5) pētīt sakņu endofītisko sēņu ietekmi uz *in vitro* pavairotu mūžzaļo rododendru dzinumu adventīvo sakņu attīstību *ex vitro* apstākļos;
- 6) noskaidrot sakņu endofītisko sēņu ietekmi uz divu mūžzaļo rododendru šķirņu vienpumpura spraudēņu ar lapu adventīvo sakņu attīstību un peroksidāzes aktivitātes izmaiņām rizoģenēzes laikā.

1 LITERATŪRAS APSKATS

1.1 Rododendru ģints vispārīgs raksturojums

Rododendru ģints (*Rhododendron* L.) pieder ēriku dzimtai (Ericaceae L.), kas ir viena no lielākajām un izplatītākajām divdīgļlapju kokaugu ģintīm. Pasaulē sastopamas 1025 rododendru sugas. Rododendru ģints galvenokārt izplatīta Ziemeļu puslodes aukstajos un mērenajos apgabalos, kā arī Ziemeļaustrumāzijā un Dienvidaustrumāzijā (Chamberlain et al. 1996). Ķīnā, Tibetā, Mjanmā, Indijā un Nepālā konstatētas vairāk nekā 700 rododendru sugas, savukārt Eiropā sastopamas tikai septiņas sugas – *Rhododendron ferrugineum*, *Rhododendron hirsutum*, *Rhododendron kotschyi*, *Rhododendron lapponicum*, *Rhododendron luteum*, *Rhododendron ponticum* (Chamberlain et al. 1996), kā arī Latvijā sastopamais *Rhododendron tomentosum* Harmaja (Harmaja 1991). Pēc morfoloģiskajām pazīmēm rododendru ģinti iedala astoņās apakšģintīs: *Rhododendron*, *Hymenanthes*, *Pentanthera*, *Tsutsusi*, *Azaleastrum*, *Candidastrum*, *Mumeazalea* un *Therorhodion* (Chamberlain et al. 1996). Aptuveni 90 % no visām rododendru sugām pieder Āzijas apakšģintīm *Rhododendron*, *Hymenanthes* un *Tsutsusi* (Goetsch et al. 2005).

Rododendru ģints pārstāvji ir pundurkrūmi, krūmi vai dažkārt arī koki, un to augstums atkarībā no sugas variē no dažiem centimetriem līdz pat 30 m (Terzioğlu et al. 2001, Kondratovičs 2005). Tiem raksturīgas vasarzaļas, daļēji mūžzaļas vai mūžzaļas, ādainas, kātainas lapas; tās novietotas pamīšus un izmēru ziņā var variēt no 1–60 cm. Lapu malas ir gludas, dažkārt klātas ar matiņiem (Kondratovičs 2005, Popescu and Kopp 2013).

Ziedi ir kātaini, sakārtoti vairogveida ķekaros, retāk pa vienam vai dažiem, parasti attīstās no galotnes pumpuriem, dažkārt arī no sānpumpuriem. Vainaglapas un kauslapas ir saaugušas. Ziedu diametrs atkarībā no sugas variē no 1–20 cm. Rododendru ģintī pastāv ļoti liela ziedu krāsu dažādība, un tie var būt balti, rožaini, sarkani, violeti, dzelteni, oranži, purpura ar dažādiem pārejas toņiem un nokrāsām (Kondratovičs 2005), bieži novērojami arī kontrastējoši plankumi (Cullen 2005).

Auglis ir ovālas vai iegarenas formas pogaļa, kas atveras daļēji vai visā garumā. Sēklu ir daudz un tās ir gaiši vai tumši brūnas, spīdīgas, 0,5–2 mm garas (Kondratovičs 2005).

Pirmā rakstiskā liecība par rododendriem datējama ar 401. g. p. m. ē. un ietver informāciju par rododendru medus toksiskajām īpašībām (Gunduz et al. 2007). Rododendriem zināms pielietojums arī tautas medicīnā iekaisuma, sāpju, saaukstēšanās simptomu un gremošanas traucējumu ārstēšanā (Popescu and Kopp 2013). Taču mūsdienās šī ģints Eiropā un Amerikā ir plaši pazīstama tieši tās dekoratīvo īpašību dēļ. Rododendrus kā kultūraugus sāka izmantot

17. gs. otrajā pusē, un līdz šim hibridizācijas un selekcijas rezultātā radītas daudz un dažādas šķirnes, kas ir piemērotas audzēšanai dažādos klimatiskajos apstākļos (Kondratovičs 2005, Bhattacharyya 2011). Latvijā šīs ģints introdukcija sākusies 19. gs. divdesmitajos gados (Kondratovičs 2005) un, pēc šobrīd pieejamajiem Latvijas Universitātes (LU) Rododendru selekcijas un izmēģinājumu audzētavas “Babīte” datiem, Latvijā selekcionētas 117 starptautiski apstiprinātas rododendru šķirnes – 52 vasarzaļie un 65 mūžzaļie rododendri.

1.2 Rododendru dzinumu anatomiskais raksturojums

1.2.1 Rododendru viengadīga dzinuma anatomiskais raksturojums

Mūžzaļo rododendru viengadīgiem dzinumiem raksturīga sekundārā uzbūve, un tos veido epiderma, miza, lūksne, kambijs, sekundārā koksne, primārā koksne un serde (Kondratovičs und Megre 1999, Strzelecka 2007, Megre 2011).

Epiderma kā primārie segaudi sākotnēji sedz visus augu orgānus – saknes, stumbru, lapas, ziedus, augļus un sēklas, un tai bieži raksturīgs kutikulas slānis (Evert 2006). Mūžzaļo rododendru viengadīgiem dzinumiem raksturīga epiderma. To veido viens šūnu slānis, ko no ārpuses sedz kutikula (Kondratovičs und Megre 1999, Megre 2011). Dažu mūžzaļo rododendru sugu viengadīgiem dzinumiem, piemēram, *Rhododendron smirnowii*, novēroti arī epidermas izaugumi – trihomī (Еремин и Бойко 1998, Tezgül Çakir et al. 2005). Sākoties sekundārajai augšanai, stumbriem un saknēm epidermu nomaina sekundārie segaudi – periderma (Evert 2006), kas rododendriem veidojas primārajā lūksnē zem lūksnes šķiedru gredzena (Еремин и Бойко 1998). Peridermu veido korķa kambijs (fellogēns), korķa miza (felloiderma) un korķis (fellēma) (Evert 2006).

Starp epidermu un lūksni atrodas miza, ko veido kolenhīma, primārās mizas parenhīma un endoderma (Fahn 1990). Rododendriem raksturīga plātņu kolenhīma, ko veido 3–4 blīvi sakārtotu, dzīvu šūnu slāņi, bez starpsūnu telpām, ar šūnām raksturīgiem tangenciāli uzbiezinātiem primārajiem šūnapvalkiem (Kondratovičs und Megre 1999, Tezgül Çakir et al. 2005). Kolenhīma ir mehāniskie audi, kas nodrošina balsta funkciju jauniem augu orgāniem (Evert 2006). Zem kolenhīmas lielāko mizas daļu aizņem mizas parenhīma, ko veido lielas irdeni izkārtotas šūnas ar plāniem šūnapvalkiem. Mizai raksturīgas lielas starpsūnu telpas, un tās šūnās dažkārt ir novērojami kalcija oksalāta kristāli – drūzas (Kondratovičs und Megre 1999, Tezgül Çakir et al. 2005, Megre 2011). Parenhīmas šūnas ir relatīvi maz diferencētas, un to meristemātiskā aktivitāte netiek pārtraukta, respektīvi, šīs šūnas var dediferencēties, dalīties un

rediferencēties, kas ir īpaši svarīgi ievainojumu dzīšanas, reģenerācijas, adventīvo sakņu un dzinumu veidošanas, kā arī potējumu saaugšanas laikā. Šāda iezīme ir raksturīga visām parenhimatiskajām šūnām (Evert 2006). Iekšējais mizas slānis ir endoderma, ko literatūrā mēdz aprakstīt arī kā cietes maksti (Fahn 1990). Mūžzaļajiem rododendriem šis šūnu slānis nav īpaši izteikts, un to veido blīvi sakārtotas, dzīvas šūnas (Megre 2011).

Zem endodermas atrodas lūksne, ko veido sietstobri, pavadītājšūnas, lūksnes parenhīma un lūksnes šķiedras jeb sklerenhīma. Pēc izcelsmes lūksne iedalāma primārajā un sekundārajā lūksnē. Primārā lūksne veidojas no prokambija auga primārās augšanas laikā, savukārt vēlāk no kambija attīstās sekundārā lūksne. Lūksne kalpo cukuru, aminoskābju, mikroelementu, lipīdu, hormonu, proteīnu, RNS un signālmolekulu transportam (Evert 2006). Sietstobri ir prozenhimatiskas šūnas, kas savstarpēji savienotas ar sietplātnītēm. Tiem līdzās atrodas pavadītājšūnas, kas ir ontogēnētiski un fizioloģiski saistītas ar sietstobru posmiem (Fahn 1990). Sklerenhīma ir mehāniskie audi, ko veido nedzīvas šūnas ar uzbiezinātiem un pārkoksnētiem šūnapvalkiem (Beck 2005). Rododendriem sklerenhīma var veidot pārtrauktu vai nepārtrauktu gredzenu (Еремин и Бойко 1998). Sekundārie meristematiskie audi – kambijs, tāpat kā primārā lūksne un koksne, attīstās no prokambija, un to veido dažas šūnu kārtas (Fahn 1990). Mūžzaļajiem rododendriem kambiju veido divas šūnu kārtas (Megre 2011). Kambija šūnām daloties, veidojas sekundārā lūksne un sekundārā koksne (Evert 2006).

Rododendru koksni veido trahejas, traheīdas, koksnes šķiedras un parenhīmas šūnas, un tā pilda ūdens un tajā izšķīdušo vielu transporta funkciju (Merev and Yavuz 2000). Trahejas veido atsevišķi ar perforācijām savienoti posmi, tādējādi veidojoties tieviem, gariem kapilāriem. Šie posmi ir nedzīvi, un tiem ir raksturīgi lignificēti sekundārie šūnapvalki ar porām. Savukārt traheīdas ir atsevišķas, nedzīvas šūnas ar lignificētiem sekundārajiem šūnapvalkiem, un tām nav raksturīgas perforācijas. Koksnes šķiedras jeb libriforms ir garas šūnas ar nelielu diametru, pārkoksnētu, uzbiezinātu šūnapvalku un smailu galu (Beck 2005). Koksnes parenhīmas šūnas kalpo rezerves barības vielu uzkrāšanai, un dažkārt tajās novērojami arī kristāliskie ieslēgumi vai tannīnu uzkrāšanās. Tannīnu uzkrāšanās notiek dzeltenu, sarkanu vai brūnu, smalku vai rupju graudainu struktūru formā. Radiālo transportu starp koksni un lūksni nodrošina sekundārie stari (Evert 2006).

Stumbra centrālajā daļā atrodas serde, ko veido lielas, irdeni sakārtotas, parenhimatiskas šūnas. Tajā mēdz uzkrāties rezerves barības vielas, dažkārt novērojamas arī drūzas (Fahn 1990).

1.2.2 Audu kultūrā pavairota rododendru dzinuma anatomiskais raksturojums

Literatūrā ir maz informācijas par audu kultūrā audzētu rododendru dzinumu anatomisko uzbūvi, un tā līdz šim pieminēta tikai adventīvo sakņu veidošanās kontekstā (Elmongy et al. 2018b). Taču augšana augu audu kultūras apstākļos būtiski atšķiras no dabīgajiem apstākļiem, un tāpēc audu kultūrā audzētu augu lapām un stumbriem vērojamas dažādas anatomiskas īpatnības, kas nav raksturīgas augiem *in vivo* (Robinson et al. 2009). Piemēram, lapām var būt plānāka kutikula, vāji attīstītas zedeņu parenhīmas šūnas, kurās ir mazāk hloroplastu un starp kurām ir plašākas starpšūnu telpas. Savukārt dzinumiem ir vāji attīstīti mehāniskie audi un vadaudi (Shekhawat and Manokari 2018).

Audu kultūrā pavairotu kokaugu dzinumu anatomiskā uzbūve ir līdzīga *in vivo* dzinumu anatomiskajai uzbūvei. *In vitro* pavairotus rododendru dzinumus veido epiderma, miza, atsevišķos kūlīšos vai gredzenā sakārtoti vadaudi, ko veido lūksne, kambijs un koksne. Dzinumu centrālajā daļā atrodas serde (Elmongy et al. 2018b). *Olea europea* (Macedo et al. 2013), *Cedrela odorata* (Millán-Orozco et al. 2011), *Alnus glutinosa* (San-José et al. 2012), *Gardenia jasminoides* (Hatzilazarou et al. 2006), *Betula pendula* (Iliev et al. 2001) u. c. audu kultūrā pavairotu kokaugu dzinumiem parasti raksturīgi primārie segaudi – epiderma, taču dažām sugām, piemēram, *Cotinus coggygria* (Ilczuk and Jacygrad 2016) un *Trachelospermum asiaticum* (Apter et al. 1993) *in vitro* novēroti arī sekundārie segaudi – periderma. Mizas parenhīmas šūnas bieži ir hipertrofētas (Paunescu 2008, Shekhawat and Manokari 2018). Zem epidermas *Malus domestica* šķirnei ‘Gala’ (Harbage et al. 1993), *Quercus robur* (San-José et al. 1992) un *Cotinus coggygria* (Ilczuk and Jacygrad 2016) *in vitro* pavairotiem dzinumiem novērota kolenhīma, savukārt, *Castanea sativa* (Ballester et al. 1999), *Betula pendula* (Iliev et al. 2001) un *Cedrela odorata* (Millán-Orozco et al. 2011) tā *in vitro* neattīstās. Lūksnes šķiedras jeb sklerenhīma konstatēta *Castanea sativa* (Ballester et al. 1999), *Quercus robur* (San-José et al. 1992), *Betula pendula* (Iliev et al. 2001), *Cedrela odorata* (Millán-Orozco et al. 2011) un *Alnus glutinosa* (San-José et al. 2012) *in vitro* pavairotiem dzinumiem. Savukārt *Olea europeae* (Macedo et al. 2013) *in vitro* pavairotiem dzinumiem nav konstatēta ne kolenhīma, ne sklerenhīma. Stumbra centrālo daļu veido koksne, lūksne un serde. Dažādu sugu kokaugiem vadaudu attīstība *in vitro* apstākļos notiek lēnāk, piemēram, *Castanea sativa* (Ballester et al. 1999), *Malus domestica* šķirnei ‘Gala’ (Harbage et al. 1993) un *Quercus robur* (San-José et al. 1992) novērojami kūlīšos izkārtoti vadaudi, kas stumbra centrā veido pārtrauktu gredzenu. Savukārt *Olea europea* (Macedo et al. 2013), *Cedrela odorata* (Millán-Orozco et al. 2011) un *Alnus glutinosa* (San-José et al. 2012) vadaudi izkārtoti gredzenā.

Izmaiņas *in vitro* audzētu augu stumbros un lapās saistītas ar augsto mitruma līmeni audu kultūrā, kā arī ar gaisa un barotnes sastāvu, kas kavē lignifikāciju un kutikulas veidošanos (Paunescu 2008), taču padziļinātu pētījumu šajā virzienā trūkst.

1.3 Rododendru veģetatīvā pavairošana

Veģetatīvās pavairošanas metodes ir augu pavairošanas metožu kopums, kas sevī ietver augu pavairošanu, izmantojot lapas, dzinumus un saknes. Tās rezultātā pavairotajam materiālam saglabājas noteikts genotips, tiek iegūta vienviedīga populācija, un pavairoto augu attīstības periods līdz ziedēšanai ir īsāks nekā ar sēklām pavairotiem augiem (Hartmann et al. 2014). Rododendru šķirņu vai hibrīdu pavairošanai, lai nodrošinātu visu mātesauga pazīmju un īpašību pārmantošanu, var izmantot tikai veģetatīvās pavairošanas metodes (Kondratovičs u. c. 2010). Rododendrus veģetatīvi pavairo ar spraudeņiem, noliekteņiem, kā arī potējot, dalot un ar klonālās mikropavairošanas metodēm (Kondratovičs u. c. 2010, Hartmann et al. 2014). Par efektīvāko veģetatīvās pavairošanas metodi uzskata pavairošanu ar spraudeņiem (Navrocka-Grzeškowiak 2004, Strzelecka 2007, Eeckhaut et al. 2010). Savukārt klonālās mikropavairošanas metodes sniedz iespēju iegūt lielu skaitu no vīrusiem brīvu augu, kā arī ļauj saglabāt retos rododendru taksonus (Almeida et al. 2005, Hartmann et al. 2014).

1.3.1 Rododendru pavairošana ar spraudeņiem un to ietekmējošie faktori

Veģetatīvajā pavairošanā ar spraudeņiem var izmantot dzinuma spraudeņus vai vienpumpura spraudeņus ar lapu, kā arī sakņu un lapu spraudeņus. Vienpumpura spraudeņi ar lapu sastāv no lapas, dzinuma fragmenta un paduses pumpura. No praktiskā pielietojuma viedokļa tie ir izdevīgāki nekā dzinumu spraudeņi, jo ļauj iegūt lielāku jauno augu skaitu (Hartmann et al. 2014).

Noteicošie faktori veiksmīgai spraudeņu rizoģenēzei ir mātesauga īpašības un tā augšanas apstākļi, kā arī apstrāde pirms spraudeņu iegūšanas, un spraudeņu fizioloģiskais stāvoklis spraudeņošanas brīdī un to apstrāde ar rizoģenēzes stimulatoru, kā arī vides apstākļi apsākšanās laikā (Hartmann et al. 2014).

Spraudeņu apsākšanās spēju var ietekmēt mātes auga ģenētiskās, bioķīmiskās un fizioloģiskās īpašības (Osterc 2009). Mātes auga endogēnā augsība, ogļhidrātu,

minerālelementu, fenolu un citu savienojumu koncentrācija ir pakļauta tiešai vides faktoru, piemēram, gaismas un temperatūras apstākļu, kā arī pieejamā ūdens un minerālelementu ietekmei, un attiecīgi saglabājas arī spraudeņos (da Costa et al. 2013, Hartmann et al. 2014). Būtiska ietekme uz apsakņošanas var būt arī mātesauga vecumam un spraudeņa pozīcijai uz mātes auga. No juvenīla mātesauga bazālās daļas ņemtiem *Dalbergia melanoxylon* spraudeņiem ir augstāks apsakņošanās procents, sakņu skaits un to garums, salīdzinot ar no nobrieduša mātesauga iegūtiem spraudeņiem (Amri et al. 2010).

Spraudeņa atdalīšana no mātes auga un ievainojuma izveidošanās veicina dzīšanas procesam nepieciešamo ogļhidrātu un augsnes uzkrāšanos ievainojuma tuvumā. Dažiem dekoratīvo kokaugu taksoniem, piemēram, rododendriem vai *Juniperus* sp., ir vēlams veikt papildievainojumu, jo tas veicina adventīvo sakņu attīstību (Hartmann et al. 2014). Pastāv arī uzskats, ka ievainojuma rezultātā tiek pārtraukts sklerenhīmas gredzens (Hartmann et al. 2014), kas kalpo kā anatomiska barjera adventīvo sakņu attīstībai (Altamura 1996). Taču pētījumos ar *Quercus bicolor* un *Quercus macrocarpon* dzinumu spraudeņiem, rododendru vienpumpura spraudeņiem ar lapu un *in vitro* pavairotiem *Alnus glutinosa* dzinumiem konstatēts, ka pārtraukts vai nepārtraukts sklerenhīmas gredzens rizoģenēzes procesu neietekmē (Amissah et al. 2008, Megre et al. 2011, San-José et al. 2012). Arī spraudeņu lapu skaitam vai to virsmas laukumam ir ietekme uz rizoģenēzi, kas saistāma ar bazipetālu ogļhidrātu un augsnes transportu adventīvo sakņu attīstības laikā. Taču zināms arī, ka fotosintētiskie procesi līdz saknes aizmetņu attīstības brīdim notiek ar zemāku intensitāti. Lai rizoģenēzes laikā samazinātu transpirāciju un ar to saistīto ūdens zudumu, rododendru spraudeņu lapas var samazināt par 1/2 vai 1/3 (Hartmann et al. 2014, Ferus et al. 2017). Savukārt no spraudeņu ņemšanas laika atkarīga to lignifikācijas pakāpe, kas arī var ietekmēt adventīvo sakņu attīstību. Rododendru dzinumu spraudeņiem novērota apsakņošanās procenta samazināšanās, palielinoties spraudeņu lignifikācijas pakāpei (Nawrocka-Grześkowiak and Grześkowiak 2003).

Rizoģenēzes procesa norisē un fāzu regulācijā ir iesaistīti visi fitohormoni, taču noteicoša loma ir tieši augsnim jeb indol-3-etilkskābei (IES), kas ir īpaši svarīga adventīvo sakņu attīstības sākumā (Kevers et al. 1997). Augsnis sintezējas no triptofāna lapu aizmetņos un jaunās lapās, kā arī attīstošās sēklās un tiek transportēts pa kambiju un lūksni uz tā darbības vietām. Augsnes galvenās funkcijas augā ir šūnu dalīšanās un vadaudu diferenciācijas stimulēšana, apikālās dominēšanas un tropisko atbilžu regulācija, sakņu iniciācija u.c. (Davies 2004). Endogēnā augsne, IES, regulatorā loma adventīvo sakņu veidošanās procesā zināma sen, un mūsdienās tas ir viens no visplašāk izmantotajiem eksogēnajiem rizoģenēzes stimulatoriem. Nereti rododendru un citu kokaugu spraudeņu apsakņošanai izmanto dažādus

sintētiskus auksīna dabas rizoģenēzes stimulatorus, piemēram, indol-3-sviestskābi (ISS) vai naftiletiķskābi (NES) (de Klerk et al. 1999). Piemēram, *Rhododendron keleticum* šķirne ‘Robert Seleger’ apsakņojas 100% gan pēc 1% ISS, gan 1% IES apstrādes kūdras – perlīta substrātā vai TS1 komerciālajā substrātā. Savukārt *Rhododendron impeditum* šķirnei ‘Purple Pillow’ kūdras – perlīta substrātā pēc apstrādes ar IES apsakņojas 67% spraudeņu. Vairumam rododendru genotipu augstāku apsakņošanās procentu iespējams iegūt pēc spraudeņu apstrādes ar ISS (Navrocka-Grzeškowiak 2004, Ferus et al. 2017), taču ir arī genotipi, kuriem labāks apsakņošanās procents iegūstams pēc apstrādes ar NES, piemēram, *Rhododendron smirnowii*. Daudziem rododendru genotipiem NES veicina kallusu attīstību (Ferus et al. 2017). Mūžzaļo rododendru spraudeņu apsakņošanai vispiemērotākais rizoģenēzes stimulators ir 0,5–4% ISS, tās izmantošana nodrošina ne tikai augstāku apsakņošanās procentu, bet arī lielāku sakņu kamolu (Navrocka-Grzeškowiak 2004, Ferus et al. 2017).

Apsakņošanās procesa norisei būtiski ievērot piemērotu augu materiāla iegūšanas laiku, apstrādi un pavairošanas substrātu, kā arī spraudeņu rizoģenēzes laikā izmantot piemērotu gaismas intensitāti, gaisa temperatūru un relatīvo mitrumu (Navrocka-Grzeškowiak 2004, Ferus et al. 2017). Vispiemērotākais laiks mūžzaļo rododendru pavairošanai ar spraudeņiem ir veģetācijas perioda beigās, izmantojot kūdras un perlīta maisījumu tilpuma attiecībā 1:1 vai 3:2, pH 4,5 (Holt et al. 1998, Hartmann et al. 2014). Ieteicamā substrāta temperatūra ir 21–24 °C (McMillan Browse 1983, Hartmann et al. 2014). Kokaugu spraudeņiem nepieciešamais ūdens daudzums ir atkarīgs no spraudeņu pārkoksnēšanās pakāpes, tai palielinoties, nepieciešamais mitruma līmenis samazinās (Hartmann et al. 2014). Pētījumos par apgaismojuma ietekmi uz apsakņošanos nav konstatēta pieaugoša noēnojuma ietekme uz mūžzaļo rododendru spraudeņu apsakņošanās procentu, taču 95% spraudeņu noēnojuma ietekmē samazinās sakņu kamola diametrs, salīdzinot ar 0% vai 55% noēnojumu (Davis and Potter 1987). Savukārt pētījumos par fotoperioda ietekmi uz rododendru apsakņošanos konstatēts, ka apsakņošanās atkarīga no augšanas stimulatoru apstrādes, nevis no fotoperioda (Tallman and Meyer 1980).

1.3.2 Rododendru pavairošana audu kultūrā un to ietekmējošie faktori

Rododendrus pavairo arī ar klonālās mikropavairošanas metodēm, kas dod iespēju iegūt lielu skaitu no vīrusiem brīva augu materiāla, kā arī ļauj pavairot grūti apsakņojamas šķirnes.

Mikropavairošanai ir četri posmi: ievadīšana, dzinumu pavairošana, apsākņošana un aklimatizācija (Hartmann et al. 2014).

Rododendrus audu kultūrā var ievadīt, izmantojot virsmas sterilizētus veģetatīvo dzinumu fragmentus ar sānpumpuriem, veģetatīvo pumpuru meristēmas, ziedu struktūras (sēklotni vai sēklaizmetņus) vai sēklas (Gertnere and Tomsone 1996, Tomsone and Gertnere 2003, Eeckhaut et al. 2010). Novērots, ka veiksmīgāka kalusoģenēzes iniciācija un kallusu proliferācija notiek, ja rododendru ievadīšanai kultūrās izmantoti veģetatīvie vai ģeneratīvie pumpuri, turklāt tieši ģeneratīvo pumpuru izmantošana ievērojami samazina infekcijas risku (Tomsone and Gertnere, 1994). Savukārt dzinumu attīstībai iespējams izmantot dažādas ziedu daļas, taču kā labākais eksplants dzinumu attīstībai ir ziedgultne vai ziedgultne kopā ar ziedkātu (Gertnere and Tomsone 1996). Dzinumu attīstībai no eksplanta izmanto taksonam piemērotu barotni, rododendriem – Andersona barotni (Anderson 1984), ar pievienotu saharozi un piemērotu augsīna : citokinīnu attiecību (Hartmann et al. 2014) un barotnes pH 4–5,5 pirms autoklavēšanas (Gertnere and Tomsone 1996). Rododendru dzinumu attīstībai *in vitro* izmantojams citokinīns 2-izopenteniladenīns (2iP) kombinācijā ar IES (Gertnere and Tomsone 1996).

Attīstījušos dzinumus ar divposmu spraudējiem pavairo uz Andersona barotnes, kas satur citokinīnus, piemēram, 2iP vai zeatīnu, un augsīnu, piemēram, IES (Gertnere and Tomsone 2003, Almeida et al. 2005, Eeckhaut et al. 2010).

In vitro pavairotus dzinumus apsākņo gan *in vitro* (Almeida et al. 2005, Eeckhaut et al. 2010), gan *ex vitro* apstākļos (Almeida et al. 2005). Audu kultūrā pavairotu dzinumu apsākņošanās sekmes *in vitro* vai *ex vitro* apstākļos, līdzīgi kā pavairojot ar spraudējiem, ir atkarīgas no izmantotā rizoģenēzes stimulatora veida un koncentrācijas, kā arī ir specifiskas konkrētai sugai vai šķirnei (Almeida et al. 2005). Pavairotu dzinumu apsākņošanai *in vitro* nepieciešams samazināt barotnes citokinīnu koncentrāciju un palielināt augsīna koncentrāciju (Hartmann et al. 2014). Apsākņošanas *in vitro* apstākļos būtiski uzlabot var arī īslaicīga dzinumu apstrāde ar ISS vai NES un tālāka apsākņošana bezauksīna vidē (Almeida et al. 2005). Taču, līdzīgi kā klasiskiem spraudējiem, arī audu kultūrā pavairotiem dzinumiem lielāks apsākņoto dzinumu procents un sakņu skaits ir pēc apstrādes ar ISS (Elmongy et al. 2018a). Praksē biežāk izmanto audu kultūrā pavairotu dzinumu *ex vitro* apsākņošanu, kas ir ekonomiski izdevīgāka, salīdzinot ar apsākņošanu *in vitro* (Almeida et al. 2005). Tās laikā audu kultūrā pavairotie dzinumi tiek apsākņoti siltumnīcā apsākņošanas substrātā augsta mitruma apstākļos (Hartmann et al. 2014). Saknēm, kas attīstījušās *ex vitro* apstākļos, raksturīga labāk attīstīta vadaudu sistēma un mazāk hipertrofētas mizas parenhīmas šūnas, salīdzinot ar saknēm, kas

attīstījušās *in vitro* apstākļos. Turklāt pēc pārstādīšanas substrātā *in vitro* apsakņotu augu saknes mēdz iet bojā (Hartmann et al. 2014).

Aklimatizācijas posma laikā apsakņotie dzinumi pakāpeniski pielāgojas vides apstākļiem. *In vitro* apsakņotos augus izstāda substrātā un pakāpeniski pielāgo zemākam relatīvajam gaisa mitrumam un augstākai gaismas intensitātei. Uzskata, ka *ex vitro* apsakņotiem augiem šis posms notiek vieglāk, jo daļēja pielāgošanās notiek jau apsakņošanās laikā (Hartmann et al. 2014).

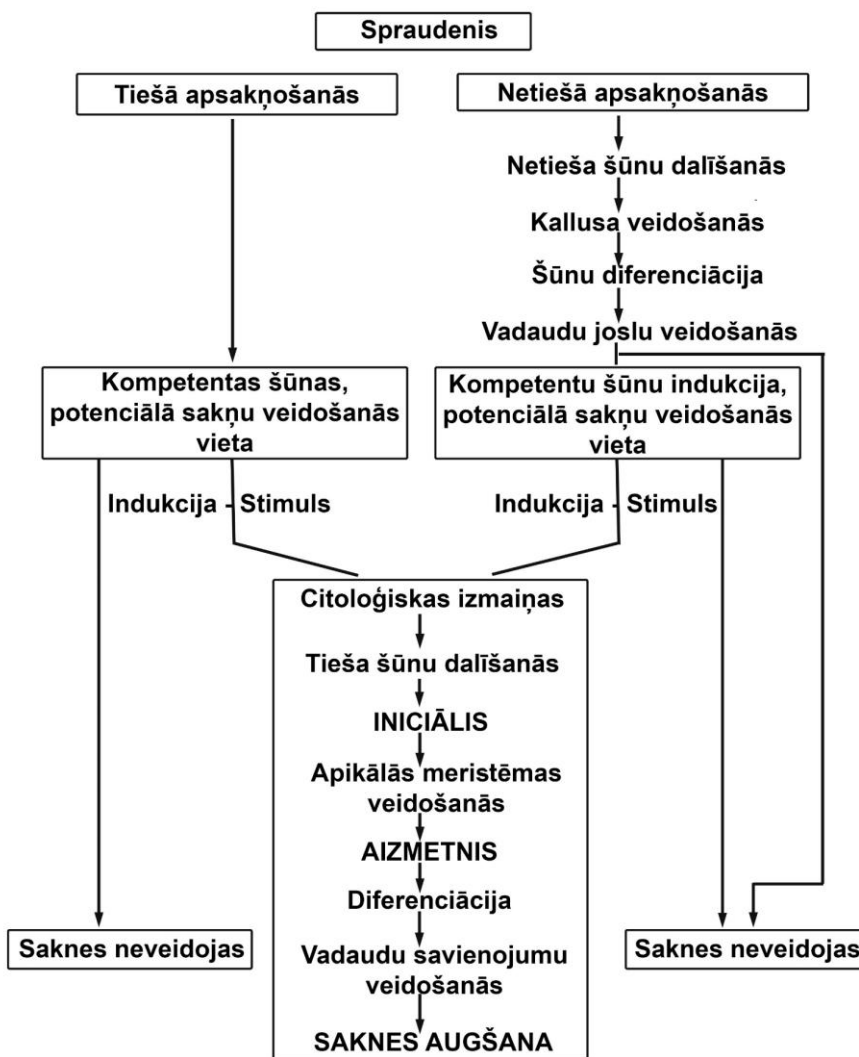
Līdzīgi kā klasiskās pavairošanas gadījumā, arī audu kultūrā pavairotu dzinumu veiksmīgai apsakņošanai būtiska nozīme ir vides faktoriem. Temperatūras režīma un gaismas kvalitātes, kvantitātes un režīma izvēle ir atkarīga no pavairojamā augu taksona (Hartmann et al. 2014). Rododendru eksplantus inkubē 21–25 °C aukstajā baltajā fluorescentajā gaismā ($40\text{--}75 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) ar 16 h fotoperiodu (Eeckhaut et al. 2010).

1.4 Adventīvo sakņu attīstības anatomiskais raksturojums

Veģetatīvajā pavairošanā ar spraudeņiem primārais reģenerācijas process ir adventīvo sakņu attīstība (Hartmann et al. 2014). Šis process ir atkarīgs no augu šūnu spējas dediferencēties. Dediferenciācija ir spēja attīstītām, diferencētām šūnām iniciēt šūnu dalīšanos un veidot jaunus, meristemiskus augšanas punktus. Adventīvās saknes var būt latentās saknes, kas veidojas no sakņu aizmetņiem, kas stumbrā attīstījušies jau pirms spraudeņošanas (raksturīgas *Salix*, *Populus*, *Hydrangea*, *Jasminum*, *Ribes* u.c. ģinšu augiem), vai ievainojuma inducētās saknes, kas veidojas kā atbildes reakcija uz spraudeņa pagatavošanas laikā radīto ievainojumu. Ievainojuma inducēto adventīvo sakņu attīstība notiek tiešā vai netiešā veidā (1.1. attēls). Tiešās rizoģenēzes laikā adventīvās saknes attīstās tiešā vadaudu tuvumā organizētas šūnu dalīšanās rezultātā (Hartmann et al. 2014). Tiešā adventīvo sakņu attīstība novērota ar ISS apstrādātiem *Mussaenda erythrophylla* dzinumu spraudeņiem (Hilaire et al. 1996), *Rhododendron ponticum* dzinumu spraudeņiem (Strzelecka 2007), kā arī mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ vienpumpura spraudeņiem ar lapu (Megre et al. 2011). Savukārt netiešajā rizoģenēzē sākotnēji neorganizētas šūnu dalīšanās rezultātā attīstās kalluss, kurā var sākties organizēta šūnu dalīšanās un adventīvo sakņu attīstība (Hartmann et al. 2014). Audu kultūrā netiešas apsakņošanās gadījumā sākotnēji veidojas kalluss, kam seko meristemisku šūnu slāņu veidošanās (Altamura 1996). Netiešā adventīvo sakņu attīstība literatūrā aprakstīta ar ISS neapstrādātiem *Pinus taeda* dzinumu spraudeņiem (Hamann 1998),

Mussaenda erythrophylla dzinumu spraudņiem (Hilaire et al. 1996), *Quercus macrocarpa* un *Quercus bicolor* dzinumu spraudņiem (Amissah et al. 2008). Pastāv uzskats, ka netiešā adventīvo sakņu attīstība ir raksturīga grūti apsakņojamiem genotipiem (Hartmann et al. 2014).

Anatomiski rizoģenēzes procesu iedala četros posmos, kas spraudņiem un audu kultūrā pavairotiem dzinumiem notiek līdzīgi. Viens no galvenajiem faktoriem, kas var ietekmēt sakņu veidošanos, ir šūnu rizoģenēzes kompetence, kas ir specifisku šūnu spēja reaģēt uz rizoģenēzi inducējošiem stimuliem (Altamura 1996).



1.1. attēls. Anatomiskie procesi adventīvo sakņu attīstības laikā (Hartmann et al. 2014). Kompetences trūkums ir biežs iemesls neveiksmīgam apsakņošanas procesam, īpaši gadījumos, kad izmantoti nobrieduši spraudēji (da Costa et al. 2013). Dediferenciācijas laikā, kas ir rizoģenēzes procesa pirmais anatomiskais posms, specifiskas šūnas kļūst meristematiskas un kompetentas sakņu indukcijas signālu uztveršanai (Hartmann et al. 2014, Druège et al. 2019).

Dediferenciācijas rezultātā vadaudu tuvumā esošās šūnas kļūst meristematiskas, to kodoli palielinās, citoplazma kļūst blīvāka, un sākas šūnu dalīšanās un iniciāļu veidošanās, kas ir otrais

anatomiskais rizoģenēzes posms. Tiešajā rizoģenēzē kokaugu dzinumu spraudņiem saknes iniciāļu attīstība galvenokārt notiek no sekundārās lūksnes jaunajām parenhimatiskajām šūnām vai no lūksnes staru paplašinājumiem, kambija, lūksnes vai lenticelēm (Hartmann et al. 2014). Novērots, ka mūžzaļajiem rododendriem adventīvās saknes attīstās no lūksnes staru parenhīmas šūnām (Megre et al. 2011). Augu audu kultūrā terminu “iniciālis” aizstāj ar terminu “meristemoīds”, kam raksturīgas grupās izkārtotas sinhroni, mitotiski dalošās nelielas šūnas ar hromofiliem kodoliem un kodoliņiem (Altamura 1996). Trešajā rizoģenēzes posmā no sakņu iniciāļiem attīstās sakņu aizmetņi ar tiem raksturīgu kupolveida izliekumu (de Klerk et al. 1999). Ceturtā rizoģenēzes posma laikā, saknes aizmetnim augot, tam attīstās saknes uzmava, kā arī tā vadaudi savienojas ar dzinuma vadaudu sistēmu (Amissah et al. 2008).

Vienlaikus ar adventīvo sakņu attīstību notiek arī ievainojuma dzīšanas process, rētu peridermas un kallusu veidošanās, kā arī dzinuma sekundārā augšana. Kallusus nereti novērojama arī koksnes vadaudu attīstīšanās un traheīdu ligzdu veidošanās (Strzelecka 2007). Traheīdu ligzdu veidošanās dažkārt novērota augiem, kam adventīvās saknes neattīstās. Novērots, ka neapsakņojošies, kallusu veidojoši *Pinus sylvestris* dzinumi *in vitro* aug vienlīdz labi, kā saknes veidojošie dzinumi. Tas ļāvis izvirzīt hipotēzi par traheīdu ligzdu lomu barības vielu un ūdens uzņemšanā (Grönroos and von Arnold 1985), taču padziļināti pētījumi šajā virzienā nav veikti.

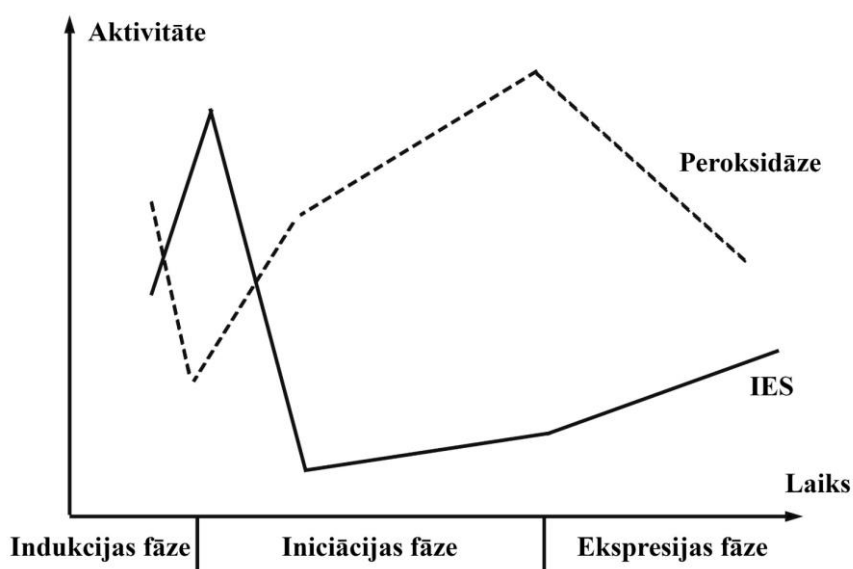
Rizoģenēzes anatomisko posmu norise laikā atšķiras dažādiem augu taksoniem un to var ietekmēt gan spraudņu apstrāde, gan vides apstākļi. Salīdzinot *in vitro* pavairotu *Trachelospermum asiaticum* dzinumu *in vitro* apsakņošanās anatomisko gaitu ar anatomiskajiem procesiem klasiskās spraudņu apsakņošanas laikā, konstatēts, ka anatomiskas atšķirības nepastāv. Taču, adventīvajām saknēm *in vitro* attīstās īsākas spurgaliņas (Apter et al. 1993).

1.5 Adventīvo sakņu attīstības fizioloģiskais raksturojums

Līdz šim literatūrā aprakstītas dažādas fizioloģisko un bioķīmisko marķieru sistēmas spraudņu adventīvo sakņu attīstības izvērtēšanai un konstatēts, ka vispiemērotākais marķieris ir peroksidāžu aktivitātes izmaiņas rizoģenēzes procesa laikā (de Klerk 1996). Peroksidāzes (EC 1.11.1.7) ir hēmu saturošas oksidoreduktāzes, ko veido aptuveni 300 aminoskābju atlikumi un kas katalītiski iedarbojas uz dažādiem organiskajiem savienojumiem (Shigeto and Tsutsumi 2016). Augos sastopamas I un III klases peroksidāzes. I klases peroksidāzes ir, piemēram,

askorbātperoksidāze un citohroma *c* peroksidāze (Cosio and Dunand 2009). Peroksidāzes kodējošo gēnu skaits ir liels un atšķiras starp augu taksoniem, piemēram, *Oryza sativa* ir 138 gēni (Passardi et al. 2004), *Populus trichocarpa* – 93 gēni (Ren et al. 2014) un *Arabidopsis thaliana* – 73 gēni (Tognolli et al. 2002), kas liecina par peroksidāžu funkciju dažādību augos. Zināms, ka III klases peroksidāzes augos iesaistītas tādos procesos kā lignīna un suberīna veidošanās, augsīna metabolisms, aizsardzība pret patogēniem un kukaiņiem, kā arī abiotiskā stresa aizsardzības reakcijas (van Doorn and Ketsa 2014, Shigeto and Tsutsumi 2016). Adventīvo sakņu attīstības laikā peroksidāzes aktivitāte mainās pretēji endogēnā augsīna koncentrācijai, kas ļauj peroksidāzes aktivitāti izmantot kā marķieri rizoģenēzes fāzu noteikšanai un procesa raksturošanai (1.2. attēls) (Gaspar et al. 1994). Pastāv uzskats, ka peroksidāzes aktivitātes izmaiņas un IES savstarpēji saista ūdeņraža peroksīds, kas rizoģenēzē kalpo kā signālmolekula. Novērots, ka ar ISS apstrādātiem *Phaseolus vulgaris* spraudņiem 3 h pēc ievainojuma pieaug H_2O_2 koncentrācija, kā arī pastāv apgriezta saistība starp peroksidāzes aktivitātes un H_2O_2 koncentrācijas izmaiņām. Iespējams, augsta H_2O_2 koncentrācija izsauc peroksidāzes aktivitātes samazināšanos, tādējādi kavējot IES katabolismu (Li et al. 2009).

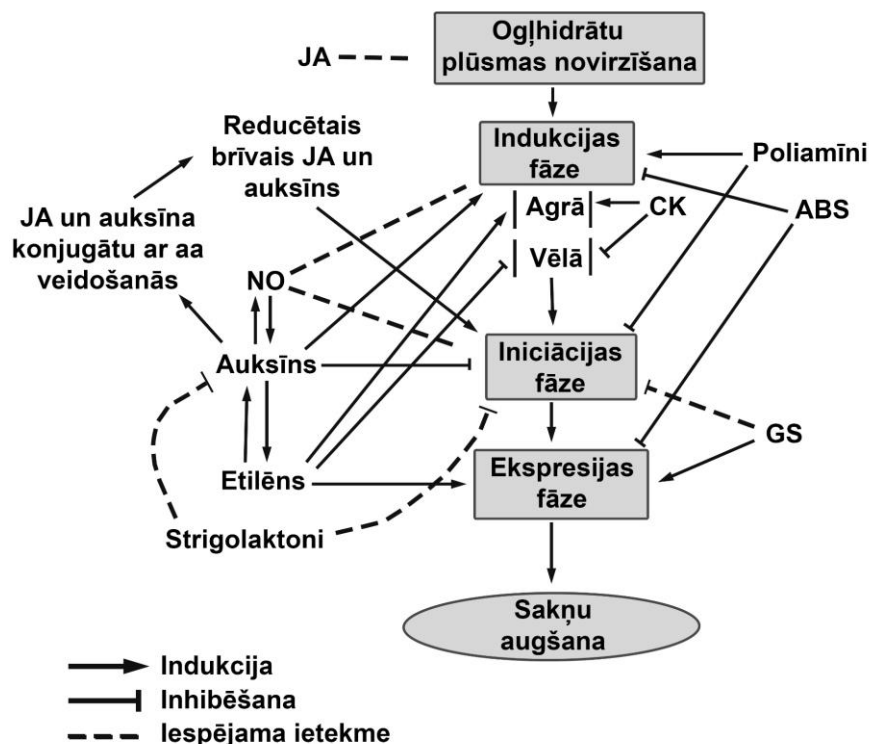
Pēc izmaiņām peroksidāzes aktivitātē rizoģenēzes procesu fizioloģiski iedala indukcijas, iniciācijas un ekspresijas fāzē (1.2. attēls) (Gaspar et al. 1994, Kevers et al. 1997).



1.2. attēls. Peroksidāzes aktivitātes un brīvās endogēnās IES daudzuma izmaiņas rizoģenēzes procesā: indukcijas, iniciācijas un ekspresijas fāzē (Gaspar et al. 1997).

Katrai no šīm secīgajām fāzēm ir atšķirīgi regulējošie faktori, kas dažkārt var darboties antagoniski (da Costa et al. 2013). Spraudņiem indukcijas fāze sākas pēc atdalīšanas no mātes

auga ar izmaiņām hormonālajā homeostāzē un tūlītēju ievainojuma atbildes reakciju (1.3. attēls). Spraudeņu pamatnēs auksīna polārā transporta rezultātā palielinās auksīna koncentrācija, kas veicina rizoģenēzes programmas inducēšanu mērķa šūnās. Konstatēts, ka ievainojuma inducēto adventīvo sakņu attīstība ir atkarīga no auksīna polārā transporta no spraudeņa lapām un konjugētā auksīna atbrīvošanas hidrolīzē, bet *de novo* auksīna biosintēze pastiprināti nenotiek (Druege et al. 2016). Savukārt kā atbildes reakcija uz ievainojumu palielinās jasmonāta un etilēna biosintēze (Druege et al. 2019). Īslaicīgi samazinās peroksidāzes aktivitāte un veidojas signāli ogļhidrātu plūsmas novirzīšanai uz spraudeņa pamatni (*sink establishment*) (da Costa et al. 2013, Druege et al. 2016). Indukcijas fāzes laikā spraudeņu pamatnes šūnās notiek fizioloģiskas un bioķīmiskas izmaiņas, kas nepieciešamas meristemoīdu un iniciāļu attīstībai iniciācijas fāzē, taču anatomiskas izmaiņas spraudeņu pamatnēs nav novērojamas (Gaspar et al. 1994). Indukcijas fāzes pozitīvu regulāciju veic auksīns un poliamīni, kā arī tās agrīnā stadijā citokinīni un etilēns (1.3. attēls). Abscizskābe, kā arī citokinīni un etilēns vēlīnajā indukcijas fāzē, veic negatīvu fāzes regulāciju (da Costa et al. 2013).



1.3. attēls. Adventīvo sakņu attīstības hormonālā regulācija. JA – jasmonāts, CK – citokinīni, ABS – abscizskābe, GS – giberelīni, NO – slāpekļa oksīds, aa – aminoskābes (da Costa et al. 2013).

Iniciācijas fāzes laikā samazinās fenola savienojumu un auksīna koncentrācija un palielinās peroksidāžu aktivitāte, kā arī notiek šūnu dalīšanās un saknes iniciāļu veidošanās (da Costa et

al. 2013). Auksīna koncentrācijas samazināšanās šajā fāzē saistīta ar pieaugošo peroksidāžu ekspresiju, kam ir kataboliska ietekme uz auksīnu (Druege et al. 2016). Peroksidāžu aktivitātes maksimums uzskatāms par iniciācijas fāzes beigām. Ekspresijas fāzē peroksidāžu aktivitāte pakāpeniski samazinās un anatomiski novērojama saknes iniciāļu attīstīšanās par aizmetņiem, saknes aizmetņu augšana caur mizu un vienotas vadaudu sistēmas veidošanās starp aizmetni un spraudēna vadaudiem (Gaspar et al. 1994, da Costa et al. 2013).

Peroksidāzes aktivitātes izmaiņas rizoģenēzes laikā pētītas dažādu kokaugu spraudēniem un audu kultūrā pavairotiem dzinumiem (1.1. un 1.2. tabula). Salīdzinot adventīvo sakņu attīstības fizioloģisko fāžu norisi klasiskiem spraudēniem (1.1. tabula) un *in vitro* vai *ex vitro* apsakņotiem dzinumiem (1.2. tabula), redzams, ka laika ziņā nav atšķirības starp abām pavairošanas sistēmām un atšķirības pamatā saistāmas ar taksoniem un izmantotajiem apstrādes variantiem. Piemēram, *Phoenix dactylifera* un *Taxus baccata* dzinumu spraudēniem tāpat kā *Cotinus coggygria in vitro* apsakņotiem dzinumiem, ISS veicina ātrāku fāžu iestāšanos. Savukārt ar ISS apstrādātiem *Dalbergia sissoo* vienposma spraudēniem ar lapu un *Malus hupehensis* dzinumu spraudēniem līdzīgi kā ar ISS apstrādātiem *Juglans regia* × *Juglans nigra in vitro* apsakņotiem dzinumiem novērojama vēlāka fāžu iestāšanās nekā citu taksonu augiem (1.1. un 1.2. tabula).

Pētījumos konstatēts, ka rododendru vienpumpura spraudēniem ar lapu adventīvo sakņu attīstības laikā pastāv korelācija starp gvajakola peroksidāzes aktivitātes izmaiņām spraudēņu lapās un pamatnēs. Tas ļauj izmantot lapu gvajakola peroksidāzes aktivitātes izmaiņas kā rizoģenēzes fāžu marķieri rododendru vienpumpura spraudēniem (Megre et al. 2011).

1.1. tabula

Adventīvo sakņu attīstības fizioloģiskās fāzes un anatomiskie novērojumi dažādu kokaugu spraudņiem
ISS – indol-3-sviestskābe, K-ISS – indol-3-sviestskābes kālija sāls, IES – indol-3-etilskābe, → – un tālāk

Suga	Spraudņu veids	Apstrādes veids	Fāzes pēc peroksidāzes aktivitātes izmaiņām			Anatomiskie novērojumi		Atsauces
			Indukcijas fāze	Iniciācijas fāze	Ekspresijas fāze	Iniciāli	Aizmetņi	
<i>Arbutus unedo</i>	Dzinumu spraudņi	kontrolē	0.-4. d.	5.-10. d.	10. d. →	Nav pētīts		Metaxas et al. 2004
		K-ISS	0.-4. d.	5.-10. d.	10. d. →			
<i>Dalbergia sissoo</i>	Vienposma spraudņi ar lapu	ISS		0.-21. d.	21. d. →			Husen 2008
<i>Ebenus cretica</i>	Dzinumu spraudņi	kontrolē	Peroksidāzes aktivitātes izmaiņas neatbilst rizoģenēzes fizioloģiskajām fāzēm			Saknes neveidojās		Syros et al. 2004
		ISS	0.-2. d.	2.-13. d.	13. d. →	-	7. d.	
<i>Malus hupehensis</i>	Dzinumu spraudņi	IES		0.-18. d.	18. d. →	Nav pētīts		Zhang et al. 2017
<i>Phoenix dactylifera</i>	Dzinumu spraudņi	ISS-	0.-12. d.	12.-20. d.	20. d. →	Nav pētīts		Qaddoury and Amssa 2004
		ISS	0.-6. d.	6.-12. d.	12. d. →			
<i>Rhododendron 'Babītes Baltais'</i>	Vienpumpura spraudņi ar lapu	kontrolē ISS	0.-6. d.	6.-12. d.	12. d. →	9. d.	18. d.	Megre et al. 2011
<i>Taxus baccata</i>	Dzinumu spraudņi	kontrolē	0.-3. d.	3. d. →	-	Nav pētīts		Metaxas et al. 2004
		K-ISS	4.-19. d.	20.-31. d.	31. d. →			
<i>Vitis vinifera</i>	Dzinumu spraudņi	kontrolē		6.-14. d.	14. d. →			Kose et al. 2011

1.2. tabula

Adventīvo sakņu attīstības fizioloģiskās fāzes un anatomiskie novērojumi dažādu kokaugu audu kultūrā pavairotiem dzinumiem

ISS – indol-3-sviestskābe, ISS- – kontrole, NES – naftiletīkskābe, ➔ – un tālāk

Suga	Apsakņošanas metode	Apstrādes veids	Fāzes pēc peroksidāzes aktivitātes izmaiņām			Anatomiskie novērojumi		Atsauces
			Indukcijas fāze	Iniciācijas fāze	Ekspresijas fāze	Meristemoīdi	Aizmetņi	
<i>Castanea sativa</i> × <i>Castanea crenata</i>	<i>In vitro</i>	kontrole ISS	0.-12. h	12.-24. h	24.-48. h	Saknes neveidojās 3.-4. d.	6.-8. d.	Gonçalves et al. 1998
<i>Cotinus coggygria</i>	<i>In vitro</i>	kontrole ISS	0.-10. d. 0.-5. d.	10.-15. d. 5.-15. d.	15. d. ➔ 15. d. ➔	1.-2. d.	3. d.	Ilczuk and Jacygrad 2016
<i>Elaeis guineensis</i>	<i>In vitro</i>	NES	3.-5. d.	5.-7. d.	7. d. ➔	Nav pētīts		Rival et al. 1997
<i>Gardenia jasminoides</i>	<i>In vitro</i>	kontrole un ISS	0.-1. d.	1.-7. d.	7. d. ➔	Nav pētīts		Hatzilazarou et al. 2006
	<i>Ex vitro</i>	kontrole un ISS	0.-3. d.	3.-10. d.	10. d. ➔	Nav pētīts		
<i>Grevillea rondeau Grevillea petophioides</i>	<i>In vitro</i>	ISS	Peroksidāzes aktivitātes izmaiņas neatbilst rizoģenēzes fizioloģiskajām fāzēm			Nav pētīts		Ludwig-Müller 2003
<i>Juglans regia</i> × <i>Juglans nigra</i>	<i>In vitro</i>	ISS	7.-28. d.	28.-35. d.	35. d. ➔	Nav pētīts		Bisbis et al. 2003
<i>Malus domestica</i>	<i>In vitro</i>	ISS	0.-1. d.	1.-5. d.	5. d. ➔	5. d.	7. d.	Naija et al. 2008
<i>Olea europaea</i>	<i>In vitro</i>	ISS	0.-4. d.	4.-14. d.	14. d. ➔	10. d.	22. d.	Macedo et al. 2013
<i>Prunus dulcis</i>	<i>In vitro</i>	ISS	0.-1. d.	1.-3. d.	3. d. ➔	Nav pētīts		Caboni et al 1997
<i>Quercus robur</i>	<i>In vitro</i>	kontrole	Peroksidāzes aktivitātes izmaiņas neatbilst rizoģenēzes fizioloģiskajām fāzēm			Saknes neveidojās		San-José et al. 1992
		ISS		0.-6. d.	6. d. ➔	4. d.	5.-6. d.	

Ne vienmēr anatomiskie un fizioloģiskie rizoģenēzes pētījumi veikti vienlaikus, un dažkārt ir konstatējama anatomisko un fizioloģisko fāzu nobīde. *Ebenus cretica* dzinumu spraudējiem saknes aizmetņi konstatēti jau iniciācijas fāzes laikā (Syros et al. 2004), savukārt *Castanea sativa* × *Castanea crenata* dzinumiem *in vitro* saknes iniciāļi konstatēti tikai ekspresijas fāzē (Gonçalves et al. 1998). *Cotinus coggygria* ISS apstrādes varianta dzinumiem *in vitro* apsākšanās laikā saknes iniciāļi un aizmetņi konstatēti jau iniciācijas fāzē. Turklāt peroksidāzes aktivitātes izmaiņas atbilst rizoģenēzes fāzēm gan kontroles, gan ISS apstrādes variantam, lai arī kontroles varianta dzinumi eksperimenta laikā adventīvās saknes neveido (Ilczuk and Jacygrad 2016). Šādi pretrunīgi rezultāti liecina par vienlaicīgas bioķīmisko un anatomisko fāzu izvērtēšanas būtisko nozīmi pētījumos par adventīvo sakņu attīstību.

1.6 Endofītu definīcija

Pirmo reizi endofītus 1809. gadā aprakstījis vācu botāniķis Heinrihs Frīdrihs Links (*Heinrich Friedrich Link*), terminu izmantojot daļēji parazitisku, augos atrodamu sēņu raksturošanai (*entophytae*) (Hardoim et al. 2015). Augos atrodamo sēņu grupu dažādība daudzkārt raisījusi diskusijas par to, kāda veida augu un mikroorganismu mijiedarbības uzskatāmas par endofītiskām (1.3. tabula). Mūsdienās visplašāk lietota Vilsona (Wilson 1995) definīcija, kas endofītismu raksturo ne tikai ar lokalizācijas vietu, bet arī kā asimptomātisku infekcijas tipu, kas endofītiskās baktērijas un sēnes stingri nodala no mikorizu veidojošajām sēnēm un patogēnajiem mikroorganismiem, izņemot latentos patogēnus, kas ir uzskatāmi par endofītiem šīs definīcijas izpratnē. Taču arvien biežāk vērojama tendence endofītu definīciju vienkāršot, to tuvinot tās sākotnējai formai (Partida-Martínez and Hail 2011, Hardoim et al. 2015, Brader et al. 2017). Autori, kuri rosina endofītiskās definīcijas vienkāršošanu un termina pielietošanu atbilstoši tā etimoloģijai, uzsver to, ka ir zināmi gadījumi, kad viena augu taksona endofīts var būt cita augu taksona patogēns, un bieži vien tie ir vides faktori, kas nosaka sēnes ietekmi uz augu (Hardoim et al. 2015, Brader et al. 2017).

Patogenitāte vai mutuālisms var būt atkarīgs no tādiem faktoriem kā augu un mikroorganismu genotipi, mikroorganismu skaits un vides apstākļi (Hardoim et al. 2015), kā arī endofīta adaptācijām attiecībā uz dažādiem augu orgāniem vai audu tipiem, auga un endofīta attīstības stadijas un auga aizsardzības spējas (Shultz and Boyle 2005). Molekulārās bioloģijas metožu izmantošana rada iespēju pētīt augu mikrobiomu, neizmantojot tādu klasiskās mikrobioloģijas metodi kā mikroorganismu izolēšana. Rezultātā tiek identificēts liels daudzums

līdz šim neaprašītu endofītisko mikroorganismu, kuru funkcijas nav zināmas un līdz ar to definīcija nav piemērojama (Brader et al. 2017).

1.3. tabula

Endofītu definīcijas attīstība

“Augus apdzīvojošiem parazītiem pieskaitāmas sēnes, kas visu dzīves ciklu vai kādu tā daļu apdzīvo augu iekšējās daļas kā endofīti, un sēnes, kas apdzīvo augu virskārtu kā epifīti” (De Bary 1866, 215. lpp.).

“Sēnes, kas izsauc nepamanāmas infekcijas veselu augu lapās un stumbros” (Carroll 1988).

“Visi augu orgānos atrodamie organismi, kas kādā sava dzīves cikla posmā kolonizē augu iekšējos audus, neradot acīmredzamus bojājumus” (Petrini 1991).

“Endofītiska sēne ir sēne, kas dzīvo citā organismā (augā vai sēnē) bez saskatāmas negatīvas ietekmes. Tādējādi endofītizmam būtu jābūt stingri nodalāmam no parazītizma [...]” (Hirsch and Braun 1992).

“Sēnes un baktērijas, kas visā dzīves ciklā vai tā posmā kolonizē augu audus un rada asimptomātiskas, vispārējas augu audu infekcijas” (Wilson 1995).

“Īstie endofīti – sēnes, kuru kolonizācija nekad neizsauc redzamus slimības simptomus” (Mostert et al. 2000).

“Sēnes, kas kolonizē augu, konkrētajā brīdī neradot redzamus slimības simptomus” (Schulz and Boyle 2005).

“Sēnes, kas asimptomātiski inficē dzīvus augus, audos ieņemot latentu stāvokli uz visu inficētā auga dzīves ciklu vai līdz brīdim, kad vides apstākļi vai auga attīstības fāze kļūst izdevīga sēnei, uzskatāmas par endofītiem” (Sieber 2007).

“...mēs lietojam terminu “endofīts” atbilstoši šī vārda etimoloģijai un ar to apzīmējam visus dzīvos augu audos dzīvojošos mikroorganismus” (Partida-Martínez and Hail 2011).

“Termins “endofīts” attiecināms tikai uz biotopu, nevis funkciju, tāpēc tas būtu jālieto plašākā izpratnē, iekļaujot visus mikroorganismus, kas daļu no sava dzīves cikla vai visā tā laikā kolonizē augu iekšējos audus” (Hardoim et al. 2015).

Līdzīgi kā de Barijs (de Bary) 1866. gadā, tā Hardoims (Hardoim et al. 2015) un Breiders ar kolēģiem (Brader et al. 2017) ierosinājuši terminu “endofīts” vispārīgākā, to lietojot biotopa / vides nevis funkciju kontekstā, un tādējādi par endofītiem uzskatīt visus mikroorganismus, kas kolonizē augu iekšējos audus kādā dzīves cikla posmā vai visā tā garumā. Šādā gadījumā definīcija sevī ietver visu plašo augu un mikroorganismu mijiedarbību spektru – gan mutuālismu, gan komensālismu, gan patogēnas mijiedarbības. Iespējams, ņemot vērā arvien pieaugošo informācijas apjomu par dažādu mikroskopisko sēņu duālajām nišām (Selosse et al.

2018), endofītu definīcija tuvākajā nākotnē atkal mainīsies, taču šī darba ietvaros termins “endofīts” lietots Vilsona 1995. gada (Wilson 1995) definīcijas izpratnē.

Endofītiskās sēnes, kurām dzīves cikla pabeigšanai nepieciešami augu audi, uzskatāmas par obligātiem endofītiem. Tādas ir *Balansia*, *Epichloë* un *Neotyphodium* ģinšu sēnes. Savukārt, sēnes, kuru dzīvesveids ir galvenokārt epifītisks un augu audos tās sastopamas sporādiski, ir oportūniski endofīti. Tādas ir *Hypocrea* un *Trichoderma* ģinšu sēnes. Bez obligātajiem un oportūniskajiem endofītiem, sastopami arī fakultatīvie endofīti, kas atrodami augu audos un kam nepieciešamas augu sintezētas barības vielas (Hardoim et al. 2015).

Balstoties uz sēņu evolucionāro radniecību, taksonomiju, saimniekaugu izvēli un ekoloģisko nišu, endofītiskās sēnes galvenokārt iedala divās grupās – *Clavicipitaceae* endofītos, kas ir klasiski graudzāļu endofīti, un *ne-Clavicipitaceae* endofītos, kas sastopami asimptomātiskos dažādu augu valsts pārstāvju audos (Rodriguez et al. 2009). Ņemot vērā tādus faktorus, kā saimniekaugu diapazonu, kolonizētos orgānus, transmisijas veidu u. c., Rodrigezs (Rodriguez et al. 2009) piedāvā endofītus dalīt četrās klasēs, *Clavicipitaceae* endofītus grupējot I klasē un *ne-Clavicipitaceae* endofītus sadalot II-IV klasē (1.4. tabula).

1.4. tabula

Simbiotiskie kritēriji sēņu endofītisko klašu raksturošanai (Rodriguez et al. 2009)

Kritēriji	<i>Clavicipitaceae</i>		<i>Ne-Clavicipitaceae</i>	
	I klase	II klase	III klase	IV klase
Saimniekaugu diapazons	Šaurs	Plašs	Plašs	Plašs
Kolonizētie orgāni	Vasa un rizoms	Vasa, saknes vai rizoms	Vasa	Saknes
<i>In planta</i> kolonizācija	Plaša	Plaša	Ierobežota	Plaša
<i>In planta</i> daudzveidība	Zema	Zema	Augsta	Nav zināms
Transmisija*	Vertikāla un horizontāla	Vertikāla un horizontāla	Horizontāla	Horizontāla

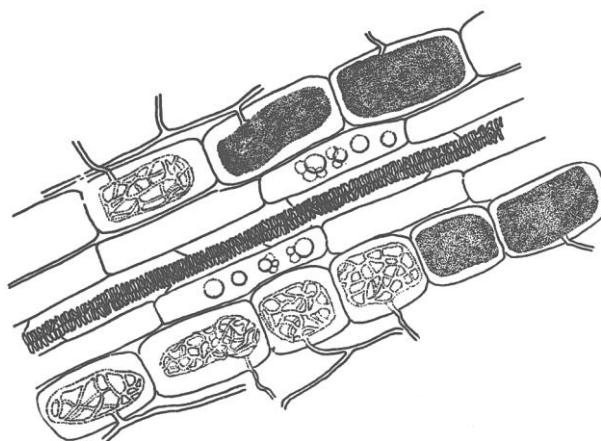
* – transmisija – sēnes pārnese no viena saimniekauga uz otru. Vertikālā transmisija – pārnese ar mātes auga sēklām, horizontālā transmisija – sporu pārnese ar vēja vai lietus starpniecību.

Taču, raksturlielumu relativitātes dēļ šāda endofītu klasifikācija nav guvusi plašu atzinību un praksē izmantota reti.

1.7 Rododendru mikroorganismu vispārīgs raksturojums

Literatūrā plaši aprakstītas rododendru un citu ēriku dzimtas augu mikorizālās sēnes, savukārt sakņu endofīti pētīti ievērojami mazāk.

Ēriku dzimtas augi plaši izplatīti biotopos ar sarežģītiem, minerālelementu uzņemšanu apgrūtināšiem vides apstākļiem – zemu substrāta pH, zemu substrāta temperatūru un relatīvo mitrumu, tāpēc tiem izveidojušās mutuālistiskas asociācijas ar mikorizālajām sēnēm, kas atvieglo slāpekļa un fosfora uzņemšanu, kā arī ar endofītiskajām sēnēm, kas ļauj pielāgoties augšanai šādos apstākļos (Leopold 2016, Toju et al. 2016). Erikoīdā mikoriza ir endomikoriza, un tai raksturīgi sēnes hifu tinumi palielinātās sakņu epidermas šūnās (Read 1996), tādējādi padarot tās atšķiramas no endofītiskajām sēnēm (1.4. attēls).



1.4. attēls. Erikoīdā mikoriza *Epacris impressa* saknes šūnās (McLennan 1935 cit. pēc Read 1996).

Erikoīdo mikorizu veido *Rhizoscyphus ericae* (syn. *Hymenoscyphus ericae* un *Pezizella ericae*) (Read 1974, Leopold 2016) un *Oidiodendron maius* (Dalpé 1986). Spēja veidot erikoīdajai mikorizai raksturīgos hifu tinumus aprakstīta arī *Acremonium strictum* (Monreal et al. 1999), *Geomyces pannorum* (Vohník et al. 2007), kā arī *Cadophora* (Bizabani and Dames 2015), *Cryptosporiopsis* un *Lachnum* (Walker et al. 2011) ģinšu sēnēm.

Rododendru sakņu mikroorganismu sabiedrību pētījumi galvenokārt veltīti mikorizālajām sēnēm, savukārt endofītisko sēņu sugu sastāvs ir salīdzinoši maz pētīts. No *Rhododendron fortunei* saknēm bez mikorizālajām sēnēm, kā *Oidiodendron maius*, *Cryptosporiopsis ericae* un *Phialocephala fortunii*, izolētas nemikorizālas *Cladosporium* ģintij un Helotiales rindai piederošas sēnes (Zhang et al. 2009). Savukārt, no *Rhododendron tomentosum* saknēm izolētas

Fusarium, *Penicillium*, *Sordaria*, *Pleosporales*, *Sphaeriothyrium*, un *Lecythophora* ģintīm piederošas sēnes (Tejesvi et al. 2011).

Bez mikorizālajām un endofītiskajām sēnēm rododendru saknēs sastopami arī tumši septētie endofīti, kas veido iekšūnu mikrosklerocijus rododendru sakņu šūnās, parenhimatisku tīklu, kas attīstās zem rizodermas šūnām un kam raksturīgas intra- un intercelulāras hifas ar tumši pigmentētām septām (Vohník and Albrechtová 2011).

Kokaugu lapās sastopamie endofīti izplatās horizontālās pārneses ceļā ar lietus vai vēja starpniecību, un tiem var būt būtiska loma lapu novecošanās un noārdīšanās procesos, tāpēc liela daļa no šiem endofītiem ir saprotrofi (Sieber 2007). No Latvijā augošu divgadīgu rododendru asimptomātiskām lapām izolētas *Phomopsis*, *Phoma*, *Alternaria*, *Monochaetia*, *Colletotrichum*, *Cladosporium*, *Seimatosporium*, *Diplodina*, *Coleophoma*, *Cryptocline*, *Truncatella* un *Guignardia* ģintīm piederošas sēnes (Purmale et al. 2012).

1.8 Augu un mikroorganismu mijiedarbības anatomiskais, fizioloģiskais un bioķīmiskais raksturojums

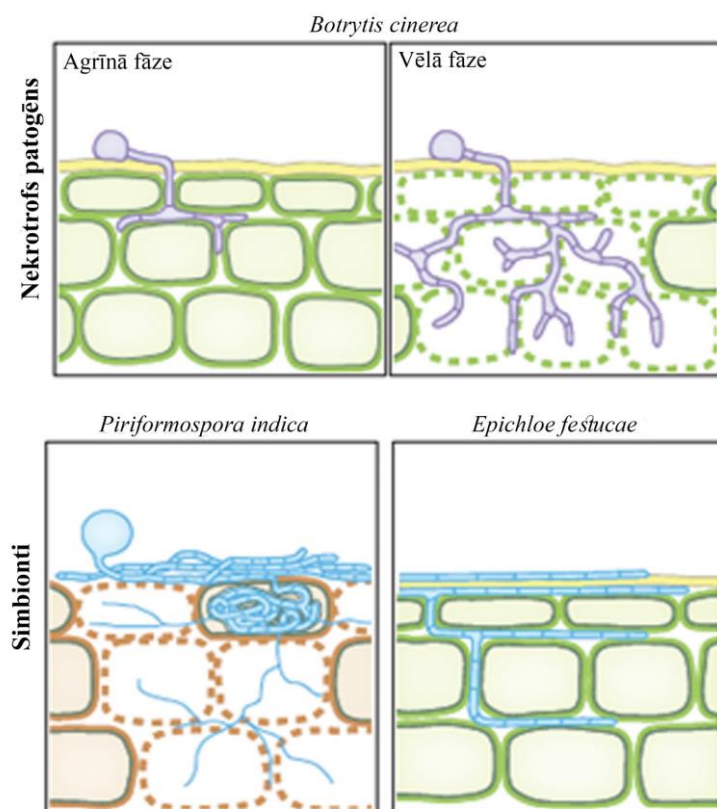
Augu audu kolonizēšana atkarībā no endofīta var lokāli vai sistēmiski notikt šūnās vai starpšūnu telpās (Shultz and Boyle 2005). Veiksmīga endofītiskās kolonizācijas procesa norise ir atkarīga no dažādiem faktoriem, tajā skaitā saimniekauga vecuma, audu tipa, saimniekauga genotipa, mikroorganisma genotipa, pārneses veida, kā arī biotiskajiem un abiotiskajiem vides faktoriem (Aly et al. 2011, Hardoim et al. 2015). Mikroorganismu pārnese starp saimniekaugiem var notikt vertikālās vai horizontālās transmisijas ceļā. Vertikālā pārnese notiek ar sēklu vai veģetatīvo vienību starpniecību, un tā ir izplatīta graudzāļu endofītiem, kam raksturīga sistēmiska saimniekauga kolonizācija. Savukārt horizontālā pārnese notiek ar sēnes sporām un raksturīga lielākajai daļai lapu un sakņu endofītu (Rodriguez et al. 2009).

Augu un simbiotisko mikroorganismu mijiedarbībai var izšķirt četrus secīgus posmus:

- 1) presimbiotiska savstarpēja apmaiņa ar difūziem un gaistošiem signāliem;
- 2) mikroorganisma piesaistīšanās auga šūnapvalkam;
- 3) agregācija uz šūnas virsmas vai ieaugšana šūnā vai starpšūnu telpā;
- 4) tālākā mijiedarbība, apmainoties ar barības vielām vai sekundārajiem savienojumiem (Plett and Martin 2018).

Infekcijas vai kolonizācijas sākotnējā fāze sevī ietver sēnes sporas piesaistīšanos auga virsmai un sporas dīgšanu, kam seko tās diferenciācija par infekcijas struktūru – apresoriju (patogēniem) vai hifopodiju (simbiotiem) (Lo Presti et al. 2015).

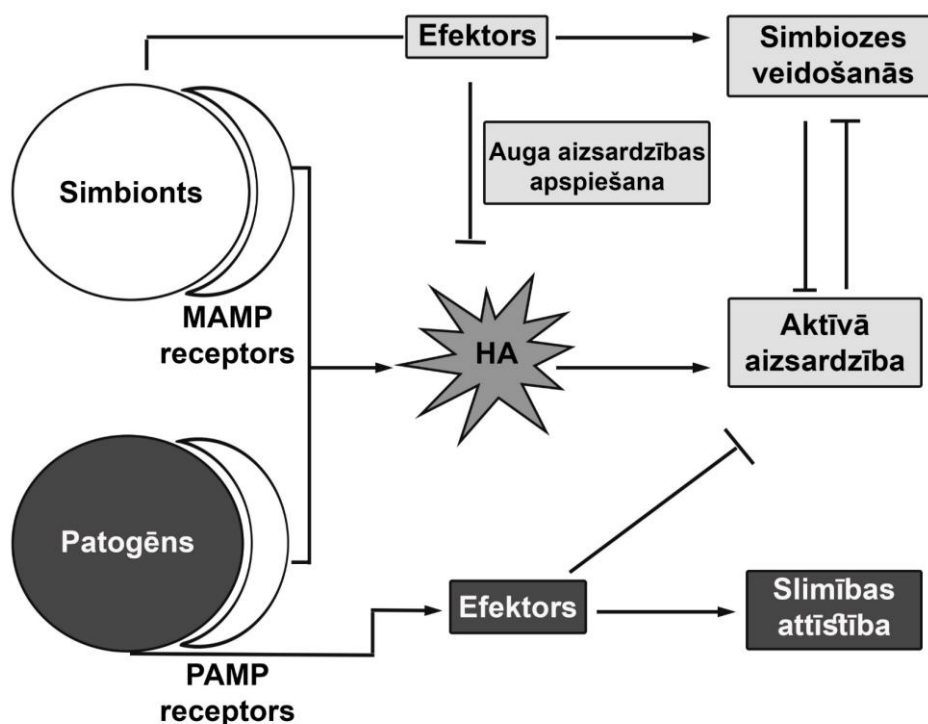
Patogēnās sēnes, lai iekļūtu šūnā caur šūnapvalku, sekretē augu šūnapvalku noārdošus enzīmus, savukārt simbiotie paļaujas uz augu izcelsmes šūnapvalku atbrīvojošiem enzīmiem (*cell wall-loosening enzymes*). Veidojoties efektīvai mijiedarbībai ar simbiotiskiem vai biotrofiem mikroorganismiem, sēnes hifa šķērso auga šūnapvalku, un auga šūnas plazmatiskā membrāna apliecas ap sēnes hifām (Lo Presti et al. 2015). Taču arī endofītiskās sēnes, piemēram, *Piriformospora indica*, var sintezēt augu šūnapvalku degradējošus enzīmus, kā arī pārprogrammēt saimniekauga šūnu ciklu, inducējot kolonizēto šūnu nāvi (1.5. attēls) (Deshmukh et al. 2006). Savukārt graudzāļu Clavicipitaceae endofīti kolonizē galvenokārt starpšūnu telpas (Rodriguez et al. 2009). Dažkārt infekcijas laikā augu šūnās novērojama polifenolu, piemēram, kondensēto tannīnu uzkrāšanās, kam ir būtiska loma patogēnu augšanas ierobežošanā un slimību izturībā kopumā (Halarewicz et al. 2013). Kondensētie tannīni uzkrājas atsevišķās vakuolās, un tām parasti raksturīgs blīvs, tumšs saturs (Fleurat-Lessard et al. 2016).



1.5. attēls. Lapu vai sakņu audu kolonizācijas mehānismi dažādām sēnēm. Zaļās līnijas ataino dzīvus fotosintētiskos audus, brūnās līnijas – dzīvus sakņu audus, pārtrauktas līnijas – mirušus fotosintētiskos vai sakņu audus (Lo Presti et al. 2015).

Augu un endofītu asociāciju izveides fizioloģiskie aspekti ir maz pētīti, taču ir zināms, ka sākotnējā mijiedarbība starp labvēlīgajiem mikroorganismiem un to saimniekaugiem izsauc līdzīgu aizsargreakciju, kā tas notiek mijiedarbībās ar patogēniem mikroorganismiem (Harjoim et al. 2015, Brader et al. 2017) (1.6. attēls).

Sākoties infekcijas procesam, augu šūnu plazmatiskajā membrānā izvietotie proteīni, receptoriem līdzīgās kināzes un citi receptoriem līdzīgie proteīni, atpazīst ar mikroorganismiem vai patogēniem saistītos molekulāros marķierus (*MAMP/PAMP – microbe-/pathogen-associated molecular patterns*) un iniciē *MAMP* ierosināto atbildes reakciju augā (Newman et al. 2013). Mikroorganismos *MAMP* pilda būtiskas funkcijas un ir konservatīvi neatkarīgi no mikroorganisma patogenitātes – tie var būt flagellīns, hitīns, β -glukāni, lipopolisaharīdi u.c. (Brader et al. 2017). *MAMP* ierosinātās atbildes reakcijas laikā auga šūnā veidojas aktīvās skābekļa un slāpekļa formas, notiek izmaiņas šūnapvalkā, aktīvi ekspresējas tādi enzīmi kā proteīnāzes, hitināzes, glukanāzes, kā arī ekspresējas ar patogēnēzi saistītie proteīni (Newman et al. 2013, Lo Presti et al. 2015).



1.6. attēls. Auga atbildes reakcija uz patogēna vai simbionta inokulāciju. MAMP un PAMP - *microbe-/pathogen-associated molecular patterns*, HA – hipersensitīvā atbilde (Zogli and Libault 2017).

Atbildes reakcijā būtisku lomu spēlē arī etilēna, jasmonāta un salicilskābes signālceļi (Khare et al. 2018). Imūnās atbildes reakciju iniciēšana novērota arī pēc augu inokulēšanas ar endofītiskām vai nepatogēnām sēnēm. *In vitro* audzētu *Piper nigrum* un *Lycopersicon* sp.

dzinumiem pēc inokulācijas ar *Fusarium oxysporum* nepatogēnu celmu Fo47, konstatēta aizsardzības gēnu ekspresijas būtiska palielināšanās (Veloso and Díaz 2012, Aimé et al. 2013). Novērots, ka pēc inokulācijas ar rizobaktērijām (Dias et al. 2017), arbuskulārās mikorizas sēnēm *Rhizophagus irregularis* (Domokos et al. 2018) un *Rhizophagus intraradices* un endofītisko sēni *Piriformospora indica* (Tyagi et al. 2017) palielinās gvajakola peroksidāzes aktivitāte. Līdzīgi tas novērots arī patogēnu mikroorganismu infekcijas biotrofās fāzes laikā, kad palielinās ar peroksīda detoksifikāciju saistīto gēnu ekspresija (van der Does and Rep 2017). Zināms, ka *MAMP* ierosinātās imunitātes apspiešanai gan patogēni, gan nepatogēni mikroorganismi var izstrādāt efektorus, kas var būt gan sekretorie proteīni, gan sekundārie savienojumi (Brader et al. 2017). Efektori var piedalīties arī kolonizācijas norisē, un to ekspresija var palielināties jau pēc pirmā sēnes kontakta ar auga virsmu (Lo Presti et al. 2015). Veiksmīgas kolonizācijas gadījumā sēnes efektori apspiež augu aizsargreakciju (Zogli and Libault 2017). Savukārt infekcijas gadījumā tas izsauc efektoru ierosinātās imunitātes aktivēšanu augos (Brader et al. 2017), kā rezultātā veidojas hipersensitīvā atbildes reakcija, kas izpaužas kā lokāla šūnu bojāeja infekcijas tuvumā (Newman et al. 2013) (1.6. attēls).

1.9 Endofītu ietekme uz augiem

Endofītiskās sēnes augiem var palielināt abiotiskā stresa izturību, aizsardzību pret augēdājiem kukaiņiem un patogēniem mikroorganismiem kā arī veicināt auga biomasas un produktivitātes pieaugumu. Daži endofīti izmanto saimniekauga metabolītus, taču nerada nekādu tiešu, acīmredzamu ietekmi uz pašu augu (Hardoim et al. 2015).

Endofītisko sēņu pozitīvo ietekmi uz augu augšanu var rosināt barības elementu pārvēršana augam uzņemamā formā vai mikroorganisma spēja sintezēt augšanu veicinošus fitohormonus (Mayerhofer et al. 2012). Zināms, ka *Neotyphodium lolii* pozitīvi ietekmē graudzāļu augšanu, palielinot to CO₂ fiksēšanas efektivitāti (Spiering et al. 2006). Pozitīva ietekme galvenokārt novērota tumši septētajiem endofītiem, savukārt citas sakņu endofītiskās sēnes, īpaši, asku sēnes, augu augšanu var arī kavēt (Mayerhofer et al. 2012). Šādi endofīti ir parazitiskas sēnes, kas patērē auga metabolītus, tādējādi radot augšanas inhibēšanu (Kwaśna and Szewczyk 2016). Plaši pētīta ir sakņu endofītu spēja sintezēt auksīnu un giberelīnus, un ir izvirzīta hipotēze, ka IES, iespējams, mijiedarbojoties ar saimniekaugu aizsardzības sistēmu, palielina kolonizācijas procesa efektivitāti (Hardoim et al. 2015). Pētījumos ar augu augšanu veicinošām rizobaktērijām konstatēts, ka tās var veicināt augšanu, uzlabojot barības vielu

uzņemšanu caur uzlabotu slāpekļa fiksēšanu un fosfāta pieejamības palielināšanu, sideroforu vai fitohormonu sintēzi, kā arī caur netiešiem mehānismiem (Ahemad and Kibret 2014).

Augu endofītiskās sēnes spēj sintezēt virkni savienojumu, kas kavē patogēnu augšanu, piemēram, alkaloīdus, steroīdus, terpenoīdus, peptīdus, poliketonus, flavonoīdus, kvinolus, fenolus u.c. Tās spēj sintezēt savienojumus ar antivirālu, antibakteriālu, pretsēņu un insekticīdu iedarbību (Hardoim et al. 2015).

Endofīti var palielināt augu aizsardzību ne tikai pret biotiskajiem, bet arī pret abiotiskajiem stresa faktoriem. *Neotyphodium* spp., piedaloties saimniekaugu osmotiskajā un atvārsnīšu darbības regulācijā, palielina graudzāļu aizsardzību pret sausumu (Bacon and Hill 1996), kā arī aizsargā pret slāpekļa badu un ūdens stresu (Ravel et al. 1997). Sakņu endofītiskā sēne *Piriformospora indica* miežiem (Baltruschat et al. 2008) veicina sāls izturību un Ķīnas kāpostiem sausuma izturību (Sun et al. 2010). Abos pētījumos kā potenciālais mehānisms ir minēts antioksidantu līmeņa pieaugums. Savukārt *Theobroma cacao* stādiem aizsardzību pret sausuma stresu palielina inokulācija ar *Trichoderma hamatum* (Bae et al. 2009).

Sakņu endofītiskās sēnes, galvenokārt mikorizālās sēnes, iesaistās saimniekaugu minerālās barošanās procesos, palīdzot mobilizēt tādus elementus kā fosfors un dzelzs (Berg et al. 2015).

1.10 Endofītisko un mikorizālo sēņu izmantošana augu pavairošanā

Augu augšanu un produktivitāti, kā arī abiotiskā un biotiskā stresa izturību veicinošās īpašības, kas raksturīgas endofītiskajām un mikorizālajām sēnēm, dod iespēju šos mikroorganismus ieviest dažādās augu pavairošanas sistēmās, augus pavairojot gan ar klonālās mikropavairošanas metodēm, gan ģeneratīvi. Savukārt, pētījumu par to izmantošanu klasiskajā veģetatīvajā pavairošanā ir samērā maz.

Pētījumi par endofītu ietekmi uz ģeneratīvi pavairotiem augiem galvenokārt pievēršas biotiskā vai abiotiskā stresa izturības palielināšanai augos. Piemēram, diedzējot *Theobroma cacao* sēklas sterilā ar *Trichoderma hamatum* izolātu DIS 219b inokulētā bezaugsnes substrātā, iegūti stādi, kas ir izturīgāki pret sausuma stresu, salīdzinot ar neinokulētiem augiem (Bae et al. 2009).

Audu klutūrās pavairota banāna inokulēšanu ar *Beauveria bassiana* var izmantot *Cosmopolites sordidus* kāpuru bioloģiskajai kontrolei (Akello 2007). Šim endofītam raksturīga

arī augšanu veicinoša ietekme, kā tas konstatēts eksperimentā ar inokulētām *Zea mays* sēklām, taču tā ir atkarīga no barības vielu pieejamības substrātā (Tall and Meyling 2018).

Lachnum un *Cadophora* izolātiem novērota pozitīva vai neitrāla, šķirnes specifiska ietekme uz audu kultūrā pavairotu *Vaccinium corymbosum* dzinumu augšanu *ex vitro* un uz vasas un sakņu sauso masu (Bizabani and Dames 2015). Savukārt, izolāts PGP-HSF *in vitro* un *in vivo* apstākļos pozitīvi ietekmē *Mentha piperita* augšanu, sakņu un vasas biomasas pieaugumu, kā arī ēterisko eļļu koncentrāciju (Mucciarelli et al. 2003).

Viena no visplašāk pētītajām endofītiskajām sēnēm ir *Piriformospora indica*, kam aprakstīta pozitīva ietekme uz dažādu taksonu augu augšanu un biomasas pieaugumu (Varma et al. 1999), kas saistāms ar šīs sēnes spēju sintezēt augsni (Sirrenberg et al. 2007). *Piriformospora indica* veicina *in vitro* pavairotu augu tālāko aklimatizāciju, palielinot pēc augu pārstādīšanas izdzīvojušo augu procentuālo daudzumu no 62% neinokulētiem augiem līdz 88-94% inokulētiem augiem (Sahay and Varma 1999). Novērots, ka *Piriformospora indica* palielina *Piper nigrum* lapu skaitu, hlorofila *a* un kopējo hlorofila koncentrāciju, kā arī piperīna koncentrāciju un produktivitāti (Anith et al. 2018). Pētīta arī *Piriformospora indica* ietekme uz *Piper nigrum* spraudņiem, ar sēni inokulējot sterilu substrātu, taču būtiska ietekme uz sakņu garumu vai skaitu nav konstatēta, kā arī novērots zems kolonizācijas līmenis (Anith et al. 2011). Iespējams, endofīts var ietekmēt pašu apsākņošanās procesu, ņemot vērā *Piriformospora indica* spēju sintezēt augsni (Sirrenberg et al. 2007), taču pētījumā nav aplūkoti anatomiskie un fizioloģiskie procesi spraudņu rizoģenēzes laikā. Šādi rezultāti norāda uz pārdomātu un vispusīgu pētījumu nepieciešamību šādās modeļsistēmās.

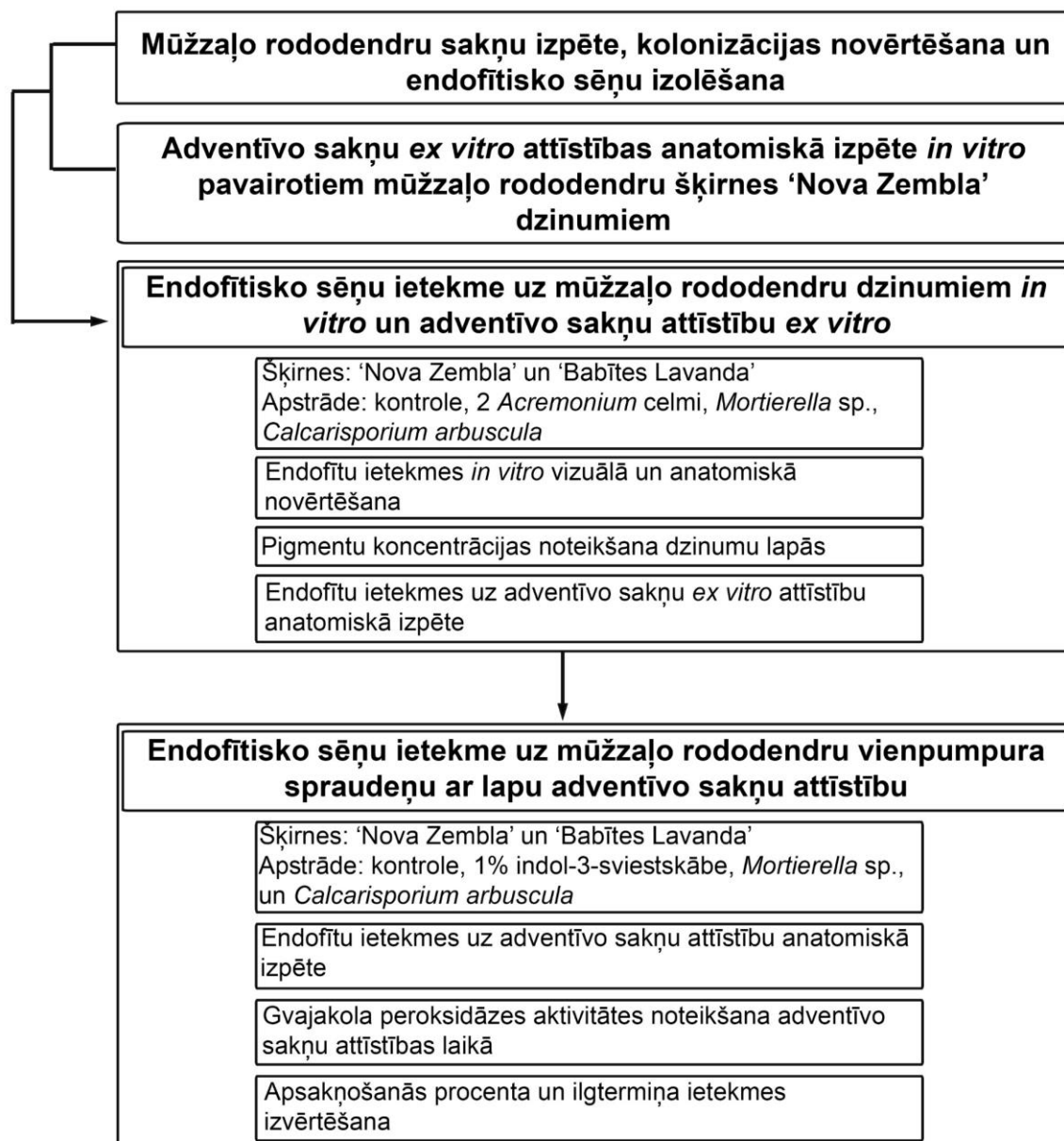
Literatūrā vairāk uzmanības pievērsts mikorizālo sēņu ietekmei dažādās pavairošanas sistēmās, kas saistāms ar mikorizālo sēņu spēju palielināt substrātā esošo barības vielu pieejamību un veicināt to uzņemšanu saimniekaugos. Līdzīgi kā pētījumos ar endofītiskajām sēnēm arī mikorizālās sēnes pamatā tiek pētītas audu kultūrā pavairotu augu modeļsistēmās un krietni retāk pievēršas klasiskajām veģetatīvās pavairošanas metodēm. *Rhododendron fortunei* dzinumu inokulācija ar mikorizālo sēni *Oidiodendron maius* palielina augu biomasu un slāpekļa koncentrāciju augos, kā arī ar slāpekļa uzņemšanu un metabolismu saistīto gēnu ekspresiju (Wei et al. 2016). Savukārt pētījumā par trīs dažādu erikoīdās mikorizas sēņu, *Oidiodendron maius*, *Peizizella ericae* un *Hymenoscyphys ericae*, ietekmi uz *Leuchotoe fontanesiana* spraudņiem konstatēta atšķirīga sēņu ietekme uz sakņu iniciāciju, savukārt kopējo apsākņošanās procentu ilgākā laikā periodā sēnes celms būtiski nemainīja (Scagel 2005).

Neraugoties uz to, ka endofītu ietekme uz augiem ir plaši pētīta, trūkst datu par to potenciālo izmantošanu klasiskajās augu veģetatīvās pavairošanas sistēmās, kāda ir pavairošana

ar spraudējiem. Ņemot vērā endofītu spēju sintezēt biotiskā un abiotiskā stresa rezistenici un augu augšanu veicinošus savienojumus, šāda veida daudzpusīgiem un padziļinātiem pētījumiem var būt liela praktiska nozīme. Līdz šim spraudēju apsākņošanās pētījumos plaši izmantota anatomiska un fizioloģiska metodiskā pieeja, kas veido padziļinātu izpratni par dažādu apstrādes variantu ietekmi un rizoģenēzes norisi. Ņemot vērā jau uzkrāto informāciju, šāda pieeja, apvienojot anatomiskās un fizioloģiskās metodes, izvēlēta arī konkrētajam pētījumam.

2 MATERIĀLI UN METODES

Darba eksperimentālo daļu veica no 2010. gada oktobra līdz 2015. gada maijam LU Bioloģijas fakultātes Augu fizioloģijas katedrā kā arī LU Botāniskā dārza Augu bioloģijas laboratorijā. Eksperimentu shēma redzama 2.1. attēlā.



2.1. attēls. Darba eksperimentālā shēma.

Augu materiālu eksperimentiem ar vienspūru spraudņiem ieguva LU Rododendru selekcijas un izmēģinājumu audzētavā „Babīte”. Augu materiālu eksperimentiem ar mūžzaļo rododendru šķirnēm ‘Babītes Lavanda’ un ‘Nova Zembla’ *in vitro* apstākļos ieguva, pavairojot LU Botāniskā dārza Augu bioloģijas laboratorijā kultūrā jau ievadītus augus. Mikroorganismu taksonomisko piederību noteica Latvijas Mikroorganismu kultūru kolekcijā.

2.1 Eksperimentos izmantotās šķirnes

Eksperimentos izmantoja divas mūžzaļo rododendru šķirnes – ‘Babītes Lavanda’ un ‘Nova Zembla’.

‘Babītes Lavanda’. Mūžzaļo rododendru šķirne, ko 1979. gadā no Katavbas rododendra (*Rhododendron catawbiense* Michx.) brīvās apputeksnēšanās sējeņiem izdalījis Rihards Kondratovičs. Šķirnes statusā ‘Babītes Lavanda’ reģistrēta 2000. gadā. Divdesmitgadīgi augi var sasniegt 2 m augstumu. Tie ir kompakti krūmi, kas zied maija beigās – jūnija pirmajā pusē. Ziedkopa kompakta, puslodveidīga, 17 cm diametrā, ar 20–26 lavandas krāsas ziediem. Ziedi – plati piltuvveida, 5,5–7 cm diametrā, zieda iekšpusē uz augšējās vainaglapas dzeltens lāsojums (Kondratovičs 2005).

‘Nova Zembla’. Mūžzaļo rododendru šķirne, kas selekcionēta 1902. gadā Holandē, krustojot šķirni ‘Parson’s Gloriosum’ ar izturīgu sarkanziestu hibrīdu, Latvijā introducēta 1978. gadā no Vācijas. Augi ir stāvi, vidēji lieli un skraji. Zied maija beigās – jūnija pirmajā pusē ar tumši sarkaniem, vidēja lieluma, piltuvveida formas ziediem. Pasaulē šī ir viena no populārākajām un izplatītākajām sarkanziestu rododendru šķirnēm (Kondratovičs un Kondratovičs 2002).

2.2 Mūžzaļo rododendru sakņu mikroskopiskā izpēte

Sakņu mikroskopiskajai izpētei ņēma trīs mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ trīsgadīgu augu saknes un atdalīja smalkākās saknes, ko rūpīgi noskaloja tekošā ūdenī, lai atbrīvotos no substrāta daļām. Pēc tam daļu sakņu atstāja endofītu izdalīšanai, savukārt pārējās saknes 10–15 minūtes vārīja 10% kālija hidroksīda ūdens šķīdumā (KOH). Tās atkārtoti skaloja tekošā ūdenī un noskalotās saknes 5 minūtes vārīja 0,05% triptānzilā – laktoglicerīna (1:1:3, v:v:v, pienskābe : glicerīns : destilēts ūdens) maisījumā (Hayman 1970). Pēc tam saknes rūpīgi noskaloja un uzglabāja laktoglicerīna maisījumā līdz tālākai izpētei. Pirms mikroskopēšanas saknes sagrieza 1 cm garos fragmentos un izvietoja laktoglicerīna pilienā uz priekšmetstikla, pārklājot ar segstiklu, un veica to analīzi, izmantojot gaismas mikroskopu Leica DM5500 un digitālo fotokameru DFC490. Iegūto attēlu apstrādi un mērījumus veica, izmantojot darba staciju Dell Precision™ T7400 un datorprogrammu Image-Pro Plus v. 6.2. Katram augam analizēja 20 sakņu fragmentus, katram no tiem veicot mikroskopēšanu 10 redzeslaukos (400x palielinājumā). Katrā redzeslaukā noteica procentuālo sēņu hifu klātbūtni sakņu šūnās.

Mikorizālās sēnes atpazīna pēc tām raksturīgajiem hifu tinumiem (Read 1996), par endofītiskām sēnēm uzskatīja hifu tinumus neveidojošas sēnes. No visiem rezultātiem aprēķināja vidējo vērtību un standartklūdu.

2.3 Mūžzaļo rododendru sakņu endofītisko sēņu izolēšana

Sakņu endofītiskās sēnes izolēja no trīs mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ augu saknēm, un katra izdalīšanas reize bija atsevišķs eksperiments. Sēņu izolēšanu veica 2011. gada maijā, 2011. gada oktobrī un 2012. gada aprīlī. Saknes pirms tam rūpīgi nomazgāja un no tām atdalīja lielākās augsnes daļas. Pēc tam tās 3 min apstrādāja ar 3,5% nātrija hipohlorītu (70% balinātājs ACE) un trīs reizes skaloja ar destilētu, autoklavētu ūdeni. Pēc sterilizēšanas saknes sagrieza 1–2 cm garos fragmentos un izkārtēja Petri traukos uz barotnēm pa septiņiem sakņu fragmentiem katrā.

No pirmā auga saknēm endofītus izdalīja uz ūdens agara (20 g l⁻¹ agars), iesala ekstrakta agara (10 g l⁻¹ iesala ekstrakts, 20 g l⁻¹ agars), Čapeka agara (20 g l⁻¹ Čapeka agars, 10 g l⁻¹ agars) un kartupeļu dekstrozes agara barotnēm. Kartupeļu dekstrozes agaru gatavoja no šķīduma, kurā 30 min vārīti 300 g l⁻¹ kartupeļi, kopā ar 10 g l⁻¹ dekstrozi un 20 g l⁻¹ agaru. Pārējiem diviem augiem endofītus no saknēm izolēja tikai uz kartupeļu dekstrozes agara barotnēm.

Pirmajā eksperimentā izmantoja sešus Petri traukus no katras barotnes. Četrus no tiem uzglabāja istabas temperatūrā un divus – tumsā 4 °C temperatūrā. Savukārt pārējos divos eksperimentos izmantoja 12 Petri traukus ar kartupeļu dekstrozes agara barotni un astoņus no tiem uzglabāja istabas temperatūrā un četrus – tumsā 4 °C temperatūrā.

Veica regulāru kultūru kontroli un, sākoties sēņu micēliju attīstībai, tās pārnesa atsevišķi uz jaunas kartupeļu dekstrozes agara barotnes un uzglabāja sākotnējās izolēšanas apstākļos. Sporulējošos micēlijus nogādāja Latvijas Mikroorganismu kultūru kolekcijā, kur noteica sēņu taksonomisko piederību.

Lai raksturotu ģints izolēšanas frekvenci, iegūto ģints izolātu skaitu dalīja ar kopējo izolātu skaitu konkrētajos izolēšanas apstākļos katrā eksperimentā un pārrēķināja procentos.

2.4 Mūžzaļo rododendru veģetatīvās pavairošanas metodes

2.4.1 Rododendru dzinumu pavairošana *in vitro* un endofītu inokulācija

Dzinumu pavairošanu veica no LU Botāniskā dārza Augu bioloģijas laboratorijas *in vitro* kolekcijā esošiem mūžzaļo rododendru šķirņu ‘Babītes Lavanda’ un ‘Nova Zembla’ dzinumiem. Tos sagrieza ~ 1 cm divposmu spraudņos ar divām lapām un horizontāli novietoja uz Andersona barotnes (Anderson 1984) ar 20 g l⁻¹ saharozes, 0,1 g l⁻¹ inozitola, 0,04 g l⁻¹ adenīna, 1 g l⁻¹ kazeīna hidrolizāta, 0,4 mg l⁻¹ tiamīna, 0,1 mg l⁻¹ piridoksīna, 0,1 g l⁻¹ nikotīnskābes, 7,9 g l⁻¹ agara, 3 mg l⁻¹ N6-(2-izopentenil) adenīna (2iP) un pH 5,5. Kultūras – 30 spraudēni audzēšanas traukā – trīs mēnešus inkubēja 23 ± 2 °C aukstajā baltajā fluorescentajā gaismā (50 μmol m⁻²s⁻¹) ar 16 h fotoperiodu.

Pēc trīs mēnešiem abu šķirņu dzinumus inokulēja ar iepriekš no rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ auga saknēm izolētajām sēnēm (diviem *Acremonium* sp. izolātiem, vienu *Mortierella* sp. un *Calcarisporium arbuscula*), audzēšanas traukos pievienojot 10 dienas vecu sēnes kultūras fragmentu (7 mm diametrā), un turpināja audzēt iepriekšējos apstākļos. Mēnesi pēc sēņu kultūru pievienošanas audzēšanas traukos novērtēja augu vizuālo stāvokli, kā arī noteica pigmentu koncentrāciju un fiksēja paraugus (līdz 10 dzinumiem katram variantam) anatomiskajai izpētei. Ievākto augu materiālu fiksēja 37% formalīna – ledus etiķskābes – 96% etanola, destilēta ūdens (FEE) šķīdumā (10:5:50:35, v:v:v:v) (Ruzin 1999). Salīdzinājumam izmantoja ar endofītiskajām sēnēm neinokulētus abu rododendru šķirņu dzinumus.

2.4.2 *In vitro* pavairotu rododendru dzinumu apsākšana *ex vitro*

Ex vitro apsākšanas eksperimentu veica divas reizes:

- 1) lai noskaidrotu *ex vitro* adventīvo sakņu attīstību neapstrādātiem *in vitro* pavairotiem rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ dzinumiem;
- 2) lai noskaidrotu *in vitro* inokulēto sēņu ietekmi uz *ex vitro* apsākšanos abām izmantotajām šķirnēm.

Pirmajā eksperimentā izmantoja trīs mēnešus vecus *in vitro* pavairotus dzinumus un pirms ievietošanas substrātā tiem apstrādi neveica. Savukārt otrajā eksperimentā izmantoja ar *Acremonium* sp., *Mortierella* sp. un *Calcarisporium arbuscula in vitro* inokulētus rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ dzinumus un ar *Mortierella* sp. un *Calcarisporium arbuscula in vitro*

inokulētus rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ dzinumus. Salīdzinājumam izmantoja neinokulētus *in vitro* pavairotus abu šķirņu dzinumus.

Abos eksperimentos 1,5–2 cm garus dzinumu apikālos fragmentus apsakņoja *ex vitro* kūdras substrātā (70% frēzkūdra, 30% grieztās sūnu kūdra, struktūra 0–5 mm, pH/KCl 4,5±0,3). Dzinumus ievietoja plastmasas dēstu kastēs, kuras pārklāja ar polietilēna plēvi un uzglabāja audzēšanas kamerā ar 16 h fotoperiodu un 23 / 20 ± 2 °C diennakts temperatūru. Anatomiskajai izpētei katram apstrādes variantam pirmajā *ex vitro* eksperimenta dienā un pēc tam 2–3 nedēļas katru otro dienu ievāca 4–5 dzinumus, ko fiksēja FEE šķīdumā.

2.4.3 Rododendru pavairošana ar vienpumpura spraudeņiem ar lapu

Eksperimentos no svaigi grieztiem mūžzaļo rododendru šķirņu ‘Babītes Lavanda’ un ‘Nova Zembla’ kārtējā gada dzinumiem pagatavoja vienpumpura spraudeņus ar lapu, kas sastāvēja no 2–3 cm gara dzinuma fragmenta un pieaugušas lapas ar paduses pumpuru. Lai samazinātu transpirācijas virsmu, lapu plātnes saīsināja par 1/3–1/2.

Eksperimentā ar rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ vienpumpura spraudeņiem izmantoja četrus eksperimentālos variantus – trīs apstrādes variantus un kontroli. Divu apstrādes variantu vienpumpura spraudeņiem stumbra ievainojuma vietu apstrādāja ar sakņu endofītisko sēņu *Mortierella* sp. un *Calcarisporium arbuscula* sporu suspensiju un talka pulveri. Vienam apstrādes variantam vienpumpura spraudeņu stumbra ievainojuma virsmu apstrādāja ar 1% indol-3-sviestskābes (ISS) – talka pulveri. Kontroles varianta vienpumpura spraudeņiem stumbra ievainojuma virsmu apstrādāja ar tīru talka pulveri. Rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ vienpumpura spraudeņus apstrādāja pēc līdzīgas shēmas, bet neizmantoja *Mortierella* sp. apstrādes variantu.

Pirms eksperimenta uzsākšanas eksperimentos izmantotās sēnes uzēja uz jaunas kartupeļu dekstrozes agara barotnes. Eksperimenta uzsākšanas dienā no 10 dienas vecām kultūrām gatavoja sporu suspensiju, kuras iegūšanai 1 cm² lielu micēlija fragmentu sajauca ar 20 ml destilēta ūdens (modificēts Jansa and Vosátka 2000) un, izmantojot hemocitometru, mikroskopiski noteica sēņu sporu koncentrāciju (Parsa et al. 2013). Sporu uzskaiti veica 10 atkārtojumos. Sporu koncentrācija abu sēņu suspensijās bija 3 × 10⁵ sporas ml⁻¹.

Vienpumpura spraudeņus ievietoja plastmasas dēstu kastēs (30 × 60 × 10 cm), kā substrātu izmantojot kūdras un pussatrūdējušu priežu skuju maisījumu attiecībā 1:1 (pH 4,2). Pirms spraudeņošanas substrātu samitrināja. Ar piķējamā irbulīša palīdzību izveidoja bedrītes,

kurās ievietoja vienpumpura spraudņu dzinuma daļu līdz paduses pumpuram. Substrātu ap spraudeni sablīvēja tā, lai, pavelkot aiz lapas, spraudenis turētos substrātā. Kastes nosedza ar polietilēna plēvi. Par normālu mitruma režīmu liecināja ūdens kondensāta pilienu veidošanās uz plēves iekšējās virsmas. Vienpumpura spraudņus turēja 23 °C temperatūrā dienā un 20 °C temperatūrā naktī, ar 16 h ilgu fotoperiodu. Anatomisko preparātu pagatavošanai katram apstrādes variantam ievāca deviņus vienpumpura spraudņus no 1. līdz 5. dienai, katru dienu, un turpmāk katrā trešajā dienā līdz eksperimenta beigām. Trīs no ievāktajiem spraudņiem fiksēja FEE anatomisko preparātu pagatavošanai, savukārt ievāktos spraudņu lapas sasaldēja – 20 °C peroksidāzes aktivitātes noteikšanai.

2.5 Anatomisko preparātu pagatavošana un izpēte

Anatomisko preparātu pagatavošanai ievāktos un FEE fiksētos paraugus atūdeņoja etanola un terc-butanola (TBA) maisījumu sērijā (2.1. tabula) (Ruzin 1999).

2.1. tabula

Atūdeņošanas shēma etanola un terc-butanola maisījumu sērijā

Nr. p. k.	96 % etanols (ml)	100 % etanols (ml)	Destilēts ūdens (ml)	TBA (ml)	Vazelīneļa (ml)
1.	50		40	10	
2.	50		30	20	
3.	50		15	35	
4.	50			50	
5.		25		75	
6.		25		75	
7.				100	
8.				100	
9.				67	33

In vitro pavairotajiem un *ex vitro* apsakņotajiem dzinumiem ekspozīcijas laiks katrā šķīdumā bija 8–16 h, savukārt vienpumpura spraudņiem tas bija 24 h. Pēc atūdeņošanas etanola un terc-butanola maisījumu sērijā paraugus infiltrēja ar histovasku (Histowax, HistoLab, Zviedrija audu kultūrā pavairotajiem dzinumiem, un DiaWax, Diapath, Itālija vienpumpura spraudņiem).

Histovaska infiltrāciju veica pēc šādas shēmas:

1. Nolēja 1/3 tilpuma terc-butanola/vazelīneļļas maisījuma un aizstāja to ar atbilstošu tilpumu tīra izkausēta histovaska un ievietoja termostatā 58 °C.

2. Pēc 12 h nolēja pusi maisījuma tilpuma un aizstāja ar tādu pašu tilpumu tīra izkausēta histovaska. Procedūru atkārtoja trīs reizes ar 4–16 h intervālu *in vitro* pavairotajiem un *ex vitro* apsakņotajiem dzinumiem un 24 h intervālu vienpumpura spraudņiem.
3. Pēdējā reizē nomainīja visu histovaska tilpumu. Procedūru atkārtoja trīs reizes ar 4–16 h intervālu *in vitro* pavairotajiem un *ex vitro* apsakņotajiem dzinumiem un 24 h intervālu vienpumpura spraudņiem (Ruzin 1999).

Paraugus pirms griešanas ievietoja atsevišķos konteineros un atstāja termostatā uz diennakti. Pirms griezumu pagatavošanas paraugus izņēma no termostata un ļāva histovaskam sacietēt. Sacietējušo materiālu montēja uz rotācijas mikrotoma Leica RM 2145 – Rotary Microtome (Leica Microsystems Nussloch GmbH) un gatavoja 16 µm (*in vitro* pavairotajiem un *ex vitro* apsakņotajiem dzinumiem) un 25 µm (vienpumpura spraudņiem) biezu griezumu sērijas, no kurām izvēlējās kvalitatīvākos griezumus un tos novietoja uz ar adhezīvu noklātiem priekšmetstikliem.

Priekšmetstiklus ievietoja priekšmetstiklu turētājā un paraugus atparafinēja un krāsoja pēc šādas shēmas:

- 100% ksilols – 10 min
- 100% ksilols – 10 min
- 100% etanols-ksilols (1:1) – 2 min
- 96% etanols – 2 min
- 70 % etanols – 2 min
- 50 % etanols – 2 min
- Destilēts ūdens – 2 min
- Astra zilais – safranīns – 1 min
- Destilēts ūdens – 2 min
- Destilēts ūdens – 2 min
- Destilēts ūdens – 2 min
- 96% etanols – 2 min
- 96% etanols – 2 min
- 100% etanols – 2 min
- 100% etanols-ksilols (1:1) – 2 min
- 100% ksilols – 2 min
- Pertex (HistoLab) (modificēts Braune et al. 1999).

Preparātu izpētei un fotografēšanai izmantoja gaismas mikroskopu Leica DM5500 un digitālo fotokameru DFC490. Iegūto attēlu apstrādi un mērījumus veica, izmantojot darba staciju Dell Precision™ T7400 un datorprogrammu Image-Pro Plus v. 6.2. Attēlu pēcapstrādi veica ar datorprogrammu Adobe Photoshop CS6.

2.6 Pigmentu koncentrācijas spektrofotometriska noteikšana

Pigmentu koncentrācijas noteikšanai izmantoja mūžzaļo rododendru šķirņu ‘Babītes Lavanda’ un ‘Nova Zembla’ *in vitro* pavairotu dzinumumu lapas. Piestā ievietoja 30 mg augu lapu, pievienoja nedaudz kvarca smilšu un 25 mg CaCO₃ kristālus, kā arī nedaudz šķīdinātāju (96 % etanolu). Piestas saturu berza, līdz ieguva homogēnu masu, ko nelielām porcijām, pakāpeniski pievienojot šķīdinātāju, pārnesa graduētā centrifūgas mēģenē. Mēģeni uzpildīja līdz 10 ml un centrifugēja 5 min (5000 rpm).

Spektrofotometriski ar Camspec M501 Single beam UV/Vis spektrofotometru noteica šķīduma optisko blīvumu gaismas viļņa garumos, kas atbilst hlorofila *a* (664 nm), hlorofila *b* (648 nm), hlorofilu *a+b* (652 nm) un karotinoīdu (470 nm) absorbcijas maksimumiem (Lichtenthaler 1987).

Pigmentu koncentrāciju aprēķināja pēc šāda vienādojuma:

$$A = C \cdot V \cdot (1000 \cdot m)^{-1}$$

kur: C - pigmentu koncentrācija (mg·l⁻¹);

V – pigmentu izvilkuma tilpums (ml);

m – augu materiāla iesvars (g).

Katram apstrādes variantam pigmentus noteica trīs bioloģiskajos atkārtojumos, un katram no tiem bija trīs ķīmiskie atkārtojumi.

2.7 Gvajakola peroksidāzes aktivitātes spektrofotometriska noteikšana

Gvajakola peroksidāzes aktivitātes spektrofotometriskai noteikšanai izmantoja mūžzaļo rododendru šķirņu ‘Babītes Lavanda’ un ‘Nova Zembla’ vienpumpura spraudēņu lapas. No katra apstrādes variantā ievāca deviņus vienpumpura spraudēņus – trīs bioloģiskos atkārtojumus – un no katra atkārtojuma analīzēm izmantoja 0,5 g augu lapu. Piestā lapas sasaldēja šķidrā slāpekļī un saberza ar piestalu. Enzīmu ekstrahēšanai izmantoja 25 mmol l⁻¹

HEPES/KOH buferi (pH 7,2), kas saturēja 1 mmol l⁻¹ EDTA, 0,8% Triton X-100 un 3% polivinilpolipirrolidona. Enzīmus ekstragēja 15 min 4 °C temperatūrā. Homogenātu centrifugēja 20 min, ar paātrinājumu 13000 g. Analīzēm izmantoja supernatantu (Andersone and Ievinsh 2002).

Peroksidāzes aktivitāti mērīja ar Camspec M501 Single beam UV/Vis spektrofotometru 470 nm viļņu garumā. Reakcijas maisījums saturēja 2 ml 50 mmol l⁻¹ Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ bufera (pH 7,0) ar 10 mmol l⁻¹ gvajakola, 0,5 ml 0,03 mol l⁻¹ H₂O₂ un 0,1 ml enzīmu ekstrakta. Kā kontroles šķīdumu izmantoja reakcijas šķīdumu pirms H₂O₂ pievienošanas. Enzīma aktivitāti aprēķināja kā absorbcijas izmaiņas minūtē uz 1 g audu svaigās masas.

2.8 Datu statistiskā analīze

Dzinumu anatomisko mērījumu salīdzināšanai *ex vitro* adventīvo sakņu attīstības laikā, apsakņoto un neapsakņoto dzinumu anatomiskajam salīdzinājumam, pigmentu koncentrāciju salīdzinājumam *in vitro* inokulētu mūžzaļo rododendru lapās, kā arī peroksidāzes aktivitātes izmaiņu salīdzināšanai starp apstrādes variantiem datu sākotnējo apstrādi, vidējo vērtību, standartnoviržu (SD) un standartklūdu (SE) aprēķināšanu veica, izmantojot datorprogrammu Microsoft Excel (Microsoft Office 365), savukārt statistisko analīzi veica, izmantojot programmu GraphPad Prism 6 (v.6.01).

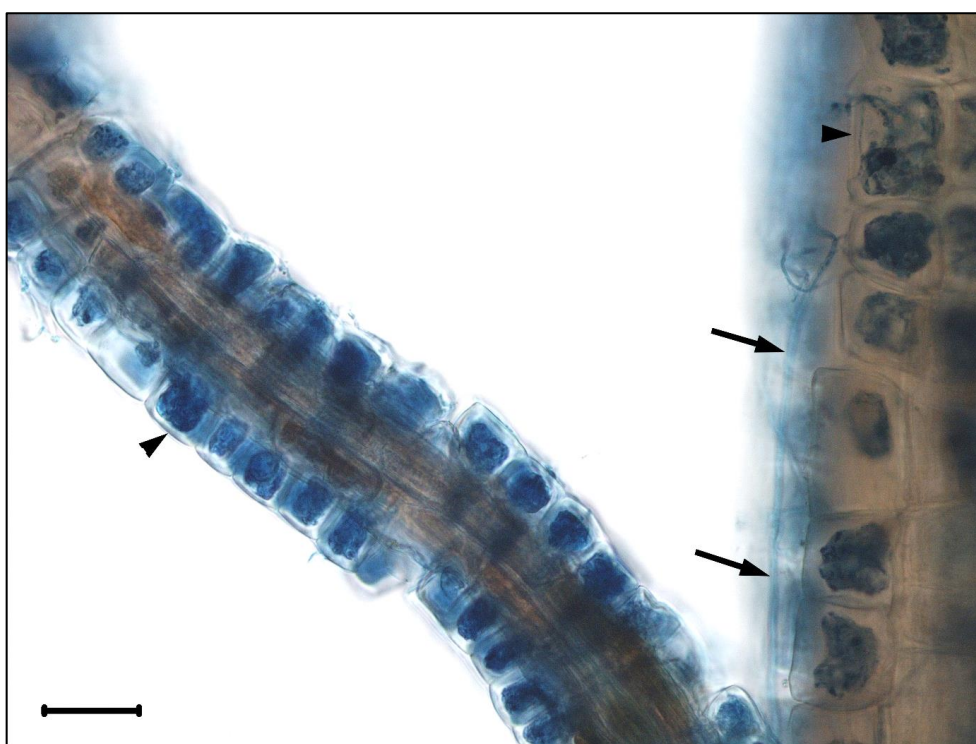
Visiem datiem atlasīja izlecošās vērtības un veica D'Agostīno – Pīrsona normalitātes testu ($p = 0,05$). Dažādu variantu datus savstarpēji salīdzināja ar vienvirziena dispersijas analīzi (ANOVA – *analysis of variance*) ar Tukeja *post-hoc* testu. Korelācijas analīzei izmantoja Pīrsona korelāciju ($\alpha = 0,05$).

3 REZULTĀTI

3.1 Endofitiskās sēnes mūžzaļo rododendru saknēs

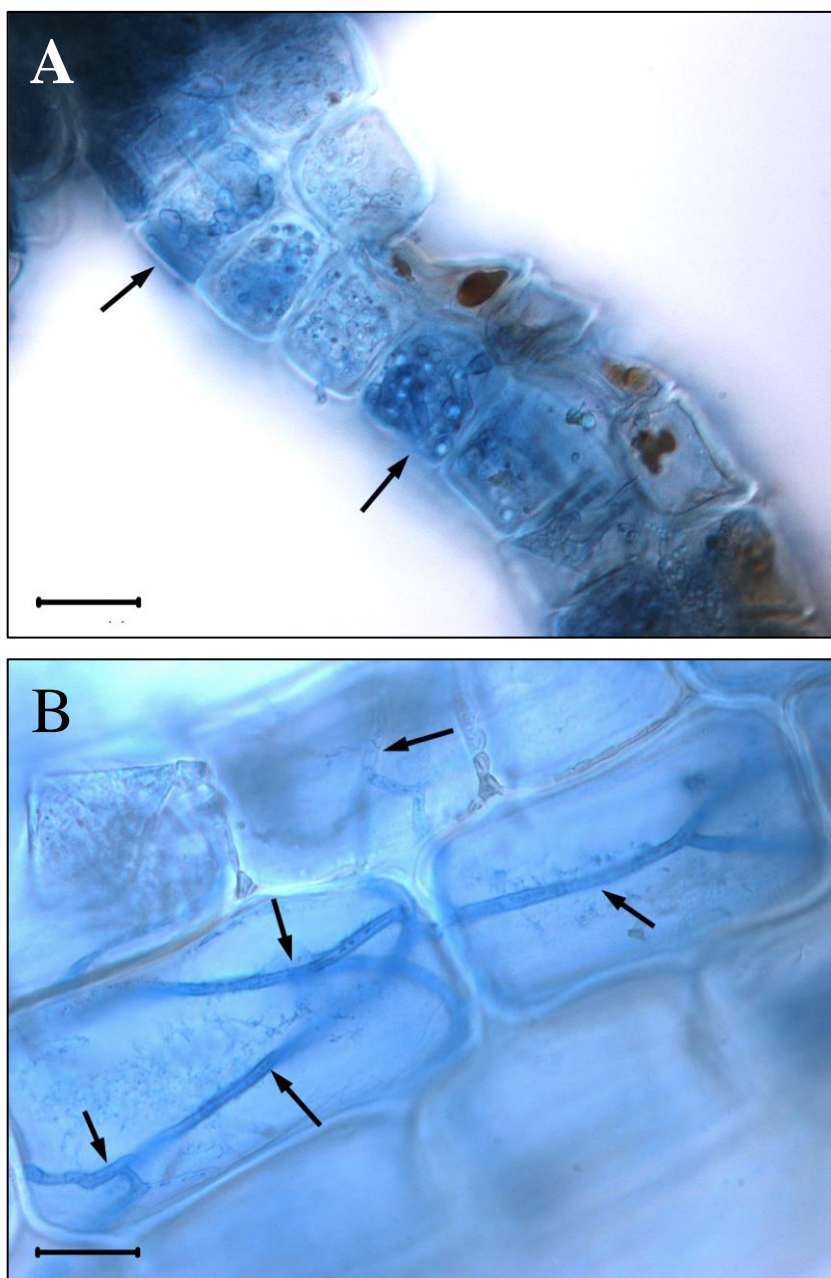
3.1.1 Sakņu kolonizācijas novērtējums

Veicot ar triptānzilo krāsvielu iekrāsotu mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ trīsgadīgu augu sakņu mikroskopisko izpēti, novēroja sēņu hifas gan ārpus saknēm, gan sakņu rizodermas šūnās (3.1. un 3.2. A attēls). Īpaši raksturīgi tas bija saknēm ar diametru $\leq 150 \pm 45 \mu\text{m}$, kurās sēņu hifas bija saskatāmas gandrīz katrā rizodermas šūnā un kolonizācija sasniedza 100%. Savukārt saknēs ar diametru $>150 \pm 45 \mu\text{m}$ sēņu klātbūtne bija mazāk izteikta, vai atsevišķos redzes laukos hifas nekonstatēja vispār, un kolonizācija bija $37 \pm 9\%$.



3.1. attēls. Sēņu hifas mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ trīsgadīga auga sakņu rizodermas šūnās (bultas gals) un uz rizodermas (bultas). Nogrieznis atbilst $30 \mu\text{m}$.

Aplūkojot saknes lielākā palielinājumā, novēroja gan erikoīdajai mikorizai raksturīgos hifu tinumus, gan atsevišķas hifas, kas auga rizodermas šūnās, bet neveidoja erikoīdajai mikorizai raksturīgos hifu tinumus (3.2. B attēls). Taču tādu bija salīdzinoši maz, un sakņu kolonizāciju galvenokārt veidoja mikorizālas sēnes.



3.2. attēls. Sēņu hifas mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ trīsgadīga auga sakņu rizodermas šūnās. A – erikoīdās mikorizas hifu tinumi (bultas). B – tinumus neveidojošas hifas (bultas). Nogrieznis atbilst A, B – 100 μm.

Rizodermas šūnās, kas bija kolonizētas ar tinumus neveidojošām hifām, citoplazma bija blīva un graudaina, kas liecināja par šo šūnu metabolisko aktivitāti un tādējādi arī par to, ka šīs šūnas joprojām bija dzīvas. Savukārt šūnās ar erikoīdajai mikorizai raksturīgajiem hifu tinumiem tie aizpildīja visu šūnas tilpumu un par auga metabolisko procesu norisi šajās šūnās spriest nebija iespējams. Kolonizētajām šūnām nenovēroja vizuālus bojājumus, kā arī nekonstatēja hifu augšanu sakņu vadaudos.

3.1.2 No mūžzaļo rododendru saknēm izolētās endofītiskās sēnes

Sākotnēji eksperimentējot ar barotņu sastāvu, konstatēja, ka vispiemērotākā barotne mūžzaļo rododendru sakņu endofītisko sēņu izolēšanai ir kartupeļu dekstrozes agars. Uz ūdens agara neieguva ne sēņu, ne baktēriju kultūras, savukārt uz iesala ekstrakta agara strauji vairojās baktērijas (*Bacillus* sp.). Uz Čapeka agara izolēja galvenokārt *Penicillium* ģints sēnes. Turpmākajiem eksperimentiem izmantoja tikai kartupeļu dekstrozes barotni, turpinot izolēšanu istabas temperatūrā un 4 °C. No mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ trīsgadīgu augu saknēm trīs eksperimentos uz kartupeļu dekstrozes agara barotnes kopā ieguva 152 endofītisko sēņu izolātus no astoņām sēņu ģintīm un 32 sterilus sēņu micēlijus (3.1. tabula).

3.1. tabula

No trīs mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ trīsgadīgu augu saknēm izolēto endofītisko sēņu izolēšanas frekvence (%) istabas temperatūrā (I) un 4 °C (II)

	Kopējais izolātu skaits	1		2		3	
		I	II	I	II	I	II
<i>Acremonium</i> sp.	42	34%		26%		18%	
<i>Alternaria</i> sp.	8	6%		4%		5%	
<i>Aspergillus</i> sp.	6	3%		4%		3%	
<i>Calcarisporium arbuscula</i> Preuss.	2				22%		
<i>Cylindrocarpon</i> sp.	7					11%	
<i>Mortierella</i> sp.	11			11%		5%	
<i>Penicillium</i> sp.	33	23%	25%	21%		13%	20%
<i>Trichoderma</i> sp.	43	26%		21%		31%	
Sterili micēliji	32	9%	75%	13%	78%	10%	80%

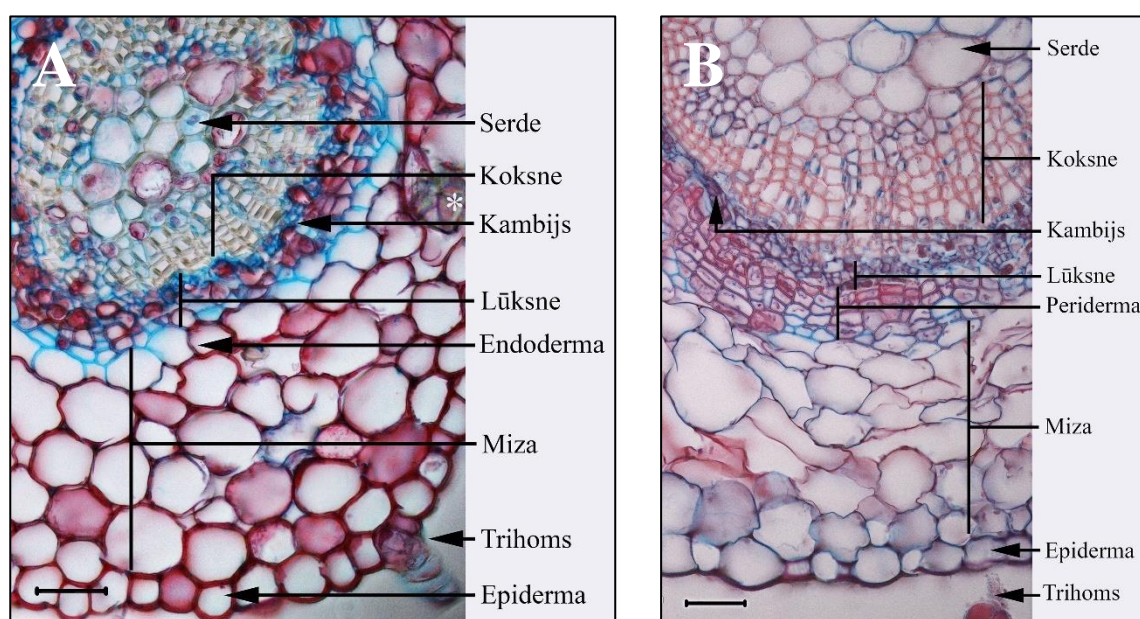
Daudzveidīgāku endofītisko sēņu izolātu sastāvu ieguva pēc to izolēšanas istabas temperatūrā, savukārt 4 °C ieguva vairāk sterilu micēliju. Procentuāli lielāko īpatsvaru starp istabas temperatūrā izolētajām sēnēm visos trīs izolēšanas eksperimentos veidoja *Acremonium*, *Penicillium* un *Trichoderma* ģintīm piederošās sēnes. Šo taksonu izolēšanas frekvence mainījās starp eksperimentiem, savukārt *Alternaria* un *Aspergillus* ģinšu sēnēm izolēšanas frekvence saglabājās līdzīga visu trīs eksperimentu ietvaros. *Cylindrocarpon* ģints sēnes, kā arī *Calcarisporium arbuscula* izolēja tikai atsevišķu eksperimentu ietvaros.

Tālākajos eksperimentos izmantoja divus *Acremonium* izolātus (*Acremonium* sp. 5. izolāts un *Acremonium* sp. 7. izolāts), vienu *Mortierella* izolātu un *Calcarisporium arbuscula*.

3.2 *In vitro* pavairotu mūžzaļo rododendru dzinumu anatomiskā uzbūve

In vitro pavairotu mūžzaļo rododendru šķirņu ‘Babītes Lavanda’ un ‘Nova Zembla’ dzinumu šķērsriezumu mikroskopiskajā izpētē konstatēja augstu *in vitro* pavairotu dzinumu un līdz ar to arī visa eksperimentos izmantotā augu materiāla anatomisko heterogenitāti. Abu rododendru šķirņu *in vitro* pavairotu dzinumu centrālie cilindri atšķīrās pēc koksnes un lūksnes vadaudu slāņu biezuma.

Pēc anatomiskās uzbūves abu šķirņu *in vitro* pavairotie dzinumi bija līdzīgi, ar jauniem kokaugiem raksturīgām anatomiskajām struktūrām – epidermu, mizu, lūksni, kambiju, koksni un serdi (3.3. attēls).

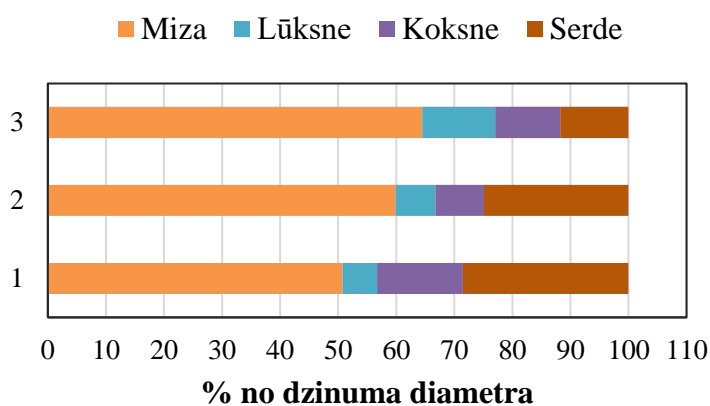


3.3. attēls. *In vitro* pavairotu mūžzaļo rododendru dzinumu anatomiskā uzbūve. A – ‘Babītes Lavanda’. B – ‘Nova Zembla’. * – drūza. Nogrieznis atbilst A, B – 30 μm.

Abu rododendru šķirņu dzinumiem epidermu veidoja viena blīvi sakārtotu šūnu kārtā ar tajā nevienmērīgi izvietotiem nezarotiem daudzšūnu trihomiem. Epidermas šūnu ārējie šūnapvalki bija nedaudz uzbiezināti. Mizu veidoja samērā cieši sakārtotas lielas, parenhimatiskas šūnas, kurās novēroja kalcija oksalāta kristālus – drūzas. Atsevišķiem rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ dzinumiem novēroja arī vāji izteiktu endodermu. Savukārt 29% no analizētajiem rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ dzinumiem lūksnes rajonā novēroja sekundāros segaudus – peridermu, ko veidoja dzīvas, tangenciāli izstieptas šūnas ar nedaudz uzbiezinātiem šūnapvalkiem, radiāli sakārtotas 3–5 šūnu slāņos. Dzinumu centrālajā daļā atradās vadaudi un serde. Kopumā 80% no rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ dzinumiem vadaudi bija izkārtoti slēgtā gredzenā ap serdi, savukārt rododendru šķirnei ‘Babītes Lavanda’

to novēroja 50% no analizētajiem dzinumiem. Pārējos gadījumos vadaudi bija attīstīti vāji un izkārtoti kūlīšos. Abu rododendru šķirņu dzinumiem lūksnes vadaudi galvenokārt bija agrīnā attīstības stadijā, šūnas bija sīkas, un sietstobru vai pavadītājšūnu specializāciju anatomiski nevarēja noteikt. Abu rododendru šķirņu dzinumiem labāk attīstīti bija koksnes vadaudi. Starp lūksni un koksni atradās vāji izteikts kambijs, ko veidoja divi radiāli sakārtotu šūnu slāņi. Dzinumu centrālajā daļā atradās serde, ko, tāpat kā mizu, veidoja lielas parenhimatiskas šūnas.

Anatomisko struktūru mērījumi liecināja par augstu heterogenitāti abu pētīto mūžzaļo rododendru šķirņu *in vitro* pavairotu dzinumu anatomiskajā uzbūvē. Līdzīga diametra dzinumiem novēroja atšķirīgu audu slāņu procentuālo sadalījumu attiecībā pret stumbra diametru un dažādas variācijas lūksnes un koksnes slāņu biezumā (3.4. attēls).



3.4. attēls. Trīs *in vitro* pavairotu mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ līdzīga diametra dzinumu audu slāņu procentuālais sadalījums attiecībā pret šo dzinumu diametru.

Līdzīgi tas bija arī rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ *in vitro* pavairotajiem dzinumiem. Anatomisko mērījumu dati atbilda normālajam sadalījumam, tāpēc salīdzinošajai statistikai izmantoja vienvirziena dispersijas analīzi. Abu pētīto rododendru šķirņu dzinumu diametri un to anatomisko struktūru mērījumi savstarpēji statistiski būtiski atšķīrās ($p < 1 \times 10^{-4}$) (3.2. tabula).

In vitro pavairotu rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ stumbru diametrs, mizas slāņa biezums un centrālo cilindru diametrs bija būtiski lielāks nekā rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ dzinumiem ($p < 1 \times 10^{-4}$, $p < 1 \times 10^{-4}$, $p = 1,7 \times 10^{-3}$). Būtiskas atšķirības konstatēja arī starp *in vitro* pavairotu dzinumu un centrālo cilindru diametriem, lūksnes un koksnes slāņu biezumiem katras šķirnes ietvaros (3.2. tabula).

3.2. tabula

Mūžzaļo rododendru šķirņu ‘Babītes Lavanda’ un ‘Nova Zembla’ *in vitro* pavairotu dzinumu anatomisko mērījumu rezultātu apkopojums. *p* vērtības norāda statistiski būtisku atšķirību starp dažādu dzinumu anatomisko struktūru biezumu (μm) katras šķirnes ietvaros

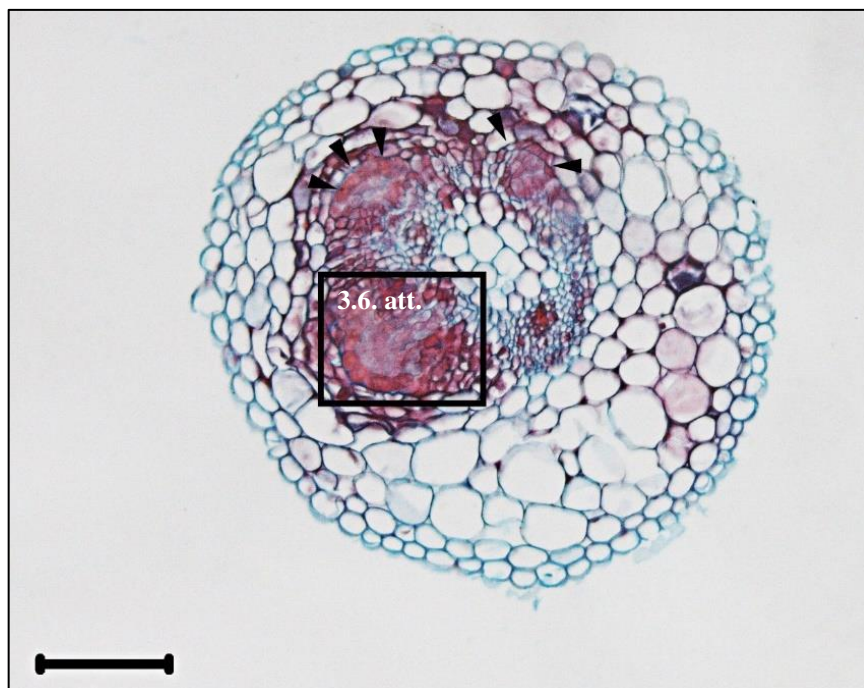
Anatomiskā struktūra	‘Babītes Lavanda’				‘Nova Zembla’			
	Min	Max	Vid. \pm SD	<i>p</i>	Min	Max	Vid. \pm SD	<i>p</i>
Stumbra diametrs	146,3	542,3	310,7 \pm 20,81	<1 \times 10 ⁻⁴	337,7	534,6	444,6 \pm 13,62	<1 \times 10 ⁻⁴
Centrālais cilindrs	80,71	244,1	130,0 \pm 9,00	<1 \times 10 ⁻⁴	114,2	247,0	187,6 \pm 10,43	<1 \times 10 ⁻⁴
Lūksne	10,23	40,37	25,82 \pm 1,79	<1 \times 10 ⁻⁴	4,96	33,34	15,91 \pm 1,80	4,0 \times 10 ⁻³
Koksne	20,98	53,41	34,14 \pm 1,78	2,0 \times 10 ⁻⁴	11,03	36,75	24,59 \pm 2,16	6,1 \times 10 ⁻³

Lai noskaidrotu, vai pēc stumbra diametra ir iespējams spriest par tā anatomisko uzbūvi un vadaudu attīstības stadiju, noteica korelāciju starp dzinuma diametru un centrālā cilindra diametru, koksnes un lūksnes slāņu biezumu. Abu rododendru šķirņu dzinumiem konstatēja stipru korelāciju starp dzinuma diametru un centrālā cilindra diametru (‘Babītes Lavanda’ $r = 0,83$ un $p < 1 \times 10^{-4}$, un ‘Nova Zembla’ $r = 0,83$ un $p < 1 \times 10^{-4}$), kā arī vidēji stipru korelāciju starp dzinuma diametru un koksnes slāņa biezumu (‘Babītes Lavanda’ $r = 0,45$ un $p = 2,6 \times 10^{-2}$ un ‘Nova Zembla’ $r = 0,51$ un $p = 3,1 \times 10^{-2}$). Savukārt lūksnes slāņa biezums nekorelēja ar stumbra diametru nevienai no pētītajām rododendru šķirnēm ($p > 0,05$).

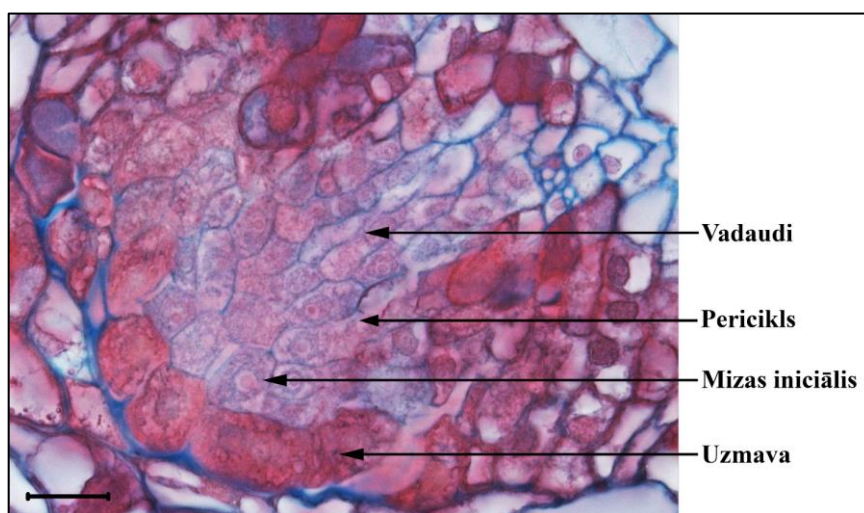
3.3 Adventīvo sakņu veidošanās *ex vitro* anatomiskais raksturojums *in vitro* pavairotiem mūžzaļo rododendru dzinumiem

Ex vitro apsakņošanās laikā *in vitro* pavairotiem mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ dzinumiem pirmās ar adventīvo sakņu attīstību saistītās anatomiskās izmaiņas novēroja 12. eksperimenta dienā. Dzinuma kambiālajā rajonā vienlaikus konstatēja meristemoīdus un adventīvās saknes aizmetni. Gan meristemoīdus, gan aizmetni veidoja lielas šūnas ar palielinātiem, hromofiliem kodoliem un blīvu, graudainu citoplazmu (3.5. attēls).

Meristemoīdu šūnas bija izkārtotas ieapaļās grupās, savukārt saknes aizmetnim bija izveidojies tam raksturīgais kupolveida izliekums (3.5. attēls). Adventīvās saknes aizmetnim bija izšķiramas arī atsevišķas jaunai saknei raksturīgās struktūras – uzmava, mizas iniciāļi, pericikls un vadaudi (3.6. attēls).

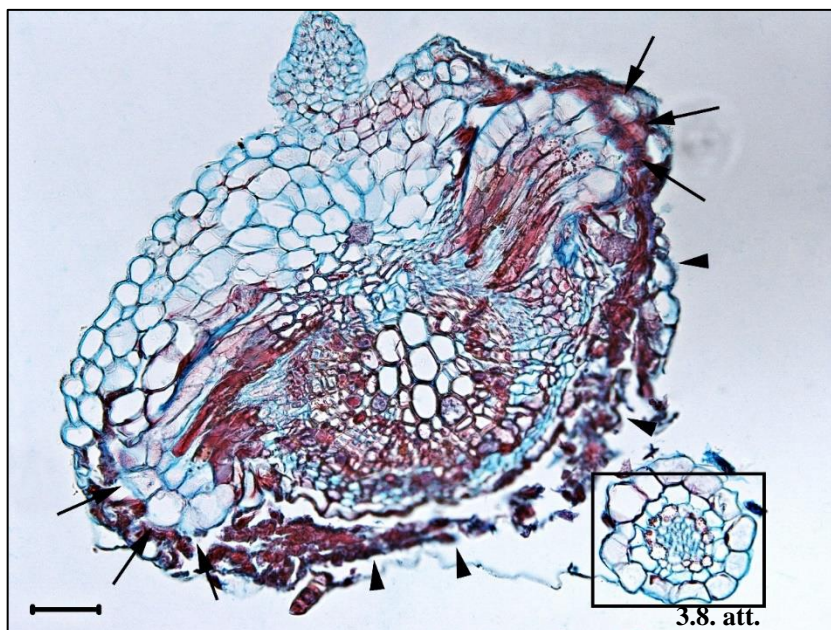


3.5. attēls. Adventīvās saknes aizmetņa (3.6. attēls) un divu meristemoīdu (bultas gali) *ex vitro* attīstība kambiālajā rajonā mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ dzinuma šķērs griezumā 12. eksperimenta dienā. Nogrieznis atbilst 100 μm.



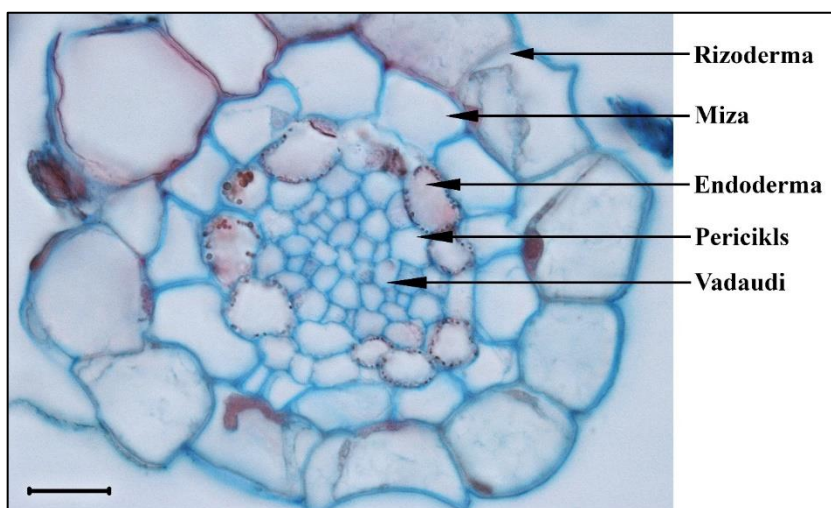
3.6. attēls. Adventīvās saknes aizmetņa anatomiskā uzbūve *ex vitro* mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ dzinuma šķērs griezumā 12. eksperimenta dienā. Nogrieznis atbilst 10 μm.

Katru no šīm anatomiskajām struktūrām adventīvās saknes aizmetnī veidoja viens šūnu slānis, izņemot vadaudus, kas bija izkārtoti grupā adventīvās saknes aizmetņa centrālajā daļā. Visām meristematiskajām šūnām bija blīva, graudaina, hromofila citoplazma un lieli kodoli ar saskatāmiem kodoliņiem. Eksperimenta 16. dienā novēroja adventīvo sakņu aizmetņu augšanu cauri epidermai un adventīvās saknes, kas bija pārplēsušas dzinuma epidermu (3.7. attēls).



3.7. attēls. Adventīvo sakņu aizmetņu *ex vitro* augšana cauri epidermai (bultas) un mizas un epidermas šūnu atmiršana (bultas gali) adventīvo sakņu (3.8. attēls) tuvumā mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ dzinuma šķērs griezumā eksperimenta 16. dienā. Nogrieznis atbilst 50 μm.

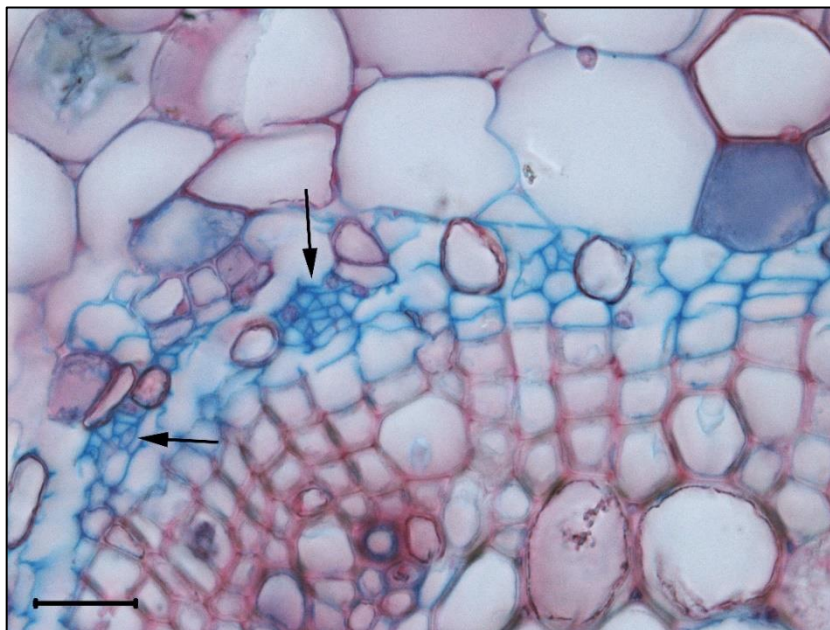
Epidermas un mizas parenhīmas šūnas augošo adventīvo sakņu aizmetņu un adventīvo sakņu tuvumā bija nekrotizējušās. Jaunajām saknēm bija izšķirami vairāki šūnu slāņi – rizoderma, miza, endoderma un pericikls, kas ieskāva saknes centrālajā daļā esošos nediferencētos lūksnes un koksnes vadaudus (3.8. attēls). Periciklu veidoja viens šūnu slānis.



3.8. attēls. Adventīvās saknes *ex vitro* anatomiskā uzbūve mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ dzinuma šķērs griezumā 16. eksperimenta dienā. Nogrieznis atbilst 10 μm.

Savukārt endodermas slāni tajā esošo cietes graudu dēļ anatomiski varēja labi atšķirt no pārējiem jaunajiem audiem. No ārpusē sakni sedza primārie segaudi – rizoderma, bet starp

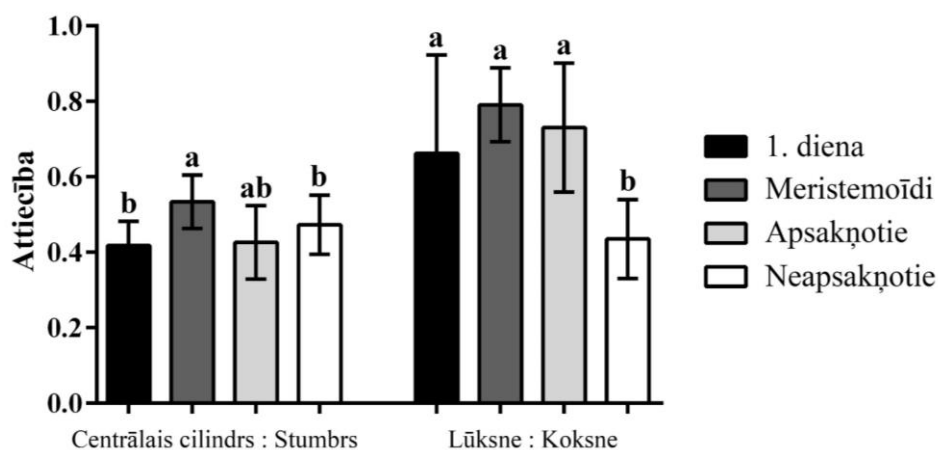
rizodermu un endodermu atradās miza. Paralēli adventīvo sakņu attīstībai, eksperimenta laikā dzinumos novēroja arī diferencējošos šūnu klasteru veidošanos uz ārpusi no kambiālā rajona (3.9. attēls).



3.9. attēls. Diferencējošos šūnu klasteri (bultas) mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ dzinuma šķērsgrīzumā 8. eksperimenta dienā. Nogrieznis atbilst 10 μm.

Šūnas bija mazas, dažām no tām novēroja palielinātus kodolus. Ņemot vērā klasteru veidošanās vietas un šūnu izmērus, visticamāk, tie bija lūksnes vadaudi.

Eksperimenta laikā veiktie anatomiskie mērījumi ļāva aprēķināt centrālā cilindra un dzinuma diametra (C : S) un lūksnes un koksnes (L : K) slāņu biezuma attiecību (3.10. attēls).



3.10. attēls. *In vitro* pavairotu mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ dzinumu anatomisko struktūru attiecības dažādos *ex vitro* rizoģenēzes posmos. Dažādi burti virs stabiņiem norāda statistiski būtiskas atšķirības ($p \leq 0,05$). Rezultāti ir vidējie no 3 atkārtotiem mērījumiem 5–8 augiem \pm SD.

Eksperimenta sākumā dzinumu anatomiskā uzbūve bija heterogēna, par ko liecināja gan C : S attiecība, kas svārstījās robežās 0,33–0,53, gan L : K attiecība, kas svārstījās robežās 0,34–1,29. Dzinumiem, kuriem konstatēja meristemoīdus, novēroja būtiski lielāku C : S attiecību nekā eksperimenta sākumā mērītajiem dzinumiem ($p < 1,3 \times 10^{-3}$). Dzinumiem, kuriem līdz eksperimenta beigām nenovēroja sakņu attīstību, bija būtiski zemāka L : K attiecība ($p < 1 \times 10^{-4}$). Koksnes slāņa biezums gan neapsakņotajiem dzinumiem, gan dzinumiem, kam attīstījās adventīvās saknes, būtiski neatšķīrās. L : K attiecības atšķirības bija saistāmas ar atšķirībām lūksnes slāņa biezumā, kas neapsakņotajos dzinumos bija būtiski mazāks ($p = 2 \times 10^{-3}$).

3.4 Endofītisko sēņu ietekme uz mūžzaļajiem rododendriem *in vitro*

3.4.1 Endofītisko sēņu ietekme uz mūžzaļo rododendru dzinumu vizuālo stāvokli un pigmentu koncentrāciju

Mēnesi pēc mūžzaļo rododendru šķirņu ‘Babītes Lavanda’ un ‘Nova Zembla’ dzinumu *in vitro* apstrādes ar četrām no rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ trīsgadīga auga saknēm izolētām endofītiskajām sēnēm veica augu vizuālu novērtēšanu un pigmentu koncentrācijas spektrofotometrisku noteikšanu dzinumu lapās.

Rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ dzinumi pēc mēnesi ilgas augšanas kultūrā ar endofītiskajām sēnēm bija vizuāli atšķirīgi (3.11. attēls). *Acremonium* sp. 7. izolāts uz barotnes virsmas bija izveidojis micēliju, kas aizņēma 100% no barotnes virsmas, kā arī bija izplatījies uz augiem. Visiem ar šo sēni *in vitro* inokulētajiem dzinumiem novēroja lapu un stumbru brūnēšanu, kas neskāra tikai jaunās lapas tuvāk dzinumu galotnēm. Savukārt ar *Acremonium* sp. 5. izolātu inokulētajiem rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ dzinumiem nebija novērojama šāda ietekme, lai arī šī sēne tāpat bija izveidojusi micēliju uz 100% no barotnes virskārtas un skārusi dzinumu apakšējās daļas un zemākās lapas. Vizuāli šī inokulācijas varianta augi bija līdzīgi kontroles varianta augiem. *Mortierella* sp. un *Calcarisporium arbuscula* inokulācijas variantiem novēroja sēņu micēliju attīstību uz barotnes virskārtas un ap dzinumu apakšējām daļām, taču uz augu lapām sēņu hifas nekonstatēja. Mēnesi pēc sēnes pievienošanas kultūrā *Mortierella* sp. bija pārklājusi 100% no barotnes virsmas, savukārt *Calcarisporium arbuscula* bija pārklājusi ~ 90% no barotnes.



3.11. attēls. Mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ dzinumi vienu mēnesi pēc *in vitro* apstrādes ar endofītiskajām sēnēm, kas izolētas no mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ trīsgadīga auga saknēm. Apstrādes varianti no kreisās puses: kontrole, *Acremonium* sp. 5. izolāts, *Acremonium* sp. 7. izolāts, *Calcarisporium arbuscula*, *Mortierella* sp.

Līdzīgi endofītisko sēņu micēliju attīstība notika arī *in vitro* kultūrās ar rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ dzinumiem (3.12. attēls).

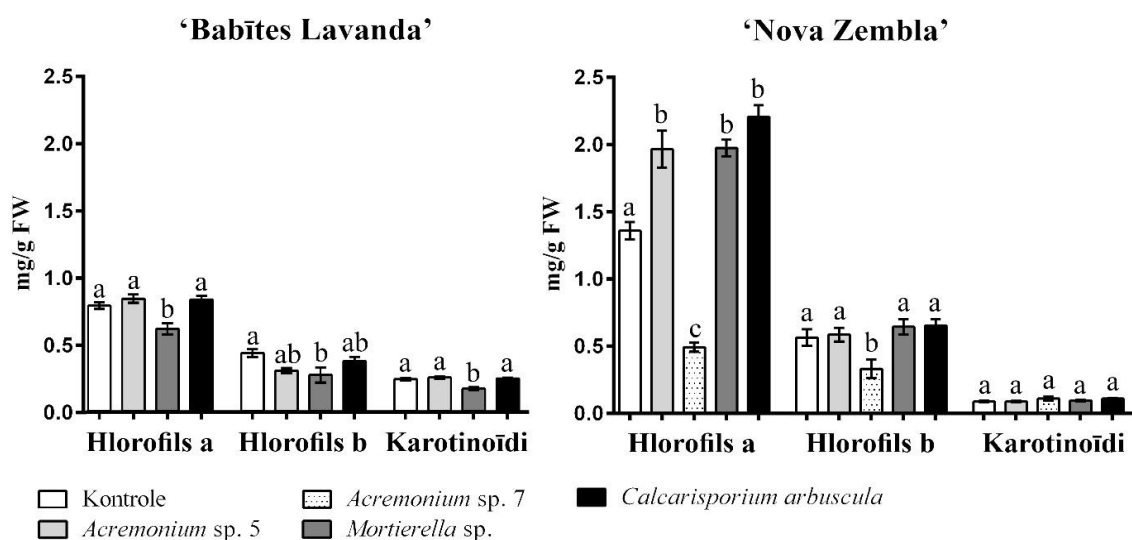


3.12. attēls. Mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ dzinumi vienu mēnesi pēc *in vitro* apstrādes ar endofītiskajām sēnēm, kas izolētas no mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ trīsgadīga auga saknēm. Apstrādes varianti no kreisās puses: kontrole, *Acremonium* sp. 5. izolāts, *Acremonium* sp. 7. izolāts, *Calcarisporium arbuscula*, *Mortierella* sp.

Kontroles un *Acremonium* sp. 5. izolāta inokulācijas variantu augi izskatījās vizuāli līdzīgi, atsevišķām lapām bija novērojama dzeltēšana, savukārt *Acremonium* sp. 7. izolāta inokulācijas varianta rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ dzinumiem novēroja lapu un stumbru brūnēšanu (3.12. attēls). Ar *Calcarisporium arbuscula* un *Mortierella* sp. *in vitro* inokulētajiem dzinumiem nenovēroja lapu dzeltēšanu.

Pēc augu vizuālās novērtēšanas veica pigmentu koncentrācijas spektrofotometrisku noteikšanu abu šķirņu visu *in vitro* inokulācijas variantu dzinumu lapās, izņemot rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ *Acremonium* sp. 7. izolāta inokulācijas varianta dzinumus, kuru lapām konstatēja brūnēšanu. Rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ pigmentu koncentrācijas

atbilda normālajam sadalījumam, tāpēc inokulācijas variantu ietekmes salīdzināšanai izmantoja vienvirziena dispersijas analīzi. Starp inokulācijas variantiem konstatēja statistiski būtisku atšķirību hlorofila *a* ($p < 1 \cdot 10^{-4}$), hlorofila *b* ($p = 1,7 \times 10^{-2}$) un karotinoīdu ($p < 1 \times 10^{-4}$) koncentrācijā. Ar *Mortierella* sp. inokulētajiem dzinumiem, salīdzinot ar kontroli un ar *Acremonium* sp. 5. izolātu un *Calcarisporium arbuscula* inokulētajiem dzinumiem, lapās bija būtiski zemāka hlorofila *a* ($p = 3,3 \times 10^{-3}$, $p = 1 \times 10^{-4}$ un $p = 2 \times 10^{-4}$) un karotinoīdu koncentrācija ($p < 1 \times 10^{-4}$), kā arī, salīdzinot ar kontroli, zemāka hlorofila *b* koncentrācija ($p = 1,8 \times 10^{-2}$) (3.13. attēls). Savukārt ar *Acremonium* sp. 5. izolātu un *Calcarisporium arbuscula* inokulēto dzinumu un kontroles varianta dzinumu lapās pigmentu koncentrācijām savstarpēji būtiskas atšķirības nekonstatēja ($p > 0,05$).



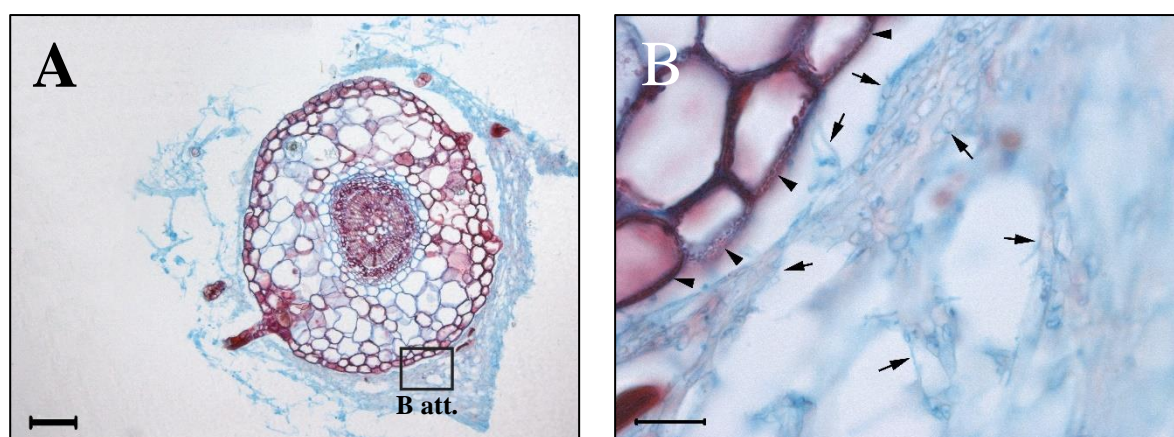
3.13. attēls. Endofītisko sēņu inokulācijas ietekme uz pigmentu koncentrāciju *in vitro* pavairotu mūžzaļo rododendru šķirņu ‘Babītes Lavanda’ un ‘Nova Zembla’ dzinumu lapās. Dažādi burti virs stabiņiem norāda statistiski būtiskas atšķirības starp katra pigmenta koncentrāciju dažādiem apstrādes variantiem ($p \leq 0,05$). Rezultāti ir vidējie no 3 bioloģiskajiem un 3 ķīmiskajiem atkārtojumiem \pm SE.

Rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ pigmentu koncentrāciju mērījumi atbilda normālajam sadalījumam, tāpēc apstrādes variantu ietekmes salīdzināšanai izmantoja vienvirziena dispersijas analīzi. Starp inokulācijas variantiem konstatēja statistiski būtisku atšķirību hlorofila *a* ($p < 1 \times 10^{-4}$) un hlorofila *b* ($p = 1,8 \times 10^{-3}$) koncentrācijā. Ar *Acremonium* sp. 7. izolātu inokulēto rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ dzinumu lapās, salīdzinot ar kontroli, bija būtiski zemāka hlorofila *a* ($p < 1 \times 10^{-4}$) un hlorofila *b* ($p = 4,8 \times 10^{-2}$) koncentrācija. Savukārt, ar *Acremonium* sp 5. izolātu, *Mortierella* un *Calcarisporium arbuscula* inokulēto dzinumu lapās, salīdzinot ar kontroles variantu, bija būtiski augstāka hlorofila *a* koncentrācija

($p < 1 \times 10^{-4}$). Endofītisko sēņu klātbūtne būtiski neietekmēja karotinoīdu daudzumu *in vitro* pavairotu rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ dzinumu lapās ($p > 0,05$).

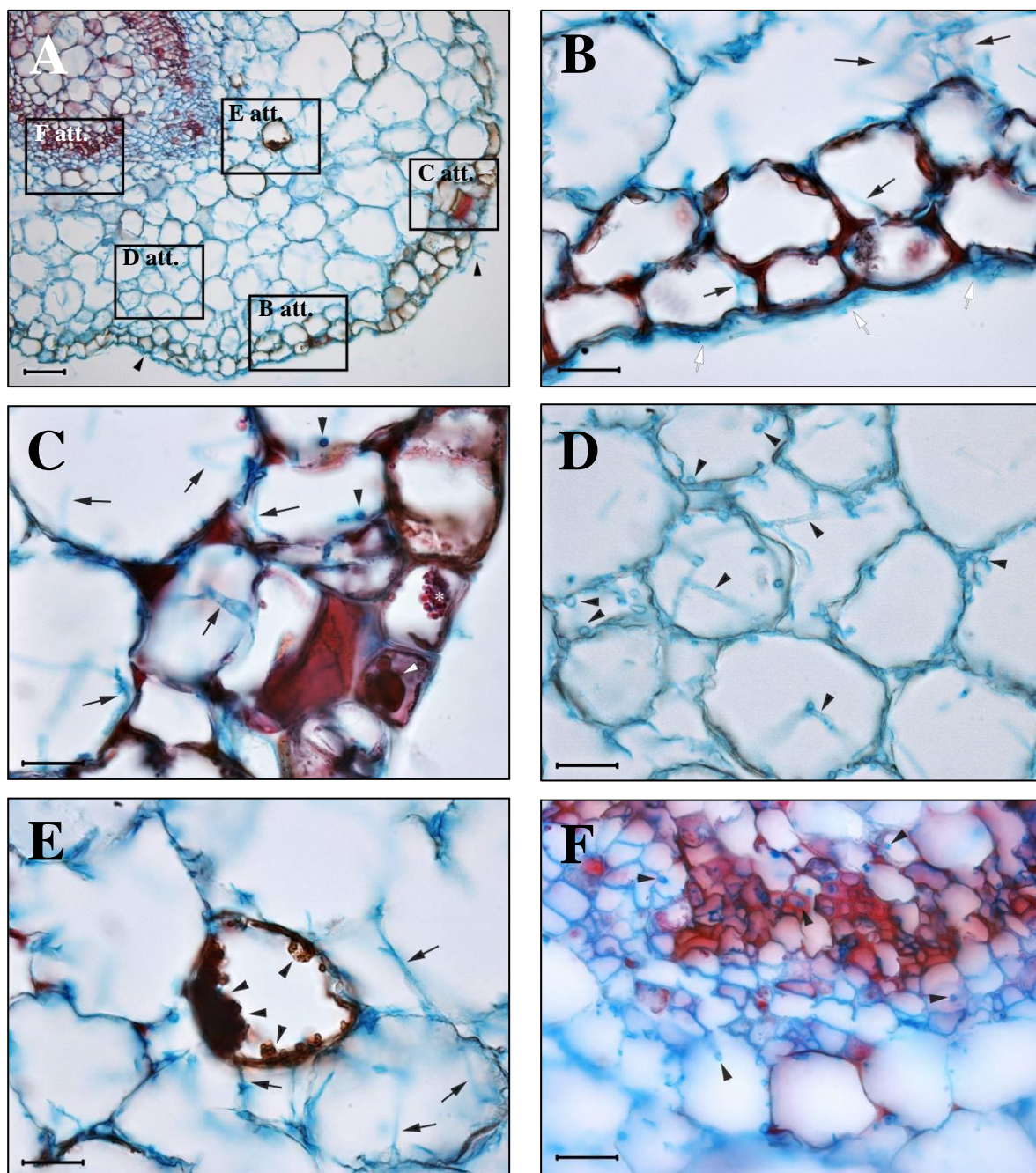
3.4.2 Anatomiskās izmaiņas mūžzaļo rododendru dzinumos endofītisko sēņu ietekmē *in vitro* apstākļos

Acremonium sp. 5. izolāts veidoja blīvu, nevienmērīgu, 20–115 μm biezu micēliju ap mūžzaļo rododendru šķirņu ‘Babītes Lavanda’ un ‘Nova Zembla’ *in vitro* pavairotu un inokulētu dzinumu bazālajām daļām (3.14. attēls). Micēliju veidoja 1–2 μm resnas hifas.



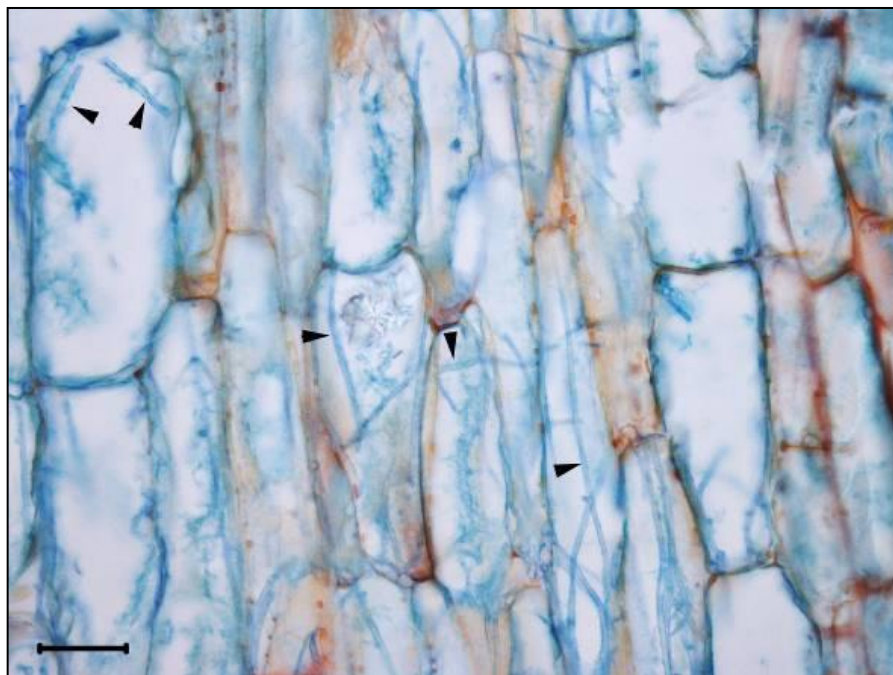
3.14. attēls. Ar *Acremonium* sp. 5. izolātu inokulēta mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ dzinuma šķērsriezums *in vitro* apstākļos. A – sēnes micēlijs ap dzinumu. B – sēnes hifas (bultas) uz dzinuma epidermas (bultu gali). Nogrieznis atbilst: A – 50 μm , B – 10 μm .

Rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ dzinumiem sēnes hifas konstatēja ne vien uz epidermas, bet arī epidermas šūnās, kā arī mizas, vadaudu un serdes parenhīmas šūnās un starpšūnu telpās (3.15. attēls A–F). Epidermā un tai piegulošajā mizas parenhīmā novēroja lokālus bojājumus. Šūnām bija raksturīgas izmaiņas šūnas formā, šūnapvalka deformēšanās un izmaiņas šūnapvalka krāsojumā (3.15. B un C attēls). Atsevišķās epidermas šūnās pie šūnapvalka novēroja kondensēto tannīnu uzkrāšanos blīvu, brūnu un graudainu struktūru formā, savukārt citās epidermas šūnās novēroja tumšu fenolu dabas ieslēgumu veidošanos (3.15. C attēls).



3.15. attēls. Ar *Acremonium* sp. 5. izolātu inokulēta mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ dzinuma šķērsriezums *in vitro* apstākļos. A – micēlijs uz dzinuma (bultu gali). B – sēnes hifas uz dzinumu epidermas (baltas bultas), epidermas šūnās un mizas parenhīmas šūnās (melnas bultas). C – lokāls epidermas un mizas parenhīmas audu bojājums ar sēnes hifām (bultas), kondensētajiem tannīniem (*) un fenoliem (balts bultas gals) epidermas šūnās. D – hifas (bultu gali) mizas parenhīmas šūnās. E – atmirusi parenhīmas šūna ar kondensētajiem tannīniem gar šūnapvalku (bultas gali) un hifas (bultas) apkārtējās mizas parenhīmas šūnās. F – centrālais cilindrs ar deformētām koksnes vadaudu šūnām un hifām trahejās un apkārtesošajos audos (bultu gali). Nogrieznis atbilst: A – 50 μm, B–F – 10 μm.

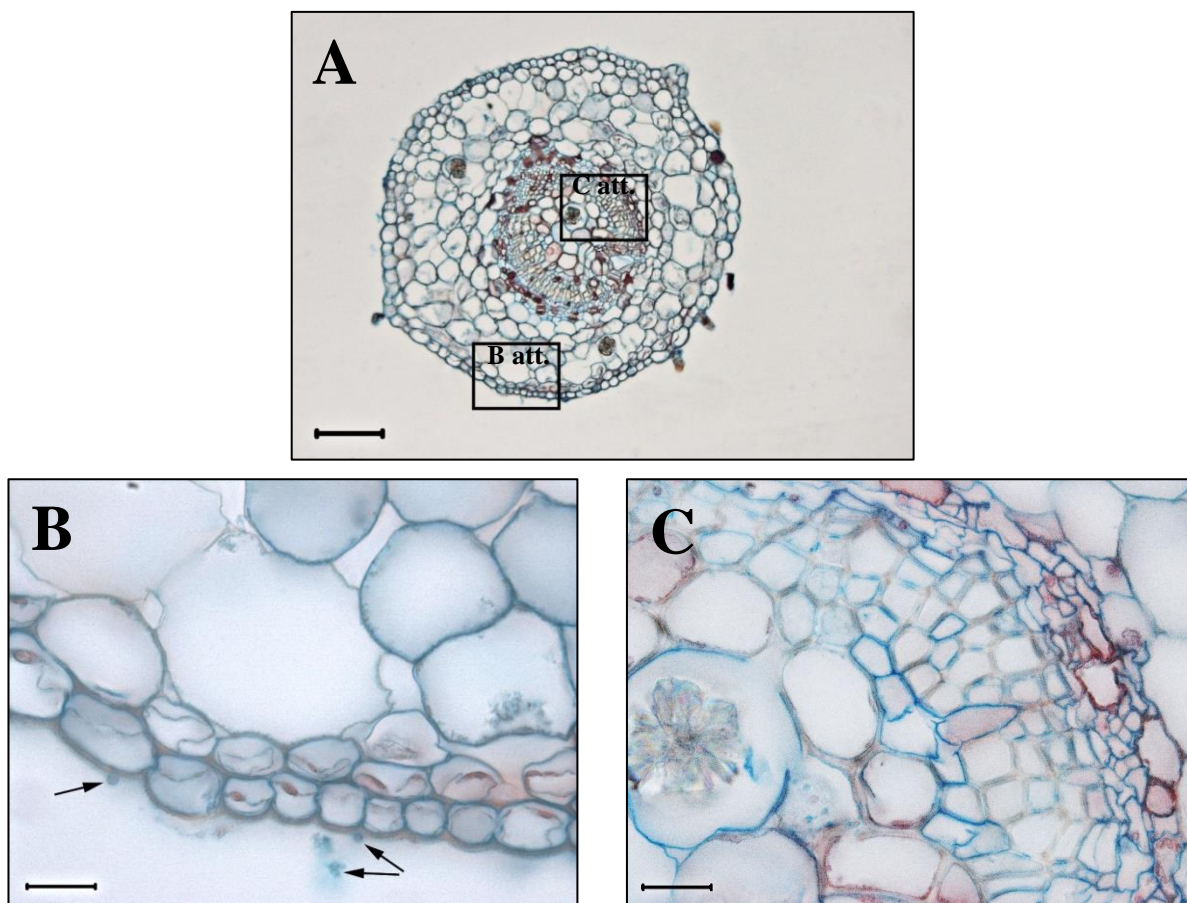
Arī atsevišķām mizas parenhīmas šūnām varēja novērot kondensēto tannīnu uzkrāšanos un līdzīgas izmaiņas šūnapvalkos, kā to novēroja epidermā. Savukārt centrālajā cilindrā konstatēja sēnes hifas koksnes vadaudos un to lokālus bojājumus. Gargriezumos novēroja *Acremonium* sp. 5. izolāta hifu augšanu mizas parenhīmas šūnās un cauri šūnapvalkiem no vienas šūnas uz nākošo (3.16. attēls). Šo parenhimatisko šūnu citoplazma bija kļuvusi blīva un graudaina.



3.16. attēls. Mizas parenhīmas šūnas ar *Acremonium* sp. 5. izolāta hifām (bultu gali) un graudainu citoplazmu *in vitro* pavairota mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ dzinuma gargriezumā. Nogrieznis atbilst 30 μm.

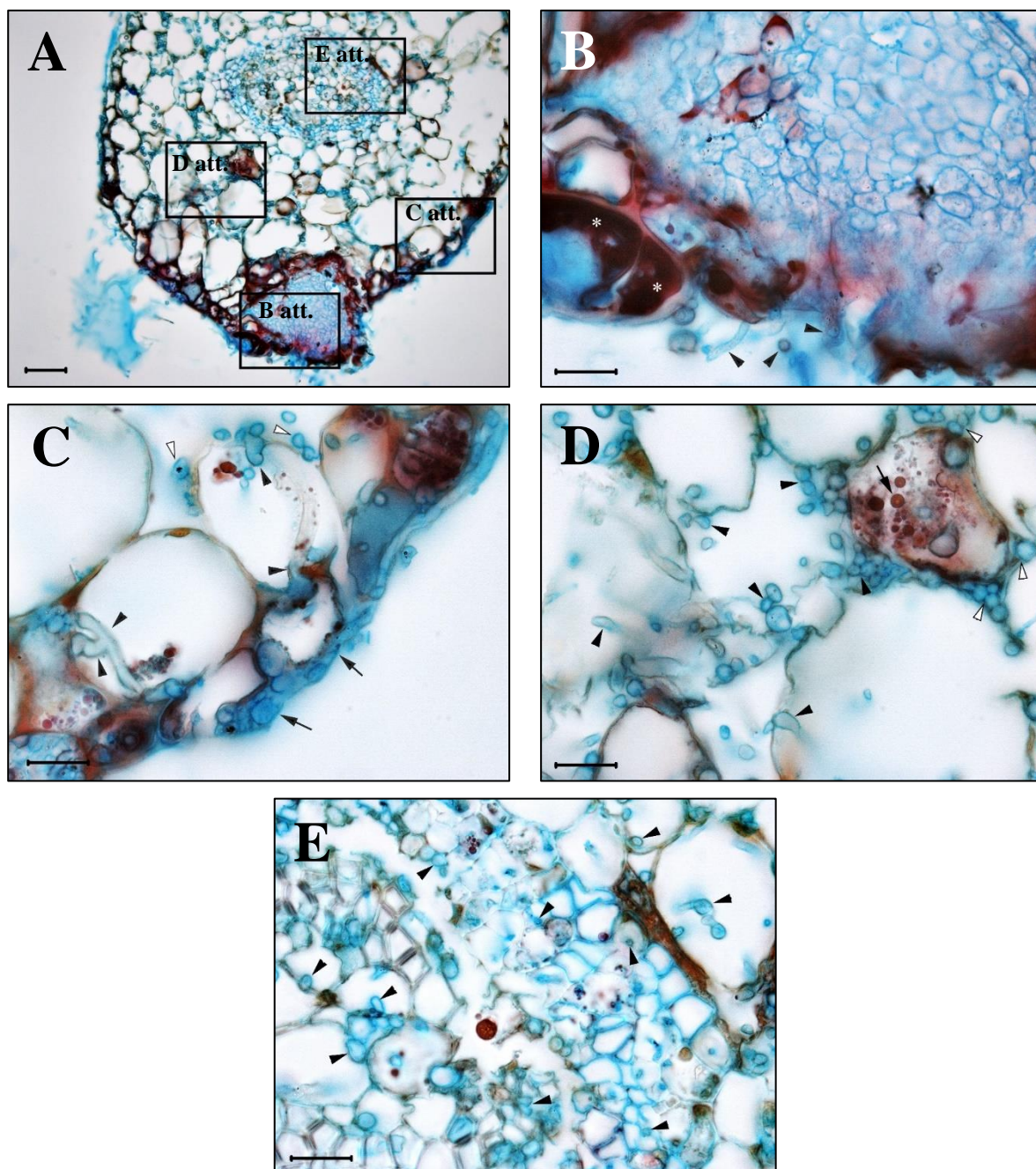
Atkarībā no griezuma veikšanas vietas rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ *in vitro* pavairoto un inokulēto dzinumu kolonizācija ar *Acremonium* sp. 5. izolātu svārstījās no 46% līdz 82%. Savukārt dzinumu bojājumu apjoms svārstījās no 0% līdz 30% no šķērsriezuma. Griezumiem, kas veikti tālāk no dzinuma bazālās daļas, bojājumus nenovēroja vai arī tiem bija mazāks apjoms nekā dzinumu bazālajā daļā konstatētajiem bojājumiem.

Savukārt rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ *in vitro* pavairotajiem un inokulētajiem dzinumiem nelielus *Acremonium* sp. 5. izolāta micēlija fragmentus novēroja uz epidermas, taču dzinumu audos – ne mizā, ne centrālajā cilindrā, sēnes hifas nekonstatēja (3.17. A un B attēls). Citus bojājumus dzinumu audos nenovēroja (3.17. C attēls).



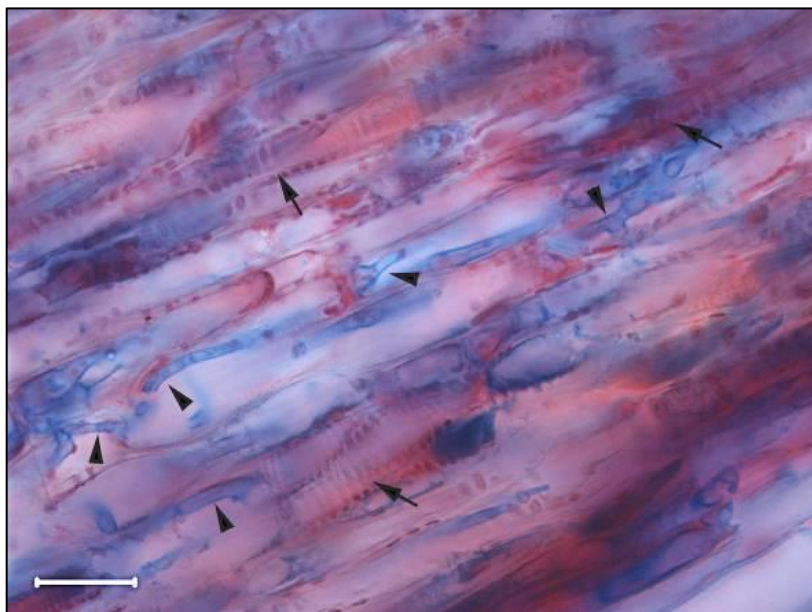
3.17. attēls. A – Ar *Acremonium* sp. 5. izolātu *in vitro* inokulēta mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ dzinuma šķērsriezums *in vitro* apstākļos. B – hifas (bultas) uz dzinumu epidermas. C – centrālā cilindra audi. Nogrieznis atbilst: A – 100 μm, B, C – 10 μm.

Pēc *in vitro* inokulācijas ar *Acremonium* sp. 7. izolātu abu eksperimentos izmantoto rododendru šķirņu dzinumiem novēroja līdzīgas anatomiskās izmaiņas. Līdzīgi kā *Acremonium* sp. 5. izolāts, arī šis endofīts attīstīja micēliju uz dzinumu epidermas un 3–4 μm resnas sēņu hifas konstatēja arī dzinumu audos. Taču, salīdzinot ar *Acremonium* sp. 5. izolātu, šis izolāts bija agresīvāks un dzinumu audos izsauca plašus audu bojājumus, kas liecināja par infekcijas procesa norisi. Visos dzinumu audos novēroja sēņu hifas, un līdz ar to infekciju varēja uzskatīt par 100%. Rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ inokulētajiem dzinumiem šūnas bija deformējušās un to šūnapvalki bija degradējušies (3.18. attēls A–E).



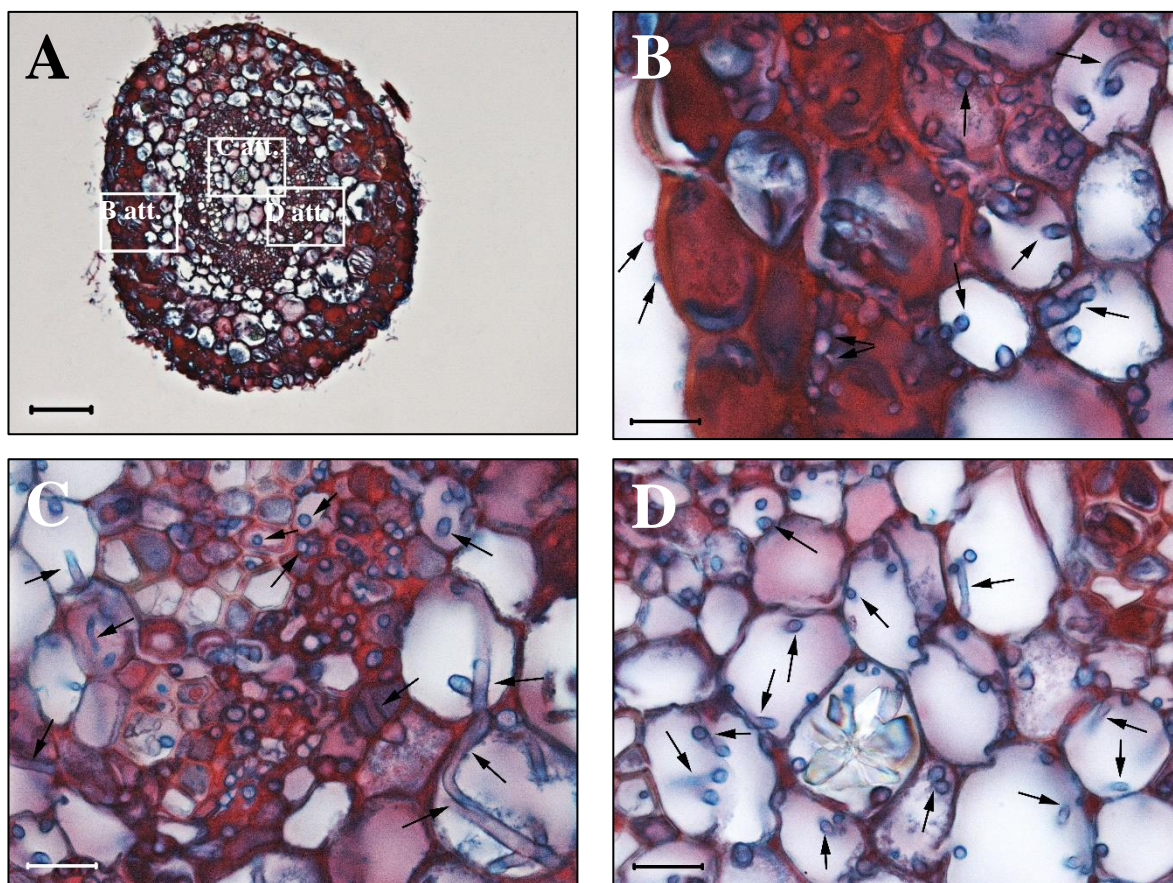
3.18. attēls. A – Ar *Acremonium* sp. 7. izolātu inokulēta mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ dzinuma šķērsriezums *in vitro* apstākļos. B – sēnes micēlijs ar atsevišķām hifām (bultu gali) dzinuma audos un fenolu (*) uzkrāšanās epidermas šūnās. C – hifas uz daļēji degradētām epidermas šūnām (bultas), mizas parenhīmas šūnās (melni bultu gali) un starpšūnu telpās (balti bultu gali). D – hifas mizas parenhīmas šūnās (melni bultu gali) un starpšūnu telpās (balti bultu gali), fenoli (bulta). E – hifas vadaudos un serdē (bultu gali). Nogrieznis atbilst: A – 50 μ m, B–E – 10 μ m.

Sēnes hifas veidoja blīvu micēlija tinumu uz epidermas (3.18. A un B attēls) un bija vērojama sēnes izplatība dziļāk mizā, degradējot šūnapvalkus un pakāpeniski noārdot šūnas (3.18. B–D attēls). Bojājuma vietām līdzās esošajās šūnās novēroja fenolu uzkrāšanos (3.18. B un D attēls). Radot plašus bojājumus viscaur dzinuma audos, sēne izplatījās līdz pat centrālajam cilindram, kur izsauca arī vadaudu degradāciju. Gargriezumos, līdzīgi kā ar *Acremonium* sp. 5. izolātu inokulētajiem dzinumiem, novēroja hifu izplatību dzinuma parenhimatiskajos audos koksnes vadaudu tuvumā (3.19. attēls).



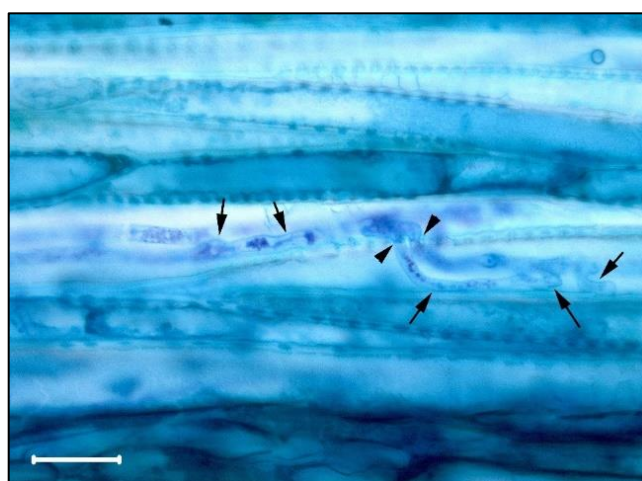
3.19. attēls. Koksnes vadaudi (bultas) un parenhīmas šūnas ar *Acremonium* sp. 7. izolāta hifām (bultu gali) *in vitro* pavairota mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ dzinuma gargriezumā. Nogrieznis atbilst 10 μ m.

Acremonium sp. 7. izolātam bija līdzīga ietekme arī uz rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ dzinumiem. Sēnes hifas novēroja gan uz dzinuma epidermas, gan iekšējos audos (3.20. attēls). Epidermas un tai piegulošās mizas parenhīmas šūnas 1–3 šūnu slāņu dziļumā (3.20. B attēls), kā arī vadaudu parenhīmas šūnas (3.20. C attēls) bija pilnīgi vai daļēji degradējušās, šūnapvalki bija zaudējuši savu struktūru, un šūnu robežas, kā arī šūnu saturs vairs nebija nosakāms. Inficētās šūnas bija ieguvušas sarkanbrūnu krāsojumu, un bojājumi aizņēma lielāko daļu dzinumu audu.



3.20. attēls. A – Ar *Acremonium* sp. 7. izolātu *in vitro* inokulētu mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ dzinumu šķērs griezumus *in vitro* apstākļos. B – sēnes hifas uz dzinumu epidermas, epidermas šūnās un mizas parenhīmas šūnās (bultas). C – sēnes hifas dzinuma vadaudos (bultas). D – sēnes hifas dzinuma serdē (bultas). Nogrieznis atbilst: A – 100 μm , B–D – 10 μm .

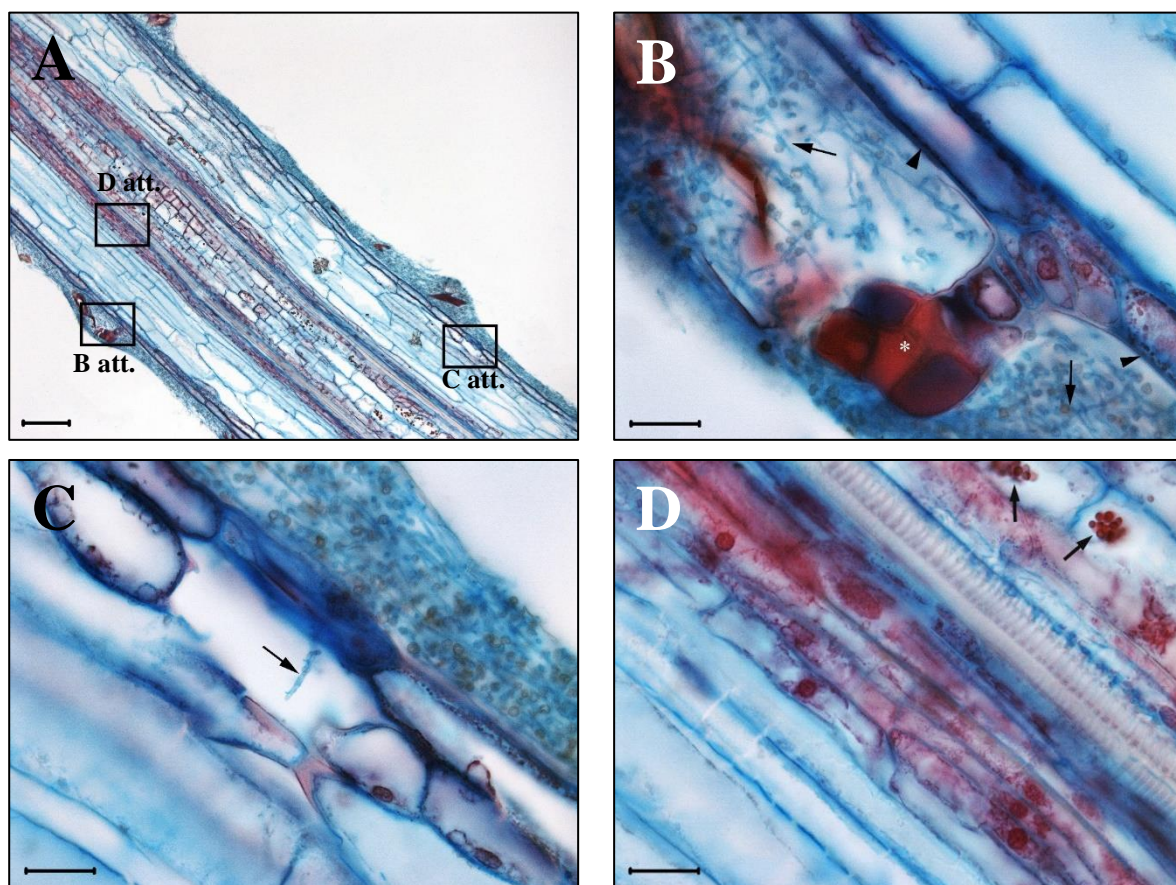
Rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ dzinumu gargriezumos novēroja *Acremonium* sp. 7. izolāta hifu augšanu vadaudos un caur vadaudu porām (3.21. attēls).



3.21. attēls. Koksnes vadaudi ar *Acremonium* sp. 7. izolāta hifām (bultas) *in vitro* pavairota mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ dzinuma gargriezumā un hifu augšana caur koksnes vadaudu porām (bultu gali). Nogrieznis atbilst 10 μm .

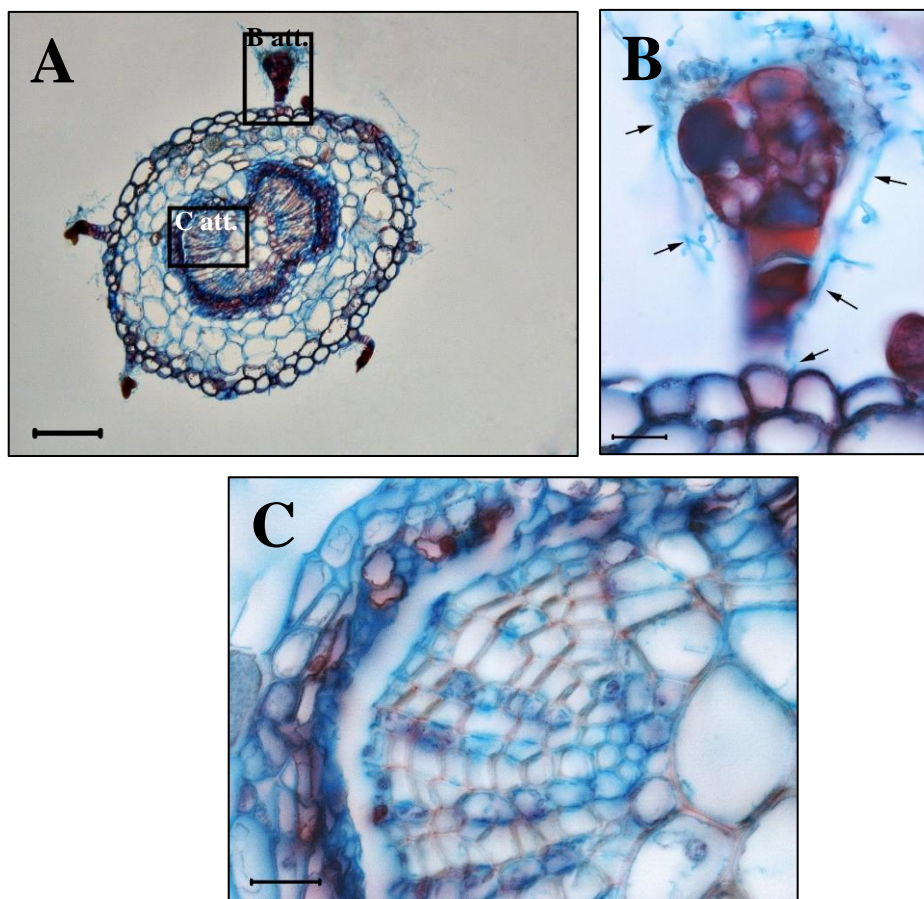
Eksperimenta laikā *Acremonium* sp. 7. izolāts inficēja 100% rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ dzinumu audu, izsaucot to 100% bojāeju.

Pēc abu rododendru šķirņu *in vitro* pavairoto dzinumu inokulācijas ar *Calcarisporium arbuscula* uz dzinumu bazālajām daļām konstatēja 20–100 μm bieža, no smalkām hifām veidota sēnes micēlija slāņa attīstību (3.22. attēls). Novēroja micēlija attīstību ap rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ dzinumu trihomiem (3.22. B attēls), kā arī lokālu sēnes hifu klātbūtni mizas parenhīmas šūnās (3.22. C attēls). Dziļākajos dzinumu audos sēnes hifas nekonstatēja, bet serdes parenhīmas šūnās novēroja kondensētos tannīnus (3.22. D attēls).



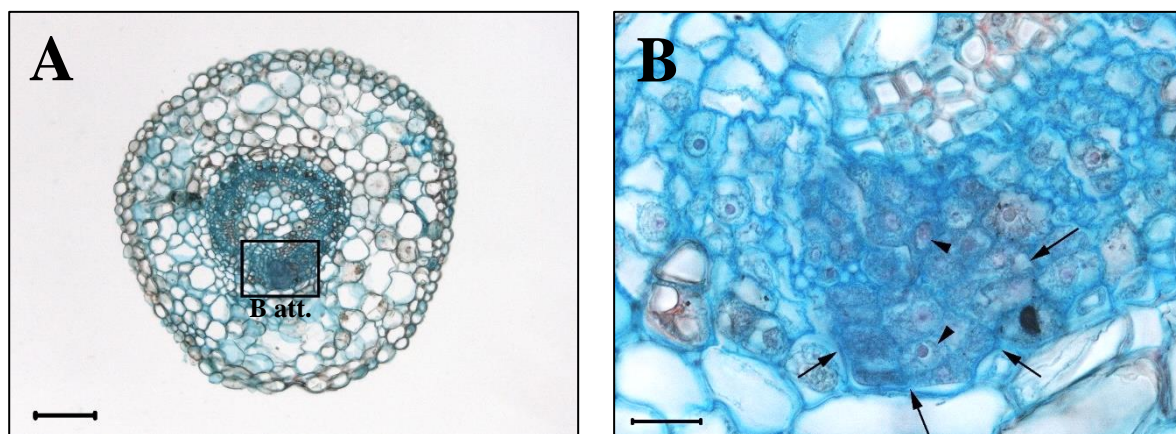
3.22. attēls. A – Ar *Calcarisporium arbuscula* *in vitro* inokulēta mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ dzinuma bazālās daļas gargriezums. B – *Calcarisporium arbuscula* micēlijs (bultas) uz dzinuma epidermas (bultas gali) un ap trihomu (*). C – atsevišķa hifa (bulta) mizas parenhīmas šūnā. D – sēnes neskarti centrālā cilindra audi ar kondensētajiem tannīniem (bultas). Nogrieznis atbilst: A – 100 μm, B–D – 10 μm.

Veicot rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ *in vitro* inokulēto dzinumu šķērsgrīzumu izpēti, konstatēja, ka uz augstākām dzinumu bazālajām daļām sēnes micēlijs nebija izveidojis blīvu slāni, taču novēroja atsevišķu *Calcarisporium arbuscula* hifu klātbūtni uz dzinumu trihomiem un epidermas (3.23. attēls). Centrālā cilindra audos sēnes hifas nekonstatēja (3.23. C attēls).



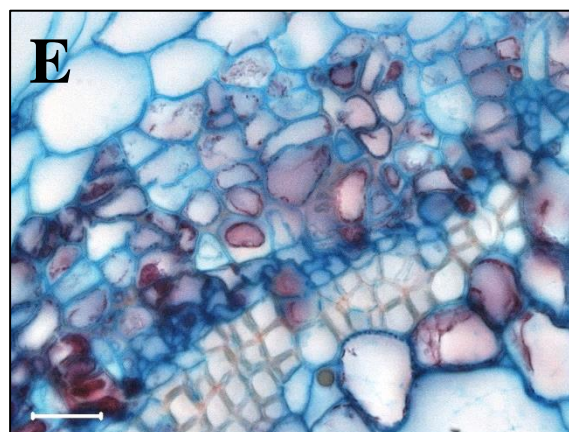
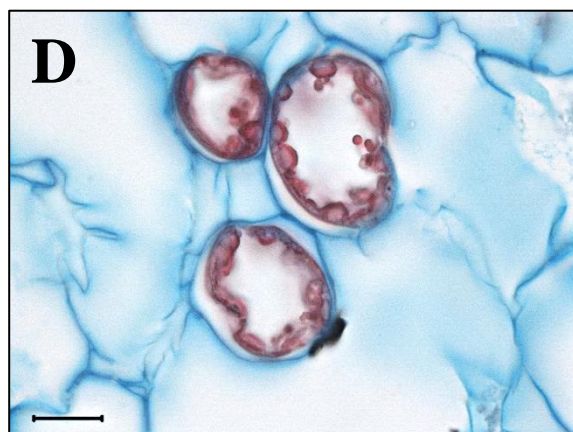
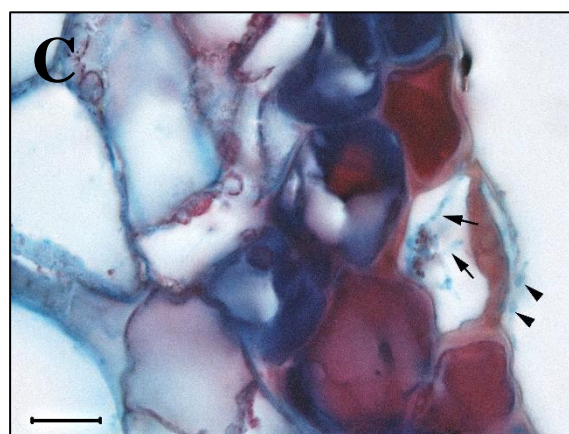
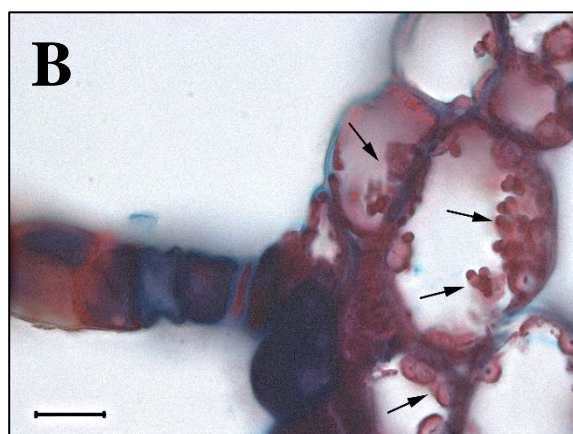
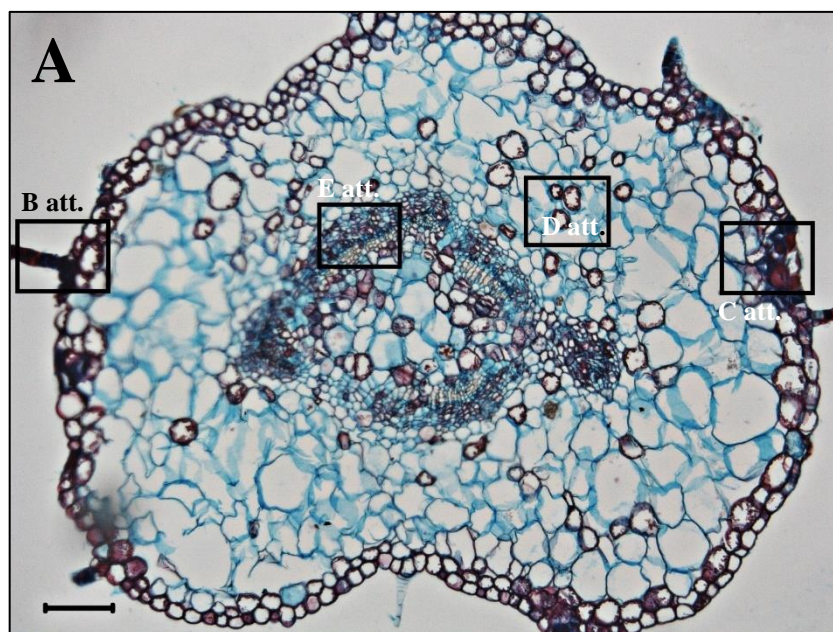
3.23. attēls. A – Ar *Calcarisporium arbuscula* *in vitro* inokulēta mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ dzinuma šķērsriezums. B – sēnes hifas (bultas) ap trihomu. C – centrālā cilindra audi. Nogrieznis atbilst: A – 100 μm, B, C – 10 μm.

Līdzīgi kā ar *Calcarisporium arbuscula* inokulētajiem rododendru šķirnes ‘Babīte Lavanda’ dzinumiem, arī ‘Nova Zembla’ dzinumiem griezumos, kas veikti tālāk no bazālās daļas, novēroja tikai atsevišķas sēnes hifas, nevis sēnes micēlija attīstību biežā slānī, kā tas bija raksturīgs dzinumu bazālajām daļām vai ar *Acremonium* inokulētajiem dzinumiem (3.24. attēls). Inokulācijas perioda beigās rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ audos konstatēja attīstījušos meristemoīdus, ko savukārt nenovēroja rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ dzinumos (3.23. attēls). Meristemoīdi attīstījās lūksnes vadaudu tuvumā, un tos veidoja apaļos klasteros izkārtotās šūnas ar blīvu, hromofilu citoplazmu un palielinātiem kodoliem ar saskatāmiem kodoliņiem (3.24. B attēls). Mēnesi pēc *in vitro* eksperimenta sākuma meristemoīdus konstatēja 60% ar *Calcarisporium arbuscula* inokulēto rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ dzinumu.



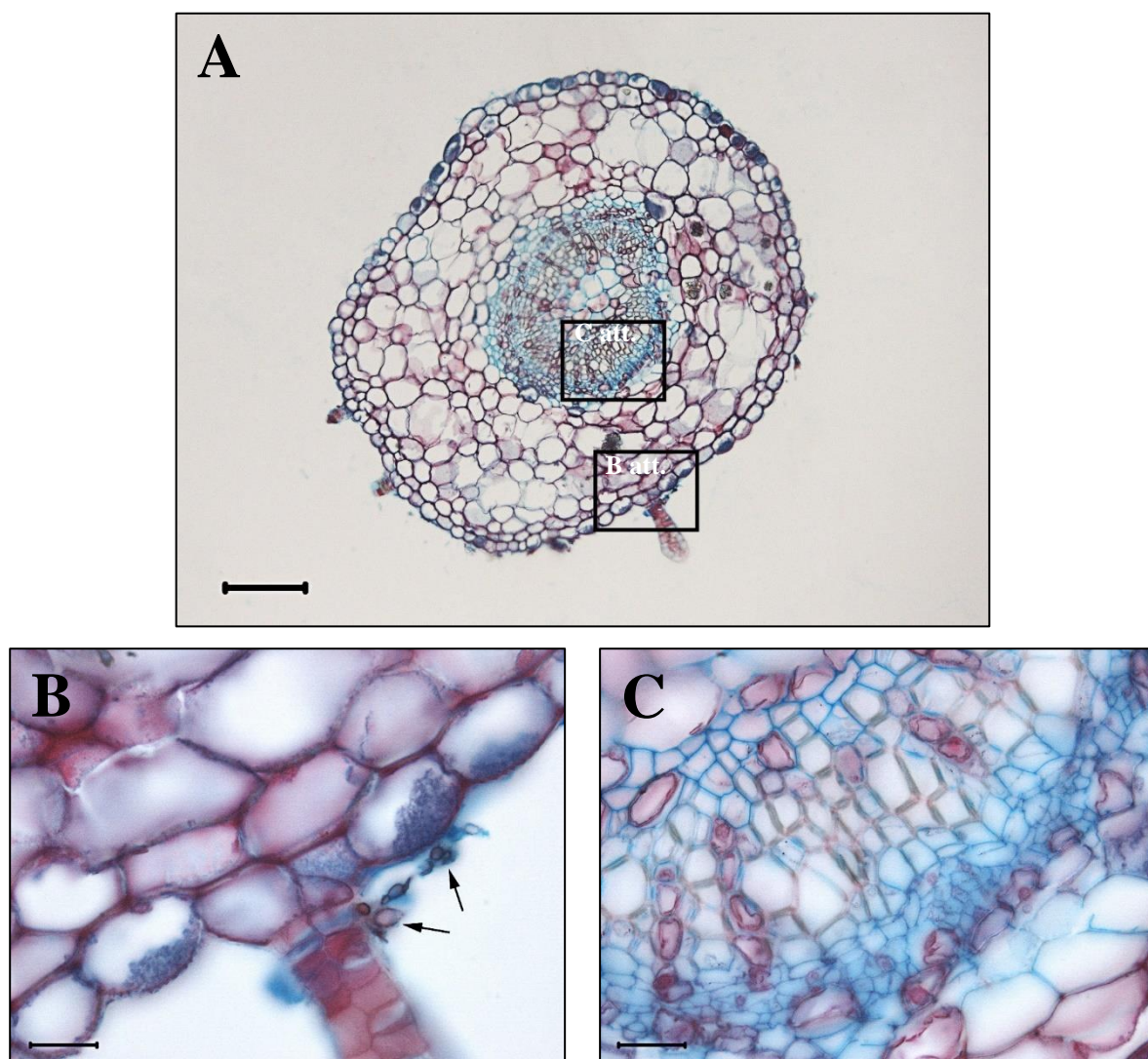
3.24. attēls. A – Ar *Calcarisporium arbuscula* *in vitro* inokulēta mūzzaļo rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ dzinuma šķērsriezums. B – meristemoīds (bultas) ar palielinātiem kodoliem ar kodoliņiem (bultu gali). Nogrieznis atbilst: A – 100 μm, B – 10 μm.

Līdzīgi kā pārējie eksperimentos izmantotie endofīti, arī *Mortierella* sp. uz rododendru *in vitro* inokulēto dzinumu bazālajām daļām veidoja micēliju, taču tas nebija tik izteikts kā, piemēram, ar *Acremonium* sp. 5. izolātu vai *Calcarisporium arbuscula* inokulētiem dzinumiem. Līdzīgi kā ar abiem *Acremonium* sp. inokulētajiem dzinumiem, arī pēc *in vitro* inokulācijas ar *Mortierella* sp. rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ dzinumiem novēroja lokālus bojājumus epidermā un tai līdzās esošajās mizas parenhīmas šūnās, kā arī atsevišķu mizas parenhīmas šūnu šūnapvalku krāsas maiņu un kondensēto tannīnu uzkrāšanos šajās šūnās (3.25. attēls). Lielākā apmērā bojājumi skāra epidermas un epidermai līdzās esošās mizas parenhīmas šūnas (3.25. B attēls). Novēroja arī lokālus epidermas audu un tai piegulošo mizas parenhīmas audu bojājumus (3.25. C attēls). Šajos rajonos šūnu saturs bija iekrāsojies tumšs, un šūnu struktūras nebija atšķiramas, līdzās esošajās šūnās varēja novērot arī sēnes hifu klātbūtni. Savukārt mizā konstatēja lokālus bojājumus ar šūnām, kuru plazmatiskā membrāna bija atdalījusies no šūnapvalka un kurās novēroja kondensēto tannīnu uzkrāšanos (3.25. D attēls). Vadaudos sēnes struktūras vai audu bojājumus nenovēroja (3.25. E attēls).



3.25. attēls. A – ar *Mortierella* sp. *in vitro* inokulēta mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ dzinuma šķērs griezumus. B – epidermas un mizas parenhīmas šūnas ar kondensētajiem tannīniem (bultas). C – lokāls epidermas un tai piegulošo mizas parenhīmas audu bojājums un *Mortierella* sp. hifas uz dzinuma epidermas (bultu gali) un epidermas šūnā (bultas). D – lokāla nekroze mizas parenhīmā un kondensēto tannīnu uzkrāšanās. E – centrālā cilindra audi. Nogrieznis atbilst: A – 100 μm, B–E – 10 μm.

Lai arī uz rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ dzinumiem novēroja sēnes micēlija fragmentus, sēnes hifu klātbūtni dzinumu audos nekonstatēja (3.26. attēls). Epidermas šūnās novēroja blīvu, graudainu un hromofilu citoplazmu, taču nenovēroja ne sēņu struktūru klātbūtni dzinumu audos, ne arī lokālus bojājumus.



3.26. attēls. A – ar *Mortierella* sp. *in vitro* inokulēta mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ dzinuma šķērs griezumā. B – sēnes micēlijs (bultas) uz dzinuma epidermas šūnām. C – centālā cilindra audi. Nogrieznis atbilst: A – 100 μ m, B, C – 10 μ m.

Kopumā vērtējot rododendru sakņu endofītisko sēņu ietekmi uz *in vitro* pavairotiem mūžzaļo rododendru dzinumiem, konstatēja, ka *Acremonium* sp. 7. izolāts izraisa augu bojāeju sterilos apstākļos un uzskatāma par latentu patogēnu. Līdzīgu ietekmi uz rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ dzinumiem atstāja arī *Acremonium* sp. 5. izolāts, savukārt uz rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ dzinumiem tai bija mazāka ietekme. *Calcarisporium arbuscula* ietekmē rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ dzinumos attīstījās meristemoīdi, bet rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ dzinumiem anatomiskas izmaiņas nenovēroja. *Mortierella* sp. izsauca lokālu

šūnu bojāeju rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ dzinumos, bet rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ dzinumos to nenovēroja.

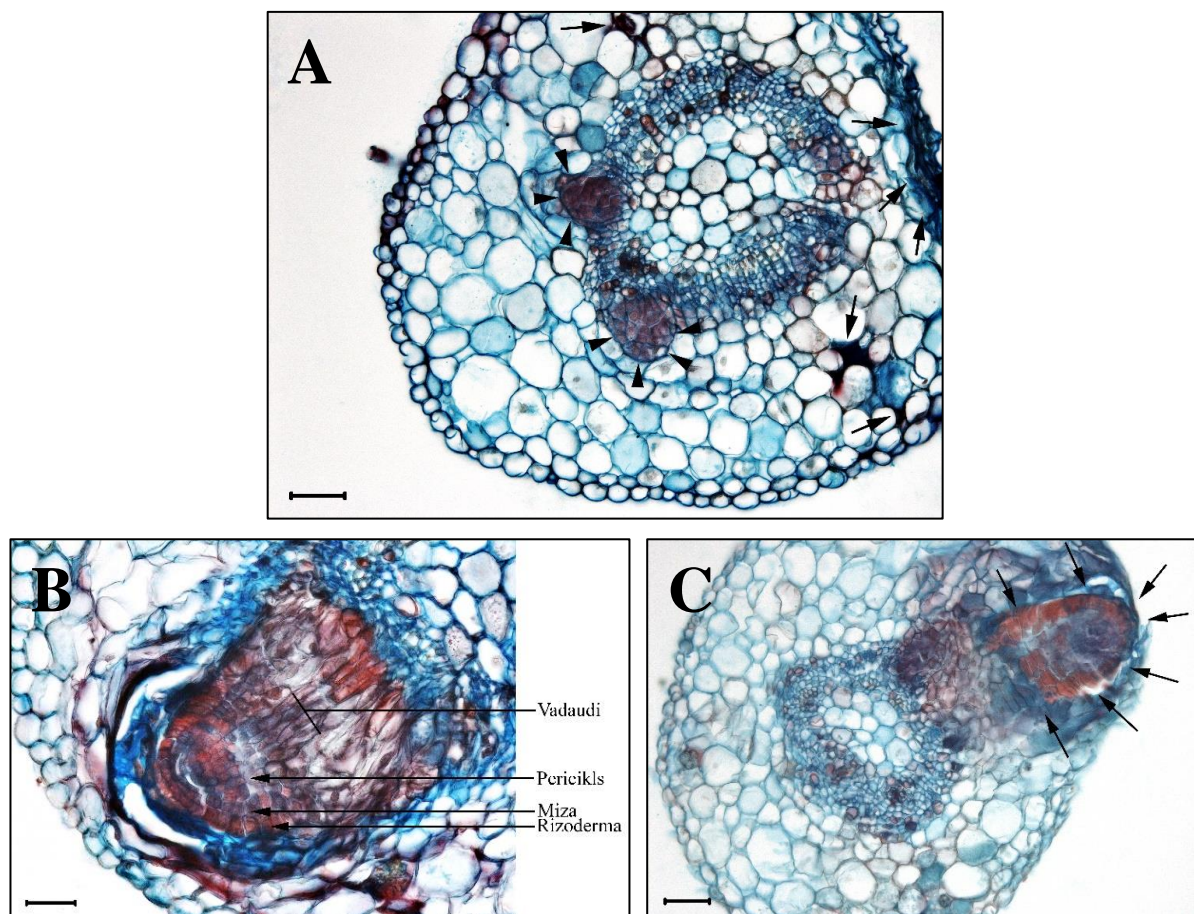
3.5 *In vitro* pavairotu mūžzaļo rododendru dzinumu *ex vitro* apsākņošanās sakņu endofītisko sēņu ietekmē

Tālākai *ex vitro* apsākņošanai izmantoja ar *Calcarisporium arbuscula* un *Mortierella* sp. *in vitro* inokulētos abu mūžzaļo rododendru šķirņu dzinumus, kā arī ar *Acremonium* sp. 5. izolātu inokulētos mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ dzinumus.

Ex vitro adventīvo sakņu attīstības anatomiskā gaita *in vitro* pavairotiem rododendru dzinumiem sīkāk aprakstīta 3.3 nodaļā, tāpēc šajā nodaļā ilustratīvos nolūkos aplūkota tikai rizoģenēze ar *Mortierella* sp. *in vitro* inokulētos rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ dzinumos (3.27. attēls). Inokulētajiem dzinumiem pirmos meristemoīdus lūksnes rajonā konstatēja 7. eksperimenta dienā pēc to ievietošanas *ex vitro* apsākņošanās substrātā. Savukārt pirmo adventīvās saknes aizmetni un sakni konstatēja vienlaikus – 11. eksperimenta dienā (3.27. B un C attēls).

Kopumā rizoģenēzes gaita anatomiski visiem eksperimenta variantiem abām eksperimentā izmantotajām rododendru šķirnēm bija līdzīga, taču atšķirības bija novērojamas laikā, kas bija nepieciešams rizoģenēzes posmu sasniegšanai (3.3. tabula). Salīdzinot ar kontroli, abām rododendru šķirnēm adventīvo sakņu attīstību veicināja *Mortierella* sp. un *Calcarisporium arbuscula* inokulācija. Savukārt pēc *in vitro* inokulācijas ar *Acremonium* sp. 5. izolātu *ex vitro* rizoģenēze rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ dzinumiem bija kavēta.

Abu rododendru šķirņu dzinumiem adventīvās saknes visātrāk, 11. eksperimenta dienā, konstatēja pēc *in vitro* inokulācijas ar *Mortierella* sp. Taču, neraugoties uz to, ka ar *Calcarisporium arbuscula* inokulētiem rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ dzinumiem meristemoīdi bija izveidojušies jau iepriekš *in vitro* inokulācijas laikā, attīstījušās adventīvās saknes šim apstrādes variantam konstatēja tikai 13. eksperimenta dienā, savukārt rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ dzinumiem – 15. eksperimenta dienā.



3.27. attēls. *Ex vitro* rizoģenēzes posmi ar *Mortierella* sp. *in vitro* inokulētiem mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ dzinumiem. A – meristemoīdu attīstība (bultu gali) 7. eksperimenta dienā, bultas norāda uz lokāliem bojājumiem dzinuma audos. B – saknes aizmetnis un tā anatomiskā uzbūve 11. eksperimenta dienā. C – adventīvā sakne (bultas) eksperimenta 11. dienā. A, C – 100 μm, B – 10 μm.

3.3. tabula

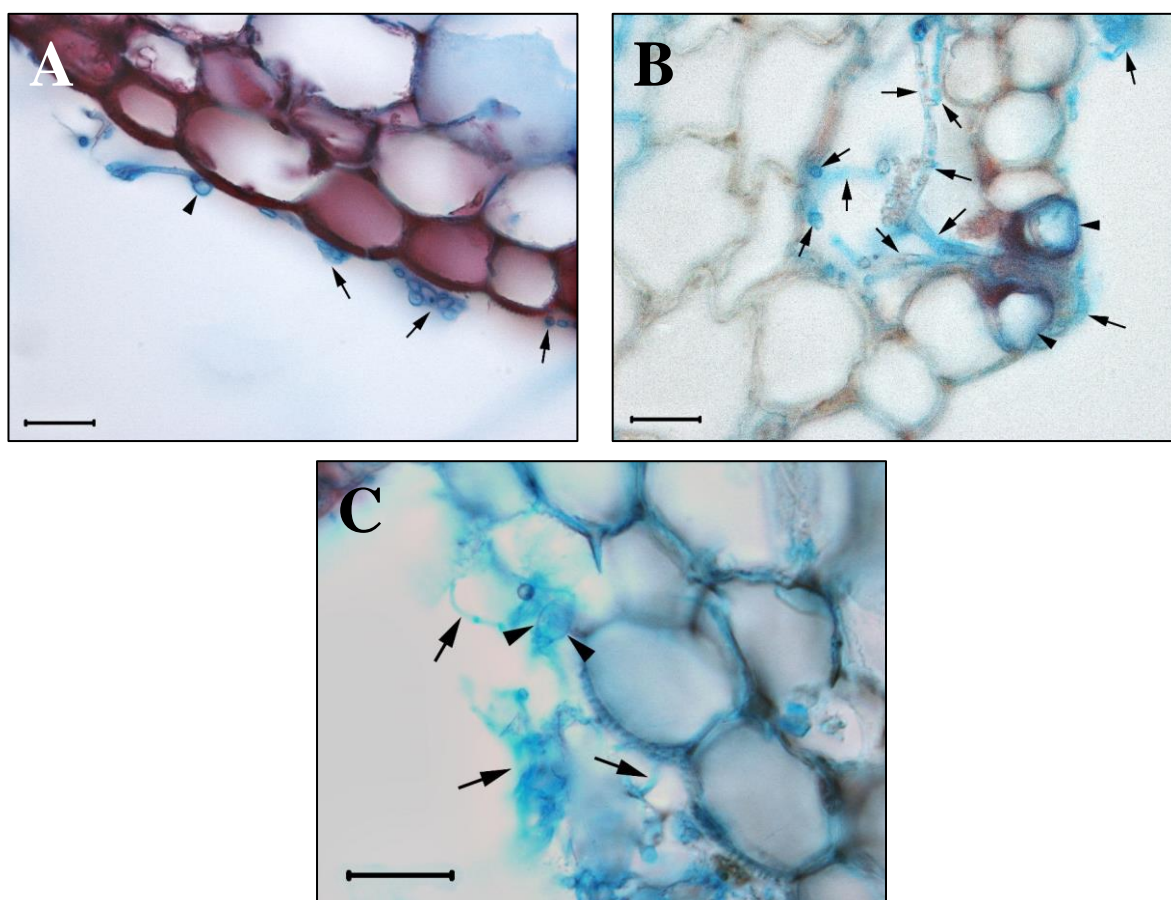
Ex vitro rizoģenēzes posmi ar sakņu endofītiskajām sēnēm *in vitro* inokulētiem mūžzaļo rododendru šķirņu ‘Babītes Lavanda’ un ‘Nova Zembla’ dzinumiem, m – meristemoīds, a – aizmetnis

Šķirne	Apstrādes variants	Meristemoīds vai aizmetnis	Attīstījies adventīvā sakne
‘Babītes Lavanda’	Kontrole	8. diena - a	Līdz 15. dienai nenovēroja
	<i>Acremonium</i> sp. 5.	11. diena - a	Līdz 15. dienai nenovēroja
	<i>Calcarisporium arbuscula</i>	5. diena - m	15. diena
	<i>Mortierella</i> sp.	Nenovēroja	11. diena
‘Nova Zembla’	Kontrole	9. diena - a	15. diena
	<i>Calcarisporium arbuscula</i>	1. diena - m	13. diena
	<i>Mortierella</i> sp.	7. diena - m	11. diena

Ar *Acremonium* sp. 5. izolātu *in vitro* inokulētajiem rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ dzinumiem saknes aizmetni konstatēja 11. eksperimenta dienā, taču līdz 15. eksperimenta dienai adventīvo sakņu attīstību šim variantam nenovēroja.

3.5.1 Ar adventīvo sakņu veidošanos nesaistītie anatomiskie novērojumi

Ex vitro apsakņošanās laikā novēroja arī ar rizoģenēzi tieši nesaistītus procesus (3.28. attēls).



3.28. attēls. Ar adventīvo sakņu veidošanos nesaistītie anatomiskie novērojumi. A – *Acremonium* sp. 5. izolāta hifas (bultas) un apresorijs (bultas gals) uz *in vitro* pavairota un inokulēta mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ dzinuma epidermas 1. eksperimenta dienā. B – ar *Acremonium* sp. 5. izolātu inokulēta mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ dzinuma inficēšanās caur atvārsnīti 5. eksperimenta dienā, sēnes hifas (bultas), atvārsnītes slēdzējšūnas (bultu gali). C – apresorijs (bultu gali) un sēnes hifas (bultas) uz mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ dzinuma, kas inokulēts ar *Calcarisporium arbuscula*, epidermas, 1. eksperimenta dienā. Nogrieznis atbilst: A–C – 10 μm.

Ar *Acremonium* sp. 5. izolātu *in vitro* inokulētiem rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ dzinumiem novēroja sēnes apresorija veidošanos un micēlija attīstību uz dzinuma epidermas (3.28. A attēls), kā arī sēnes hifu ieaugšanu dzinuma audos caur atvārsnīti 5. eksperimenta dienā (3.28. B attēls). Līdzās esošajiem dzinumu audiem bojājumus nenovēroja. Apresoriju veidošanos novēroja arī ar *Calcarisporium arbuscula in vitro* inokulētiem rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ dzinumiem (3.28. C attēls).

3.6 Endofītisko sēņu ietekme uz anatomiskajiem un fizioloģiskajiem procesiem mūžzaļo rododendru vienspura sprauņos ar lapu rizoģenēzes laikā

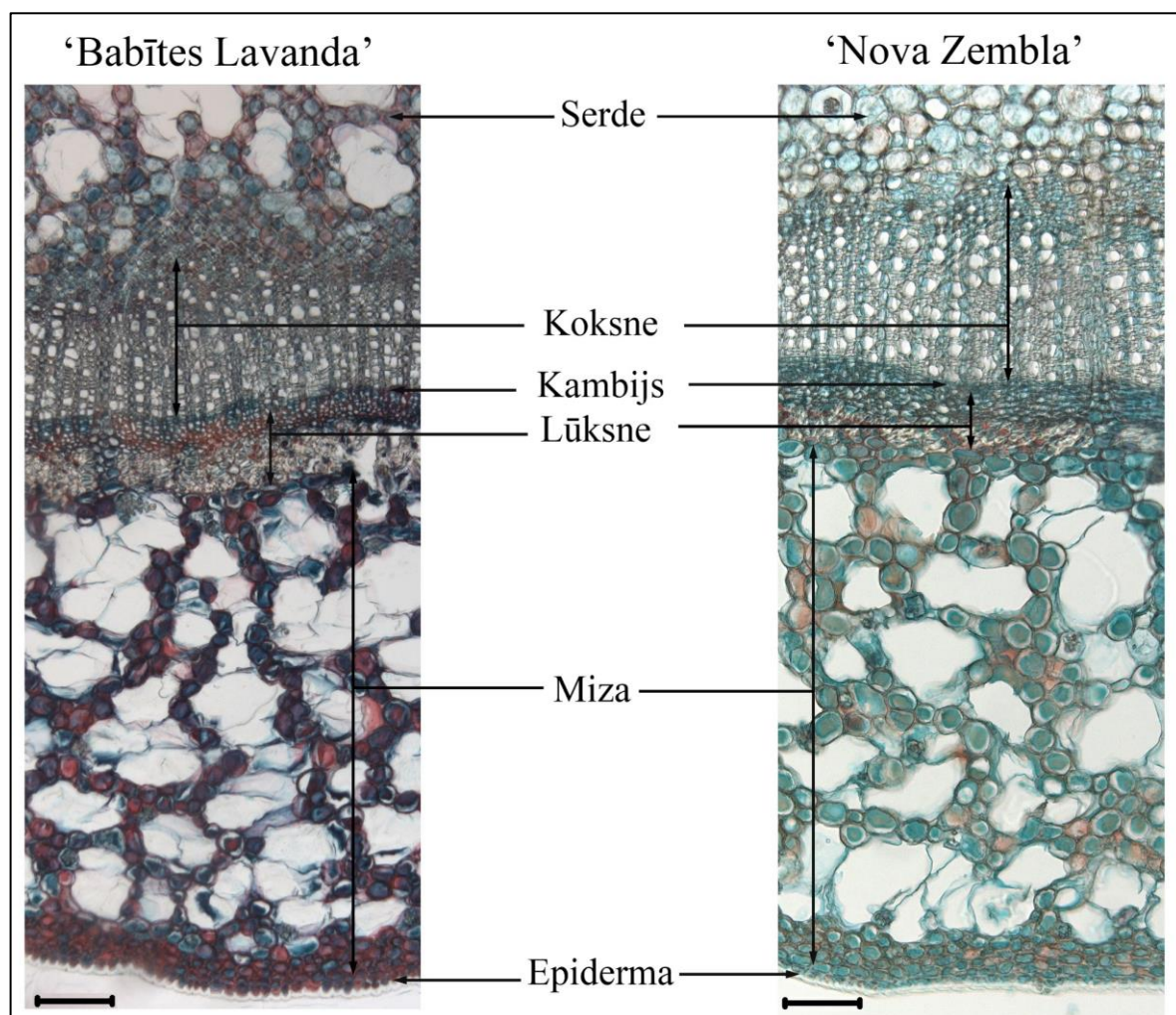
Ņemot vērā *ex vitro* apsakņošanas eksperimenta rezultātus, tālākajos eksperimentos mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ vienspura sprauņus ar lapu apstrādāja ar *Calcarisporium arbuscula* un *Mortierella* sp. un mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ vienspura sprauņus ar lapu – ar *Calcarisporium arbuscula*. Salīdzinājumam eksperimentos ar abām mūžzaļo rododendru šķirnēm izmantoja sintētisko rizoģenēzes stimulatoru – 1% ISS, un kontroli.

3.6.1 Endofītisko sēņu ietekme uz rizoģenēzes procesa anatomisko norisi mūžzaļo rododendru vienspura sprauņos ar lapu

Abu eksperimentā izmantoto mūžzaļo rododendru šķirņu viengadīgu dzinumu anatomiskā uzbūve bija līdzīga (3.29. attēls).

Dzinumi sastāvēja no kokaugiem raksturīgajām anatomiskajām struktūrām – epidermas, mizas, lūksnes, kambija, koksnes un serdes. Lielāko dzinuma daļu aizņēma miza, koksnes vadaudi un serde. Dzinumus no ārpuses sedza epiderma, ko veidoja viens šūnu slānis. Uz ārpusi no epidermas abu šķirņu dzinumiem bija izveidojies kutikulas slānis. Zem epidermas atradās miza, ko veidoja neliels plātņu kolenhīmas slānis, mizas parenhīma un endoderma. Abām rododendru šķirnēm kolenhīmu veidoja 2–3 blīvi sakārtotu šūnu slānis. Mizas parenhīmas šūnas bija izkārtotas irdeni, ar plašām starpšūnu telpām. Endodermas slānis bija vāji izteikts, cietes graudus endodermas šūnās nenovēroja. Zem endodermas atradās sklerenhīmas slānis, ko veidoja pārkoksnējušās šūnas ar uzbiezinātiem sekundārajiem šūnapvalkiem. Sklerenhīma abu mūžzaļo rododendru šķirņu dzinumos veidoja nepārtrauktu gredzenu. Zem sklerenhīmas

atradās lūksne, kambijs un koksne. Centrālo cilindra daļu aizņēma serde ar lielām, irdeni izkārtotām parenhīmas šūnām un plašām starpšūnu telpām.

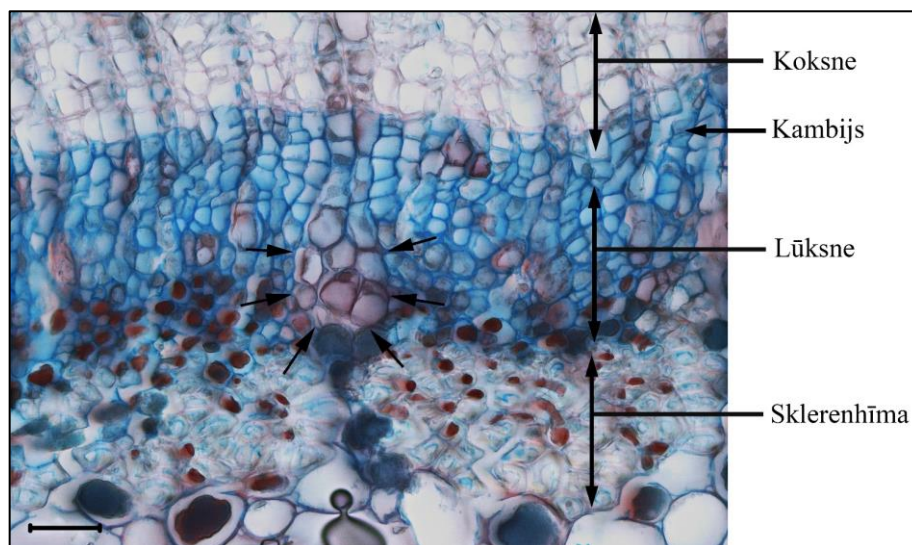


3.29. attēls. Mūžzaļo rododendru šķirņu ‘Babītes Lavanda’ un ‘Nova Zembla’ viengadīga dzinuma anatomiskā uzbūve. Nogrieznis atbilst 100 μm .

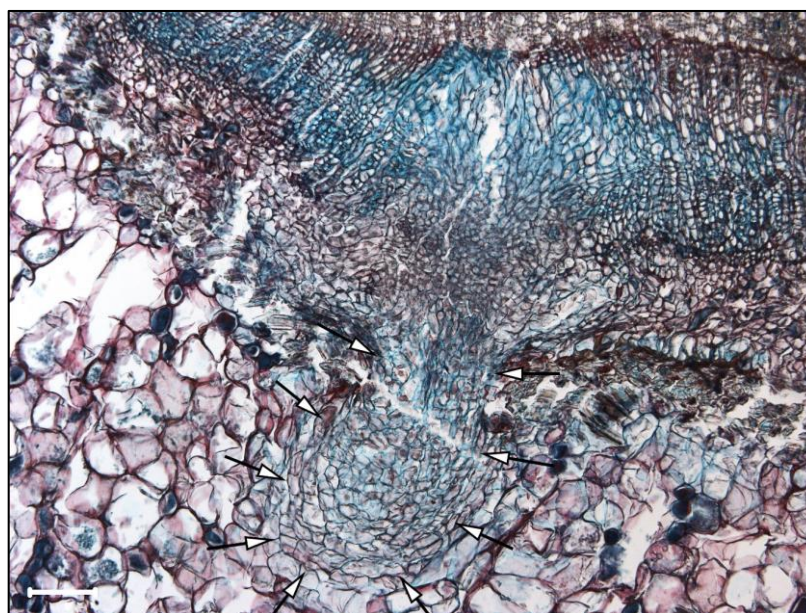
Mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ vienpumpura spraudņiem ar lapu pirmos adventīvo sakņu iniciāļus kontroles, *Calcarisporium arbuscula* un *Mortierella* sp. apstrādes variantiem novēroja 3. eksperimenta dienā, savukārt 1% ISS apstrādes variantam – 4. eksperimenta dienā (3.30. attēls, 3.4. tabula).

Saknes iniciāļi veidojās no lūksnes staru paplašinājumiem vai lūksnes parenhīmas šūnām. Salīdzinot ar līdzās esošajām lūksnes vadaudu šūnām, to šūnas bija lielākas un izkārtojās, veidojot ieapaļu klasteri. Iniciāļi attīstījās par aizmetņiem, un pirmos adventīvo sakņu aizmetņus visātrāk (10. dienā) novēroja *Mortierella* sp. apstrādes varianta vienpumpura spraudņiem. Kontroles, *Calcarisporium. arbuscula* un 1% ISS apstrādes variantu

vienpumpura spraudējiem tos novēroja attiecīgi 17., 20. un 23. eksperimenta dienā (3.31. attēls).



3.30. attēls. Adventīvās saknes iniciālis (bultas) 1% ISS apstrādes varianta mūžzaļo rododendru šķirnes 'Babītes Lavanda' vienpumpura spraudēņa ar lapu pamatnes šķērs griezumā 4. eksperimenta dienā. Nogrieznis atbilst 30 μm .



3.31. attēls. Adventīvās saknes aizmetnis (bultas) 1% ISS apstrādes varianta mūžzaļo rododendru šķirnes 'Babītes Lavanda' vienpumpura spraudēņa ar lapu pamatnes šķērs griezumā 23. eksperimenta dienā. Nogrieznis atbilst 100 μm .

Divus mēnešus pēc eksperimenta sākuma bija apsakņojušies 96% kontroles, 92% *Calcarisporium arbuscula*, 85% *Mortierella* sp. un 94% 1% ISS apstrādes variantu rododendru šķirnes 'Babītes Lavanda' vienpumpura spraudēņu. Savukārt pēc septiņiem mēnešiem, pārbaudot izdzīvojušo apsakņoto vienpumpura spraudēņu daudzumu, konstatēja, ka izdzīvojuši

54% kontroles, 70% *Calcarisporium arbuscula*, 47% *Mortierella* sp. un 73% 1% ISS apstrādes variantu vienpumpura spraudēju (3.4. tabula).

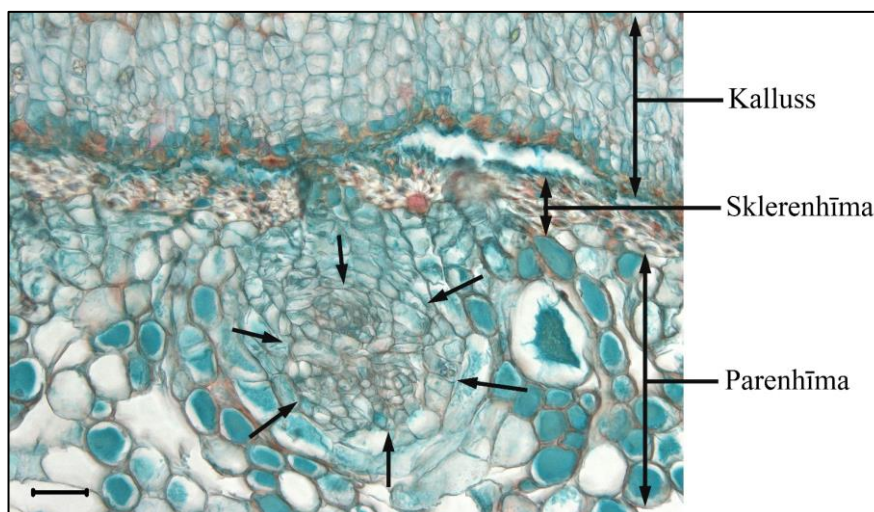
3.4. tabula

Adventīvo sakņu attīstība mūžzaļo rododendru šķirņu ‘Babītes Lavanda’ un ‘Nova Zembla’ vienpumpura spraudējiem ar lapu. ISS – indol-3-sviestskābe, TL – traheīdu ligzdas

Šķirne	Apstrāde	Pirmais iniciālis	Pirmais aizmetnis	TL	Apsakņošanās, %	Dzīvotspēja, %
‘Babītes Lavanda’	Kontrole	3. diena	17. diena	-	96 %	54 %
	<i>Calcarisporium arbuscula</i>	3. diena	20. diena	-	92 %	70 %
	<i>Mortierella</i> sp.	3. diena	10. diena	2	85 %	47 %
	1% ISS	4. diena	23. diena	-	94 %	73 %
‘Nova Zembla’	Kontrole	14. diena	Nenovēroja līdz 29. dienai	14	38 %	
	<i>Calcarisporium arbuscula</i>	5. diena	20. diena	7	63 %	
	1% ISS	3. diena	26. diena	5	70 %	

Rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ kontroles, *Calcarisporium arbuscula* un 1% ISS variantu vienpumpura spraudējiem ar lapu pirmos adventīvo sakņu iniciāļus konstatēja attiecīgi 14., 5. un 3. eksperimenta dienā (3.4. tabula). Adventīvo sakņu aizmetņu attīstību kontroles varianta vienpumpura spraudējiem līdz 29. eksperimenta dienai nenovēroja, savukārt, *Calcarisporium arbuscula* un 1% ISS apstrādes variantu vienpumpura spraudēju pamatnēs saknes aizmetņus novēroja 20. un 26. eksperimenta dienā (3.4. tabula). Divus mēnešus pēc eksperimenta sākuma konstatēja, ka apsakņojušies 38%, 63% un 70% attiecīgi kontroles, *Calcarisporium arbuscula* un 1% ISS variantu spraudēju. Informāciju par izdzīvojušo spraudēju procentu pēc septiņiem mēnešiem šai šķirnei neieguva.

Veicot anatomisko izpēti, eksperimenta gaitā mūžzaļo rododendru vienpumpura spraudēju ar lapu pamatnēs novēroja ne tikai adventīvo sakņu attīstību, bet arī traheīdu ligzdu veidošanos kallusā (3.32. attēls). Traheīdu ligzdas veidojās mizas parenhīmas audos vienpumpura spraudēju stumbra pamatnēs tuvu kallusam vai pašā kallusā, un tās sastāvēja no grupās sakārtotiem koksnes vadaudiem. Rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ vienpumpura spraudējiem traheīdu ligzdas novēroja tikai diviem *Mortierella* sp. apstrādes varianta vienpumpura spraudējiem.



3.32. attēls. Traheīdu ligzda (bultas) mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ kontroles apstrādes varianta vienpumpura spraudeņa ar lapu pamatnes šķērs griezumā 14. eksperimenta dienā. Nogrieznis atbilst 50 μm.

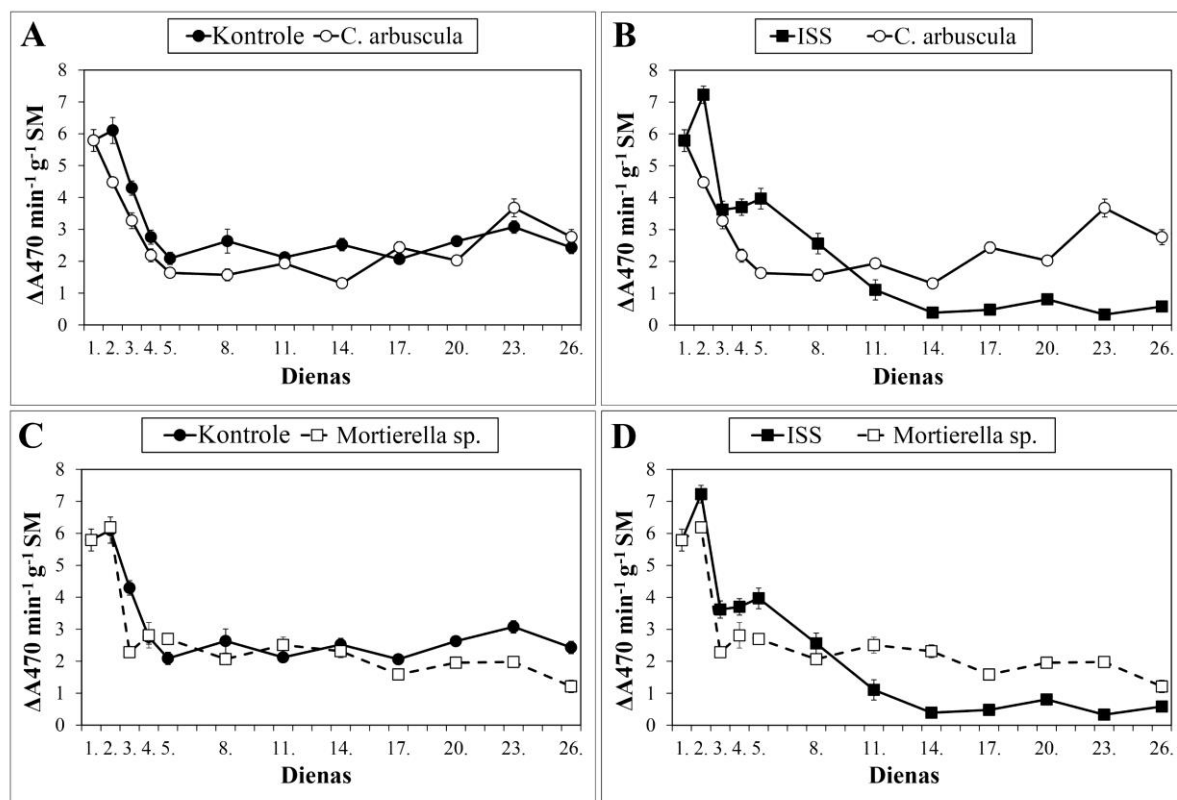
Savukārt rododendru šķirnei ‘Nova Zembla’ traheīdu ligzdas konstatēja četrpadsmit kontroles, septiņiem *Calcarisporium arbuscula* un pieciem 1% ISS variantu vienpumpura spraudeņiem ar lapu (3.4. tabula).

Sēņu hifas vienpumpura spraudeņu audos eksperimenta laikā nenovēroja nevienai no eksperimentā izmantotajām šķirnēm.

3.6.2 Endofītisko sēņu ietekme uz gvajakola peroksidāzes aktivitātes izmaiņām mūžzaļo rododendru vienpumpura spraudeņos ar lapu rizoģenēzes laikā

Adventīvo sakņu attīstības laikā gvajakola peroksidāzes aktivitāte mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ vienpumpura spraudeņu lapās visiem eksperimenta variantiem mainījās līdzīgi (3.33. attēls).

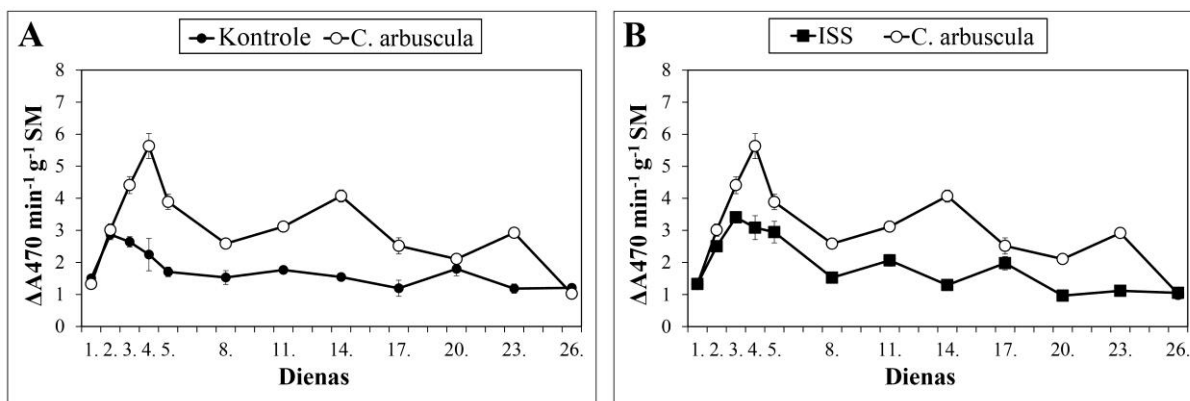
Kontroles, 1% ISS un *Mortierella* sp. apstrādes variantu vienpumpura spraudeņiem novēroja gvajakola peroksidāzes aktivitātes pieaugumu no 1. līdz 2. eksperimenta dienai, kam sekoja aktivitātes straujš kritums līdz 3. eksperimenta dienai 1% ISS un *Mortierella* sp. un 5. eksperimenta dienai kontroles apstrādes variantu vienpumpura spraudeņiem (3.33. C un D attēls).



3.33. attēls. Gvajakola peroksidāzes aktivitātes izmaiņas mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ vienpumpura spraudeņu lapās adventīvo sakņu attīstības laikā. Rezultāti ir vidējie no 3 paraugiem, katrā laika punktā, katram apstrādes variantam \pm SE.

Kontroles un *Mortierella sp.* apstrādes variantu vienpumpura spraudeņiem turpmākajā eksperimenta laikā novēroja nelielas, nebūtiskas peroksidāzes aktivitātes svārstības (3.33. C attēls). 1% ISS apstrādes varianta vienpumpura spraudeņiem peroksidāzes aktivitāte pieauga no 3. līdz 5. eksperimenta dienai, kam sekoja straujš peroksidāzes aktivitātes kritums līdz 14. eksperimenta dienai; un līdz 28. dienai būtiskas izmaiņas peroksidāzes aktivitātē nenovēroja (3.33. B un D attēls). *Calcarisporium arbuscula* apstrādes varianta vienpumpura spraudeņiem novēroja strauju gvajakola peroksidāzes aktivitātes samazināšanos no 1. līdz 5. eksperimenta dienai. Turpmāk būtiskas izmaiņas nenovēroja līdz 14. eksperimenta dienai, pēc kuras peroksidāzes aktivitāte ar nelielām svārstībām pieauga līdz 26. eksperimenta dienai (3.33. A un C attēls). Eksperimenta sākumā, līdz 8. dienai, peroksidāzes aktivitāte bija augstāka 1% ISS apstrādes varianta vienpumpura spraudeņu lapās, savukārt kontroles, *Mortierella sp.* un *Calcarisporium arbuscula* apstrādes variantiem tā bija augstāka pēc 8. eksperimenta dienas (3.33. attēls).

Adventīvo sakņu attīstības laikā gvajakola peroksidāzes aktivitātes izmaiņām visu apstrādes variantu rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ vienpumpura spraudeņu lapās novēroja līdzīgas tendences (3.34. A un B attēls).



3.34. attēls. Gvajakola peroksidāzes aktivitātes izmaiņas mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ vienpumpura spraudeņu lapās adventīvo sakņu attīstības laikā. Rezultāti ir vidējie no 3 paraugiem, katrā laika punktā, katram apstrādes variantam \pm SE.

Kontroles apstrādes vienpumpura spraudeņu lapās novēroja peroksidāzes aktivitātes pieaugumu līdz 2. eksperimenta dienai, kam sekoja pakāpeniska aktivitātes samazināšanās līdz 5. eksperimenta dienai un nebūtiskas svārstības līdz 26. eksperimenta dienai (3.34. A attēls). 1% ISS un *Calcarisporium arbuscula* apstrādes variantu vienpumpura spraudeņiem sākotnēji novēroja peroksidāzes aktivitātes pieaugumu līdz 3. un 4. eksperimenta dienai, kam sekoja aktivitātes samazināšanās līdz 8. eksperimenta dienai. 1% ISS apstrādes varianta vienpumpura spraudeņiem no 8. līdz 20. eksperimenta dienai novēroja peroksidāzes aktivitātes svārstības, pēc kurām līdz 26. eksperimenta dienai būtiskas izmaiņas nenovēroja (3.34. B attēls). Savukārt *Calcarisporium arbuscula* apstrādes varianta vienpumpura spraudeņu lapās novēroja atkārtotu peroksidāzes aktivitātes pieaugumu no 8. līdz 14. eksperimenta dienai, kam sekoja kritums līdz 20. eksperimenta dienai, neliels kāpums 23. eksperimenta dienā un kritums 26. dienā (3.34. A un B attēls). Eksperimenta laikā peroksidāzes aktivitāte bija līdzīga kontroles un 1% ISS apstrādes variantu vienpumpura spraudeņu lapās, savukārt *Calcarisporium arbuscula* apstrādes varianta vienpumpura spraudeņiem, salīdzinot ar kontroli un 1% ISS, tā bija būtiski augstāka ($p = 1,3 \times 10^{-2}$, $p = 1,5 \times 10^{-2}$).

4 DISKUSIJA

4.1 Mūžzaļo rododendru sakņu kolonizācija un sakņu endofītiskās sēnes

Literatūrā plaši pētīta rododendru sakņu kolonizācija ar erikoīdās mikorizas sēnēm un tumši septētajiem endofītiem, kā arī šo sēņu bioloģiskā daudzveidība, bet mazāk uzmanības pievērsts citiem endofītiem. Zināms, ka rododendru sakņu kopējā kolonizācija ar mikroskopiskajām sēnēm variē atkarībā no rododendru sugas. No Eiropā sastopamajām rododendru sugām zemākā kopējā sakņu kolonizācija ar mikorizālajām sēnēm un tumši septētajiem endofītiem konstatēta *Rhododendron luteum* – 47%, savukārt augstākā kolonizācija konstatēta *Rhododendron lapponicum* – 85%. Saknes galvenokārt kolonizē erikoīdās mikorizas sēnes, taču, piemēram, *Rhododendron lapponicum* 55% no kopējās sakņu kolonizācijas veido tumši septētie endofīti (Vohník and Albrechtová 2011). Sakņu endofītiskajām un īpaši mikorizālajām sēnēm raksturīga sakņu kolonizācijas sezonālitate un kolonizācijas izmaiņas atkarībā no augšanas apstākļiem un sakņu vecuma (Summerbell 2005). Šajā pētījumā konstatēja, ka mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ trīsgadīgu augu saknēs kolonizācija ar sēnēm ievērojami mainās atkarībā no sakņu resnuma (vecuma), augstākā kolonizācija raksturīga jaunajām, smalkajām saknēm. Tā ir raksturīga erikoīdās mikorizas iezīme, un literatūrā bieži ir uzsvērtā rododendru smalko (*hair-roots*) sakņu kolonizācija ar mikorizālajām sēnēm (Leopold 2016).

Pētījumos, kuros izmanto mikroorganismu izolēšanu uz barotnēm, iegūtos rezultātus ierobežojošs faktors ir ātri augošu, plaši izplatītu mikroorganismu klātbūtne, kas konkurē ar lēni augošajiem organismiem ar specifiskākām augšanas prasībām (Aly et al. 2011). To novēroja arī šajā pētījumā, izolējot sēnes uz dažādām barotnēm. Izteikti tas bija novērojams ar iesala ekstrakta agara barotnēm, kurās strauji savairojās baktēriju kultūras. Savukārt uz kartupeļu dekstrozes agara lēni augošu endofītu izdalīšanu apgrūtināja citu sēņu, piemēram, *Trichoderma* vai *Acremonium* ģinšu sēņu straujā augšana. To bija iespējams kavēt, barotnes inkubējot tumsā 4 °C, taču tādā gadījumā iegūtie micēliji galvenokārt bija sterili (3.1. tabula). Izolēšanas metodiskās pieejas, kā barotnes sastāvs, auga audu fragmentu izmērs, laiks pēc augu materiāla ievākšanas un inkubācijas apstākļi, var būtiski ietekmēt secinājumus par endofītu infekciju biežumu, sēņu daudzveidību un sugu sastāvu (Arnold 2007, Sun et al. 2011). Salīdzinot ar lakstaugiem, no kokaugu saknēm izolēto sēņu daudzveidība ir lielāka. No *Artemisia annua* 192 sakņu fragmentiem izolētas 36 sēnes (Yuan et al. 2011), bet no 204 *Oryza granulata* sakņu fragmentiem izolētas 58 sēnes (Yuan et al. 2010). Savukārt no *Pinus rigida* 10 sakņu paraugiem izolētas 70 sēnes (Luo et al. 2017), bet no *Olea europaea* 1750 sakņu

fragmentiem izolētas 932 sēnes (Martins et al. 2016). Šajā pētījumā no trīs mūžzaļo rododendru šķirnes 'Babītes Lavanda' trīsgadīgu augu saknēm izolēja 32 sterilus sēņu micēlijus un 152 endofītisko sēņu izolātus, kas piederēja *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cylindrocarpon*, *Mortierella*, *Penicillium* un *Trichoderma* ģintīm, kā arī *Calcarisporium arbuscula*. Sterilie micēliji pārsvarā attīstījās tumsā 4 °C. No istabas temperatūrā izolētajām sēnēm lielāko izolēšanas procentu veidoja *Acremonium*, *Trichoderma* un *Penicillium* ģinšu sēnes, kas ir zināmas kā saprotrofas augsnes sēnes.

Acremonium ģints sēnes, piemēram, *Acremonium strictum* uzskata par klasiskiem graudzāļu sakņu ne-*Clavicipitaceae* endofītiem (Sánchez Márquez et al. 2012), taču tās sastopamas arī tādu kokaugu kā *Picea mariana* (Summerbell 2005), *Phoenix dactylifera* (El-Deeb and Arab 2013) un *Pinus thunbergii* (Min et al. 2014) saknēs. *Acremonium* ģints endofīti saimniekaugam var nodrošināt aizsardzību pret augēdājiem kukaiņiem (Jaber and Vidal 2009) un *Fusarium* ģints sēņu izraisītām augu slimībām (Grunewaldt-Stöcker and von Alten 2016), taču literatūrā atrodamas liecības arī par *Acremonium* ģints sēņu izraisītām slimībām *Fragaria* × *ananassa* (Racedo et al. 2013). Ar *Acremonium strictum* inficētās audu kultūrā pavairotu mūžzaļo rododendru šķirnes 'Cunningham's White' sakņu šūnās novērota erikoīdajai mikorizai raksturīgo hifu tinumu attīstība, taču tie galvenokārt konstatēti mirušās rizodermas šūnās (Grunewaldt-Stöcker and von Alten 2016).

Trichoderma ģints sēnes ir vienas no visbiežāk no augsnes un augu daļām izolētajām saprotrofajām sēnēm, un to asociācijas ar augiem var būt ļoti dažādas. *Trichoderma reeseiis* ir adaptējusies saprotrofam dzīvesveidam un spēj efektīvi noārdīt celulozi saturošu augu materiālu, bet *Trichoderma virens* un *Trichoderma atroviridea* ir mikoparazīti un bioloģiskās kontroles aģenti (Contreras-Cornejo et al. 2016). Līdz šim *Trichoderma* ģints sēnes izolētas no tādu kokaugu kā *Olea europaea* (Martin et al. 2016), *Pinus rigida* (Luo et al. 2017), *Picea mariana* (Summerbell 2005), *Pinus thunbergii* (Min et al. 2014) saknēm. Augu vai substrāta inokulācija ar šīs ģints sēnēm var veicināt augu augšanu, inducēt sistēmisko rezistenci pret augu patogēniem un palielināt saimniekauga abiotiskā stresa izturību (Contreras-Cornejo et al. 2016).

Penicillium ģints sēnes sastopamas dažādos substrātos, un to dzīvesveids variē no nekrotrofas patogenitātes līdz endofītiskam mutuālismam, taču galvenokārt tās ir saprotrofi (Ropars et al. 2016). Šīs ģints sēnes izolētas no *Olea europaea* (Martin et al. 2016), *Picea mariana* (Summerbell 2005), *Phoenix dactylifera* (El-Deeb and Arab 2013), *Pinus thunbergii* (Min et al. 2014), *Abies lasiocarpa*, *Juniperus occidentalis*, *Picea abies*, *Prunus domestica* un citu koku saknēm (Ridout et al. 2017).

Arī *Alternaria* ģints sēnes ir plaši izplatītas apkārtējā vidē, augsnē un gaisā, un pēc sava dzīves veida var būt saprofitiskas, endofītiskas vai patogēnas (Eram et al. 2018). Šai ģintij piederošas sēnes bieži izolētas no dažādu lakstaugu un kokaugu virszemes daļām, retāk – no saknēm (Eram et al. 2016). *Alternaria* ģintij piederošas sēnes izolētas no *Olea europaea* (Martins et al. 2016) un *Combretum latifolium* (Rao et al. 2017) saknēm.

Līdzīgi kā *Penicillium* un *Alternaria* ģinšu sēnes, arī *Aspergillus* ģints sēnes ir vienas no apkārtējā vidē visbiežāk sastopamajām sēnēm (Ozimek et al. 2018). Kopā ar *Penicillium* ģintij piederošajām sēnēm *Aspergillus* ģints sēnes ir vienas no visbiežāk no augu saknēm izolētajām sēnēm (Stone et al. 2004). Tās izolētas no *Phoenix dactylifera* (El-Deeb and Arab 2013), *Pinus thunbergii* (Min et al. 2014) saknēm.

Cylindrocarpon ģints sēnes pārsvarā zināmas kā sakņu puvi izraisoši patogēni ar plašu saimniekaugu loku. Literatūrā aprakstīta arī šai ģintij piederoša suga *Cylindrocarpon pauciseptatum*, kurai nav raksturīga patogenitāte (Tewoldemedhin et al. 2011). Ģints sēņu patogēno īpašību dēļ tās turpmākiem pētījumiem izlēma neizmantot.

Mortierella ģints sēnes ir hitīnu degradējošas sēnes, kas plaši izplatītas mērenās klimata joslas zālienu, mežu, pļavu un tundras augsnēs (Bills et al. 2004). Šīs ģints sēnes izolētas arī no *Populus trichocarpa* × *Populus maximowiczii* (Lacercat-Didier et al. 2016), *Picea mariana* (Summerbell 2005) un *Pinus thunbergii* (Min et al. 2014) saknēm. Zināms, ka *Mortierella* ģints sēnes spēj sintezēt polinepiesātinātās taukskābes kā palmitīnskābi, oleīnskābi, stearīnskābi u.c. (Jermsuntiea et al. 2011), kā arī indol-3-etiķskābi un giberelskābi (Ozimek et al. 2018). *Triticum aestivum* graudu inokulācija ar *Mortierella verticillata* vai *Mortierella alpina* būtiski palielina jauno augu sakņu un vasas biomasu (Ozimek et al. 2018). Savukārt pēc *Tecoma stans* un *Fraxinus chinensis* sēklu inokulācijas ar *Mortierella* sp. kopā ar mikorizālo sēni *Rhizoglyphus fasciculatum* būtiski palielinās augu garums, stumbra diametrs, dzinuma sausā masa un fosfora koncentrācija, salīdzinot ar kontroli un tikai mikorizālās sēnes inokulāciju (Moreno et al. 2016).

Calcarisporium arbuscula ir sēņu augļķermeņu endofītiskā sēne, kas izolēta arī no *Phyllostachys heteroclada* stumbra un lapām (Zhou et al. 2017), *Butea monosperma* stumbra (Tejesvi et al. 2006) un *Quercus petraea* saknēm (Halmschlager and Kowalski 2004). Pētījumos ar sēnes kultūrām *Calcarisporium arbuscula* noskaidrota plaša spektra antimikrobiālas (Watson 1965, Zhou et al. 2017) un pretsēņu (Ji et al. 2004) īpašības, kā arī ir zināms, ka šī sēne sintezē antibiotiku aurovertīnu (Osselton et al. 1974). Turklāt nesēn konstatēts, ka šīs sēnes genomā lokalizēti 68 biosintētisko gēnu klasteri, kas norāda uz potenciālo *Calcarisporium arbuscula* spēju sintezēt virkni citu savienojumu (Mao et al. 2015).

Dažkārt endofītiskajām sēnēm un mikroskopiskajām sēnēm kopumā novēro dzīvesveida variācijas, piemēram, endofītiskās sēnes var būt arī saprotrofi, koprofili, bezmugurkaulnieku patogēni, latentī patogēni vai citu saimniekauga genotipu vai sugu patogēni. *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium* un citi sēņu taksoni ir nespēcīalizēti augu sakņu endofīti, kas plaši sastopami arī dažāda veida augsnēs, un šīm sēnēm ir raksturīga sporulēšana saimniekauga audu novecošanas un atmiršanas gadījumā (Sánchez Márquez et al. 2012). Visticamāk, līdzīgi tas ir arī ar šajā pētījumā izolētajām *Penicillium* un *Trichoderma* ģinšu sēnēm.

Ņemot vērā biežo izolēšanas frekvenci un *Acremonium* ģints sēņu asociāciju ar dažādu saimniekaugu saknēm, turpmākajiem pētījumiem izmantoja divus šīs ģints izolātus. Savukārt *Calcarisporium arbuscula* izvēlējas tālākajiem pētījumiem tās antimikrobiālo īpašību un potenciāla, kas saistāms ar biosintētisko gēnu klasteru klātbūtni sēnes genomā, dēļ. *Mortierella* sp. izvēlējas, jo šīs ģints sēnes spēj sintezēt augu hormonus un citus bioaktīvos savienojumus.

4.2 *In vitro* pavairotu mūžzaļo rododendru dzinumu anatomiskā uzbūve un *ex vitro* rizoģenēzes anatomiskais raksturojums

In vitro pavairotu mūžzaļo rododendru dzinumu anatomiskā uzbūve, kā arī to apsakņošanās *ex vitro* apstākļos ir salīdzinoši maz pētītas.

Rododendru *in vivo* stumbru veido epiderma, kolenhīma, miza, sklerenhīma, lūksne, kambijs, koksne un serde (Еремин и Бойко 1998, Kondratovičs und Megre 1999, Megre et al. 2011). Abu eksperimentos izmantoto mūžzaļo rododendru šķirņu ‘Babītes Lavanda’ un ‘Nova Zembla’ *in vitro* pavairotu dzinumu anatomiskā uzbūve ir savstarpēji līdzīga, un to veido epiderma, miza, lūksne, kambijs, koksne un serde. Dzinumu anatomiskā uzbūve ir līdzīga *in vivo* augiem un *Rhododendron* ssp. *Tsutusi* cv. ‘Zihudie’ dzinumiem *in vitro* (Elmongy et al. 2018b). Tāpat kā acālijām (Elmongy et al. 2018b), arī *in vitro* pavairotiem mūžzaļo rododendru dzinumiem nav attīstījušies mehāniskie audi – kolenhīma un sklerenhīma (3.3. attēls).

Abu šķirņu dzinumus no ārpuses klāj primārie segaudi – epiderma, kas novērots arī viengadīgiem rododendru dzinumiem (Kondratovičs und Megre 1999, Tezgül Çakir et al. 2005, Megre et al. 2011). Vēlāk primāros segaudus kokaugiem nomaina sekundārie segaudi – periderma (Evert 2006), kas rododendriem attīstās pirmā vai otrā gada laikā zem sklerenhīmas gredzena (Еремин и Бойко 1998). 29% *in vitro* pavairotu mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ dzinumu lūksnes rajonā novēroja izteiktu peridermas slāni. Peridermas attīstība *in*

in vitro pavairotiem dzinumiem līdz šim nav pētīta, taču ir zināms, ka kokaugu stumbriem tā attīstās sekundārās augšanas laikā, lai aizstātu epidermu, kā arī ievainojuma rezultātā, un tās attīstību nosaka ģenētiskie, fizioloģiskie un vides faktori (Leite and Pereira 2017). Periderma konstatēta arī *in vitro* pavairotiem *Trachelospermum asiaticum* (Apter et al. 1993) un *Cotinus coggyria* (Ilczuk and Jacygrad 2016) dzinumiem, taču daudziem kokaugiem, to skaitā arī *Rhododendron ssp. Tsutusi* cv. ‘Zihudie’ dzinumiem, *in vitro* peridermas attīstība nav novērota (Harbage et al. 1993, Ballester et al. 1999, Iliev et al. 2001, San-José et al. 2012, Elmongy et al. 2018b).

Kolenhīma nodrošina mehānisko izturību jauniem augu orgāniem (Leroux 2012), taču līdzīgi kā *in vitro* pavairotiem acālijū (Elmongy et al. 2018b), *Cedrela odorata* (Millán-Orozco et al. 2011) un *Alnus glutinosa* (San-José et al. 2012) dzinumiem arī abu pētījumā izmantoto rododendru šķirņu *in vitro* pavairotiem dzinumiem šo audu tipu nekonstatēja, lai gan viengadīgiem rododendru dzinumiem ir raksturīga no vairākiem šūnu slāņiem veidota plātņu kolenhīma (Kondratovičs und Megre 1999). Literatūrā ir maz informācijas par kolenhīmas ontogēnēzi, un pastāv uzskats, ka tā var veidoties gan no pamataudu parenhīmas, gan prokambija (Leroux 2012). Kolenhīmas trūkums konstatēts arī *in vitro* pavairotu *Rubus* sp. dzinumos, un autori to skaidrojuši ar mehāniska stresa trūkumu audu kultūru apstākļos (Donnelly et al. 1985). Ņemot vērā, ka kolenhīma, atšķirībā no sklerenhīmas, ir dzīvi mehāniskie audi, iespējams, tā attiecīgos apstākļos attīstās no epidermas tuvumā esošām parenhīmas šūnām.

Starp dažādām kokaugu sugām atšķiras arī sklerenhīmas slāņa attīstība *in vitro*. Tā konstatēta *in vitro* pavairotos *Castanea sativa* (Ballester et al. 1999), *Alnus glutinosa* (San-José et al. 2012) un *Cedrela odorata* (Millán-Orozco et al. 2011) dzinumos, savukārt *Malus domestica* cv. ‘Gala’ (Harbage et al. 1993), līdzīgi kā abām pētītajām rododendru šķirnēm, sklerenhīma *in vitro* pavairotiem dzinumiem neattīstījās. *Malus domestica* potcelma M26 *in vitro* pavairotiem dzinumiem dažos stumbra reģionos novērotas atsevišķas sklerenhīmas šķiedras (Zhou et al. 1992). Vāji attīstīta sklerenhīma un koksnes un lūksnes vadaudi konstatēti arī *in vitro* pavairotiem *Coccinia indica* dzinumiem (Shekhawat and Manokari 2018), kas, iespējams, saistīts ar audu kultūru apstākļiem raksturīgo augsto mitruma līmeni, kas kavē lignifikāciju un sekundāro šūnapvalku veidošanos (Donnelly et al. 1985, Shekhawat and Manokari 2018). Arī šajā pētījumā konstatēja vāju lūksnes un koksnes vadaudu attīstību, un ne reti vadaudi bija izkārtoti atsevišķos kūlīšos un neveidoja noslēgtu gredzenu. Īpaši izteikti tas bija rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ *in vitro* pavairotiem dzinumiem, kuriem nepārtrauktu centrālo cilindru konstatēja tikai 50% dzinumu.

Mērot anatomiskās struktūras, konstatēja, ka pastāv statistiski būtiskas atšķirības anatomiskajā dzinumū attīstībā ne vien starp šķirnēm, bet arī katras šķirnes ietvaros (3.4. attēls un 3.2. tabula). Katras šķirnes ietvaros dzinumū un centrālo cilindru diametriem, kā arī koksnes un lūksnes slāņa biezumiem konstatēja statistiski būtisku atšķirību, kas kopumā liecināja par pētījumā izmantotā audu kultūrā pavairotā materiāla anatomisko heterogenitāti. Atšķirība viena augu taksona ietvaros liecina par dažādu dzinumū brieduma pakāpi, kas, iespējams, radusies *in vitro* pavairošanas rezultātā no hormonālā gradienta izsuktām hormonālā līdzsvara atšķirībām dzinumū posmos. Vadaudu attīstībā būtiska ietekme fitohormonu auksīna un citokinīnu līdzsvaram. Ir zināms, ka kambijā veidojas auksīna gradients, kas nepieciešams koksnes vadaudu attīstībai, savukārt attīstošās lūksnes šūnās būtiski palielinās citokinīnu koncentrācija. Pētījumā ar *Populus trichocarpa* konstatēts, ka stumbrā pastāv radiāls hormonu gradients ar citokinīnu, auksīna un giberelīnu koncentrācijas maksimumu attiecīgi lūksnē, kambijā un koksnē (Immanen et al. 2016). Jāņem vērā, ka dzinumos veidojas arī vertikāls citokinīnu un auksīna gradients, kam ir būtiska loma normālā organoģenēzē (Zhao et al. 2008). Tādējādi šajā pētījumā dzinumū anatomiskā heterogenitāte visticamāk veidojusies atkarībā no divposmu spraudņu pozīcijas *in vitro* pavairotos dzinumos.

In vitro pavairotu dzinumū potenciālo apsākņošanās rezultātu prognozēšana pēc morfoloģiskajiem parametriem varētu veicināt veiksmīgāku augu materiāla atlasī pavairošanas gaitā. Tā, piemēram, *in vitro* pavairotiem *Leucospermum cordifolium* dzinumū, kuru diametrs ir mazāks nekā 25-30 mm, adventīvo sakņu attīstība nenotiek (Suárez et al. 2018). Veiksmīga rizoģenēzes procesa norise lielā mērā ir atkarīga no ogļhidrātu transporta un to uzkrāšanās sakņu attīstības zonā (Da Costa et al. 2013). Saharozes transportu augos nodrošina lūksnes audi, kas ir viens no iemesliem adventīvo sakņu attīstībai tiešā vadaudu tuvumā. Saknes attīstības laikā iniciālim un aizmetnim tas nodrošina vieglu ogļhidrātu pieejamību, tāpēc dzinumū vadaudu attīstībai var būt noteicoša loma. Pētījumā abām rododendru šķirnēm konstatēja būtisku korelāciju starp abu šķirņu dzinumū un centrālo cilindru diametriem. Taču no pavairošanas viedokļa šie dati tālāk nav izmantojami morfoloģiskai dzinumū izvērtēšanai lūksnes un koksnes slāņu attiecības variāciju dēļ (3.10. attēls).

Literatūrā adventīvo sakņu attīstība rododendriem *ex vitro* apstākļos līdz šim nav aprakstīta, tāpēc, lai gūtu priekšstatu par procesa ilgumu un anatomiskajiem posmiem, sākotnēji to pētīja *in vitro* pavairotiem rododendru šķirnes 'Nova Zembla' dzinumū *ex vitro* apsākņošanās apstākļos. Galvenie ar adventīvo sakņu attīstību saistītie procesi notiek dažu dienu vai atsevišķos gadījumos pat stundu laikā pēc spraudņu ievietošanas apsākņošanās vidē (1.1. un 1.2. tabula). Šos procesus iedala trīs fāzēs (De Klerk 2002). Pirmā fāze ir

dediferenciācijas fāze, kas ilgst 24 h un kuras laikā notiek diferencējušos un diferencējošos šūnu ciklu atjaunošana, kā rezultātā šūnas kļūst kompetentas rizoģenēzes signālu atbildes reakcijai. Otrās jeb indukcijas fāzes laikā notiek pirmā šūnu dalīšanās, tāpēc tā uzskatāma par būtiskāko adventīvo sakņu attīstības posmu (Altamura 1996; De Klerk 2002). Pirmie meristemoīdi izveidojas indukcijas fāzes beigās, 3.-4. dienā pēc eksperimentu uzsākšanas. Tam seko diferenciācijas fāze, kuras laikā meristemoīdi attīstās par aizmetņiem un aug līdz šķērso stumbra epidermu (De Klerk 2002, Millán-Orozco et al. 2011). *In vitro* pavairotiem mūžzaļo rododendru dzinumiem pirmās ar *ex vitro* rizoģenēzi saistītās anatomiskās izmaiņas konstatēja 12. eksperimenta dienā, kad lūksnes rajonā novēroja pirmos sakņu aizmetņus (3.5. attēls). Adventīvo sakņu attīstības anatomiskā norise audu kultūrās pavairotiem dzinumiem atšķiras atkarībā no taksona, tā, piemēram, *Castanea sativa* × *Castanea cretana* pirmie sakņu aizmetņi konstatēti 6.-8. dienā (Gonçalves et al. 1998), savukārt *Olea europaea* – 22. dienā (Macedo et al. 2013). Visbiežāk pētījumos par audu kultūrās pavairotu kokaugu dzinumu apsākšanu *in vitro* vai *ex vitro* apstākļos adventīvās saknes attīstās kambija – lūksnes rajonā (Apter et al. 1993, Ilczuk and Jacygrad 2016, Elmongy et al. 2018b, Suárez et al. 2018). Retāk novērojama adventīvo sakņu attīstība no citiem dzinuma audiem. *Olea europaea* dzinumiem *in vitro* adventīvās saknes attīstās no mizas parenhīmas šūnām (Macedo et al. 2013). Interesanti, ka līdzīgi kā pētījumā ar *Betula pendula* (Iliev et al. 2001), arī abu rododendru šķirņu dzinumu pamatnē vienlaikus konstatēja sakņu aizmetņus dažādās attīstības stadijās, kas liecina par nevienmērīgu sakņu attīstību laikā. Literatūrā minēts, ka augoši sakņu aizmetņi varētu kavēt citu meristemoīdu attīstību, iespējams, resursu sadalījuma dēļ (Altamura 1996). Pirmās adventīvās saknes novēroja 16. eksperimenta dienā (3.7. attēls) un tām varēja izšķirt rizodermu, mizu, endodermu un periciklu, kas ieskāva diferencējošos vadaudus saknes centrālajā daļā (3.8. attēls).

Dzinumiem ar vāji attīstītu lūksni (zemu lūksnes : koksnes attiecību) nenovēroja ar adventīvo sakņu attīstību saistītu anatomisko struktūru veidošanos (3.10. attēls). Savukārt dzinumiem ar attīstītu lūksni novēroja gan meristemoīdu, gan aizmetņu veidošanos. Tas var būt saistīts gan ar ogļhidrātu transportu (Da Costa et al. 2013), gan ar hormonālo līdzsvaru dzinuma audos. Visticamāk *ex vitro* adventīvo sakņu veidošanās procesā būtisku lomu spēlē tieši dzinumu sākotnējā heterogenitāte un atšķirības vadaudu attīstībā. Līdz šim šie aspekti nav ņemti vērā kā rizoģenēzi ietekmējoši, taču atsevišķos gadījumos apsākšanās eksperimentu negatīvais iznākums var būt saistāms tieši ar augu materiāla zudumiem, kas saistīti ar šīm dzinumu anatomiskajām atšķirībām. Šie rizoģenēzes aspekti literatūrā līdz šim nav aplūkoti un pētījumus šajā virzienā būtu vēlams turpināt, piemēram, lai noskaidrotu, kā divposmu

spraušana pozīcija uz *in vitro* pavairota dzinuma ietekmē nākošā dzinuma attīstību un tālāko adventīvo sakņu attīstību *ex vitro*.

4.3 Endofītisko sēņu ietekme uz *in vitro* pavairotiem mūžzaļo rododendru dzinumiem

Mēnesi pēc mūžzaļo rododendru šķirņu ‘Babītes Lavanda’ un ‘Nova Zembla’ dzinumu *in vitro* inokulācijas ar diviem *Acremonium* izolātiem, *Mortierella* sp. un *Calcarisporium arbuscula* konstatēja, ka izmantotie endofīti atšķirīgi ietekmē abu šķirņu pigmentu koncentrāciju, dzinumu vizuālo stāvokli, anatomiju un aug atšķirīgi uz audu kultūras barotnēm.

Endofītu ietekme uz *in vitro* audzētu augu pigmentu koncentrāciju ir maz pētīta, un līdz šim iegūtie rezultāti ir pretrunīgi. Pētījumā par PGP-HSF endofītiskās sēnes ietekmi uz *Mentha piperita* endofīts būtiski neietekmēja ne hlorofila *a*, ne hlorofila *b* koncentrāciju (Mucciarelli et al. 2003). Savukārt 20 dienas pēc dīgšanas ar *Fusarium moniliforme* inokulētai *Zea mays* novērota būtiska kopējās hlorofila koncentrācijas samazināšanās (Pinto et al. 2000). Ar *Clavicipitaceae* endofītu *Epichloë typhina in vivo* inokulētiem *Dactylis glomerata* augiem novērota būtiski augstāka hlorofila *b* koncentrācija (Rozpadek et al. 2015). Šajā pētījumā konstatēja būtiski augstāku hlorofila *a*, kā arī kopējā hlorofila koncentrāciju ar *Acremonium* sp. 5. izolātu, *Mortierella* sp. un *Calcarisporium arbuscula in vitro* inokulētu mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ dzinumu lapās. Līdzīgi tas novērots arī pēc *Rhynchostylis retusa in vitro* inokulācijas ar *Colletotrichum alatae*, *Leptosphaerulina chartarum* un *Fusarium* sp. (Shah et al. 2019) un pēc *Piper nigrum* inokulācijas ar *Piriformospora indica* (Anith et al. 2018). Bioķīmiskais vai fizioloģiskais mehānisms, caur kuru endofīti varētu ietekmēt pigmentu koncentrāciju augos, šobrīd nav zināms. *Acremonium* sp. 7. izolāta inokulācijas ietekmē rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ dzinumiem notika lapu brūnēšana, un veikt tālāko pigmentu koncentrācijas analīzi šīs šķirnes dzinumu lapās nebija iespējams. Savukārt rododendru šķirnei ‘Nova Zembla’ būtiski samazinājās gan hlorofila *a*, gan hlorofila *b* koncentrācija, kas saistāms ar endofīta vispārējo negatīvo ietekmi uz abu rododendru šķirņu dzinumiem *in vitro*. Līdzīgi tas novērots arī ar patogēno sēni *Ophiostoma novo-ulmi* inokulētu *Ulmus minor in vitro* pavairotu dzinumu lapās (Oliveira et al. 2012). Rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ dzinumu lapās kopumā bija augstāka hlorofila *a* un *b* koncentrācija, salīdzinot ar rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ dzinumiem. Līdzīgi šķirnes specifiskas pigmentu koncentrācijas konstatētas divu *Rhododendron × hybridum* šķirņu lapās *in vivo* (Shen et al. 2017). Rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ dzinumiem inokulācijas ietekmē pigmentu

koncentrācija nemainījās. Izņēmums bija inokulācija ar *Mortierella* sp., kuras ietekmē būtiski samazinājās visu pigmentu koncentrācija, kas vērtējama kā negatīva ietekme.

Acremonium sp. 7. izolātam bija izteikti negatīva ietekme uz abu eksperimentā izmantoto rododendru šķirņu *in vitro* inokulēto dzinumu vizuālo stāvokli un anatomisko uzbūvi. Augiem novēroja lapu brūnēšanu, un dzinumu audi bija 100% inficēti ar sēnes hifām un tiem bija vērojami plaši bojājumi, kā šūnapvalku degradācija, tannīnu uzkrāšanās un dzinumu anatomiskās integritātes zudums. Līdzīgi šūnu degradācija, šūnapvalku lignifikācija un suberinizācija kā arī kondensēto tannīnu un fenolu uzkrāšanās novērota *Ulmus americana* kallusu kultūrās pēc inokulācijas ar patogēno sēni *Ophiostoma novo-ulmi* (Aoun et al. 2009). Kopumā šāda *Acremonium* sp. 7. izolāta ietekme varētu liecināt par šī izolāta kā nekrotrofa patogēna dabu, taču jāņem vērā, ka literatūrā atrodams maz liecību par šīs ģints sēņu patogenitāti, kas norāda uz citu faktoru ietekmi uz eksperimenta rezultātiem. Ir zināms, ka endofītu patogenitāti var ietekmēt gan mikroorganisma un auga genotips, gan vides apstākļi, kā arī mijiedarbība ar citiem mikroorganismiem (Brader et al. 2017). Līdz ar to, ir jāņem vērā, ka *Acremonium* sp. 7. izolāts šajā eksperimentā atradās bezkonkurences apstākļos, sterilā vidē, ar viegli pieejamām barības vielām, kas būtiski atšķiras no reālajiem augšanas apstākļiem, un, iespējams, tieši rododendru *in vitro* pavairošanas apstākļi rosināja sēnes virulenci. Taču, ņemot vērā eksperimenta rezultātus, turpmākajiem eksperimentiem šo *Acremonium* izolātu neizmantoja.

Līdzīgi rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ *in vitro* inokulētos dzinumus ietekmēja arī *Acremonium* sp. 5. izolāts. Arī šajā gadījumā sēnes hifu klātbūtni konstatēja visos dzinumu audos, kolonizācija bija 46–82%, kam sekoja lokālu bojājumu veidošanās, šūnapvalku ieliekšanās un tannīnu uzkrāšanās dzinumu bazālajās daļās. Taču kopējais bojājumu apjoms bija 0–30% atkarībā no griezuma veikšanas vietas. Rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ dzinumiem šāda veida bojājumus nenovēroja.

Abām eksperimentā izmantotajām rododendru šķirnēm reakcija uz *in vitro* dzinumu inokulāciju ar *Mortierella* sp. bija līdzīga kā pēc inokulācijas ar *Acremonium* sp. 5. izolātu. Rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ dzinumiem novēroja lokālus bojājumus epidermā un tai piegulošajā mizas parenhīmā, kā arī sēnes hifu klātbūtni atsevišķās šūnās, taču ne dziļākajos dzinumu audos. Meta-analīzē par endofītu ietekmi uz augiem konstatēts, ka tie nesaimniekaugus ietekmē negatīvi, taču, iespējams, tas saistāms ar laboratorijas, siltumnīcas vai lauka apstākļiem, kuros veikti eksperimenti (Mayerhofer et al. 2012). Tomēr rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ dzinumiem nekonstatēja ne bojājumus, ne sēnes hifas dzinumu audos. Līdzīgi atšķirīga, neitrāla vai pozitīva, *Lachnum* un *Cadophora* celmu ietekme novērota uz

dažādu *Vaccinium corymbosum* šķirņu *in vitro* pavairotu dzinumu sakņu un vasas biomasu (Bizabani and Dames 2015).

Calcarisporium arbuscula no augiem izolēta samērā reti, tā pārsvarā uzskatāma par sēņu endofītu, un pētījumu par šīs sēnes un šīs ģints sēņu ietekmi uz augiem trūkst. Taču ir zināms, ka šīs ģints sēnēm raksturīga antimikrobiālu savienojumu un mikotoksīnu sintēze (Mao et al. 2015). Šajā eksperimentā *Calcarisporium arbuscula* attīstījās salīdzinoši lēni, un mēnesi pēc inokulācijas kultūrā tā bija pārklājusi 90% barotnes. Rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ dzinumiem nekonstatēja sēnes hifas dzinuma audos. Arī rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ dzinumos sēnes hifas nekonstatēja, taču 60% dzinumu mēnesi pēc *in vitro* inokulācijas konstatēja attīstījušos meristemoīdus. No praktiskā viedokļa meristemoīdu attīstība *in vitro* pirms dzinumu pārstādīšanas *ex vitro* varētu paātrināt apsākņošanās procesa gaitu. Meristemoīdu attīstību stimulē augsnis, kas šajā gadījumā audu kultūras barotnē nebija pievienots. Tādējādi meristemoīdu attīstība, iespējams, liecina par augsņa vai augsņa dabas savienojumu sintēzi endofītā *Calcarisporium arbuscula* vai stimulējošu šī endofīta ietekmi uz augsņa sintēzi dzinuma audos. Literatūrā atrodama informācija par endofītiskās sēnes *Piriformospora indica* spēju sintezēt augsni (Sirrenberg et al. 2007, Vadassery et al. 2008) vai inducēt tā sintēzi augos (Sukumar et al. 2013).

Dažādos pētījumos par augu – mikroorganismu asociāciju izveidi iegūtie secinājumi dažkārt tiek attiecināti uz visu pētītā auga vai mikroorganisma ģinti (Plett and Martin 2018), taču šī pētījuma rezultāti, īpaši, abu *Acremonium* izolātu un *Calcarisporium arbuscula* kontekstā, liecina par to, ka vienas ģints sēnes var dažādi ietekmēt augu augšanu, kā arī vienas ģints dažādu šķirņu augiem var būt atšķirīga reakcija uz vienu mikroorganisma taksonu. Literatūrā šāda šķirnes specifiska reakcija skaidrota ar kompleksu mijiedarbību starp saimniekauga genotipu un endofītu, īpaši augu augšanas hormonālo regulāciju (Guo et al. 2015). Interesanti, ka pēc abu šķirņu dzinumu *in vitro* inokulācijas ar visām eksperimentā izmantotajām endofītiskajām sēnēm, neatkarīgi no sēnes vispārējās ietekmes, dzinuma audos konstatēja fenolu un kondensēto tannīnu uzkrāšanos, ko nenovēroja kontroles dzinumiem.

4.4 Endofītisko sēņu ietekme uz *in vitro* pavairotu mūžzaļo rododendru dzinumu apsākņošanos *ex vitro*

Sākotnējā *in vitro* pavairotu mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ dzinumu *ex vitro* adventīvo sakņu attīstības anatomiskās izpētes laikā konstatēja, ka ar rizogēnēzes

stimulatoru neapstrādātiem dzinumiem adventīvo sakņu aizmetņi attīstās 12. eksperimenta dienā, bet adventīvās saknes – 16. eksperimenta dienā. Apsakņojot *in vitro* inokulētos dzinumus un kontroles varianta dzinumus *ex vitro* apstākļos, adventīvās saknes abu šķirņu dzinumiem visātrāk attīstījās pēc inokulācijas ar *Mortierella* sp., neraugoties uz to, ka ar *Calcarisporium arbuscula* inokulētajiem mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ dzinumiem meristemoīdi bija attīstījušies jau *in vitro*. Savukārt ar *Acremonium* sp. inokulētajiem mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ dzinumiem adventīvās saknes līdz 15. eksperimenta dienai ne morfoloģiski, ne anatomiski nekonstatēja. *Mortierella* sp. vērojama pozitīva ietekme gan uz mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ pigmentu koncentrāciju, gan uz abu šķirņu *in vitro* pavairotu dzinumu adventīvo sakņu attīstību *ex vitro* apstākļos, kas visticamāk saistāms ar jau iepriekš minēto indol-3-etilskābes un gibereliskābes sintēzi *Mortierella* ģints sēnēs (Ozimek et al. 2018). Interesanti, ka ar *Calcarisporium arbuscula in vitro* inokulētajiem mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ dzinumiem *in vitro* izveidojušos meristemoīdu attīstība par aizmetņiem un adventīvajām saknēm notiek salīdzinoši lēni, kas liecina par attīstības inhibēšanu. Zināms, ka šādu ietekmi uz adventīvo sakņu attīstības vēlākajām fāzēm var radīt pārāk augsta augsnes koncentrācija (Druege et al. 2016). Šie rezultāti kopumā norāda uz *Calcarisporium arbuscula* potenciālu tikt izmantotai rododendru pavairošanā, taču būtu jāizvēlas optimāls inokulācijas veids un ilgums. Turklāt jāņem vērā arī šīs sēnes antimikrobiālās īpašības, kas var veicināt *in vitro* pavairoto dzinumu aizsardzību *ex vitro* apstākļos. Pēc literatūrā atrodamās informācijas *Calcarisporium arbuscula* micēlijs ir lēni augošs (Watson 1965), kas apstiprinājās arī *in vitro* inokulācijas laikā, kad mēneša laikā sēnes micēlijs bija izplatījies uz 90% barotnes virskārtas. Šīs lēnās micēlija attīstības dēļ sēne nespēj izdzīvot augsnes apstākļos bez saimniekorganisma (Watson 1965). Tādējādi no ekoloģiskā viedokļa sēnes izmantošana pavairošanā neradītu nekādu mikrobioloģisko piesārņojumu substrātos, kur tā parasti nav sastopama.

4.5 Endofītisko sēņu ietekme uz adventīvo sakņu attīstību mūžzaļo rododendru vienpumpura spraudņiem ar lapu

Pēc anatomiskajām un bioķīmiskajām izmaiņām adventīvo sakņu attīstību iedala indukcijas, iniciācijas un ekspresijas fāzēs (Gaspar et al. 1994). Indukcijas fāzes laikā vērojama peroksidāzes aktivitātes samazināšanās, un anatomiskas izmaiņas nav novērojamas. Tai seko iniciācijas fāze ar peroksidāzes aktivitātes maksimumu un saknes iniciāļu attīstību fāzes beigās.

Ekspresijas fāzes laikā attīstās un aug saknes aizmetņi un peroksidāzes aktivitāte pakāpeniski samazinās (Gaspar et al. 1994). Šo fāzu attīstība laikā ir atkarīga no auga taksona un pavairošanas metodes (1.1. un 1.2. tabula). Dažkārt literatūrā aprakstīta tikai iniciācijas un ekspresijas fāze ar raksturīgu peroksidāzes aktivitātes pieaugumu, kam seko aktivitātes pakāpeniska samazināšanās, savukārt indukcijas fāze bioķīmiski nav noteikta (Husen 2008, Kose et al. 2011, San-José et al. 1992, Zhang et al. 2017). Tas saistāms ar retām paraugu ievākšanas reizēm un nokavētu indukcijas fāzi. Literatūrā atrodami arī pētījumi, kuros, neraugoties uz veiksmīgu adventīvo sakņu attīstību spraudņiem, bioķīmiskās adventīvo sakņu attīstības fāzes pēc peroksidāzes aktivitātes izmaiņām nav iespējams noteikt, piemēram, *Berberis buxifolia* dzinumiem *in vitro* (Arena et al. 2003), *Grevillea* sp. dzinumiem *in vitro* (Ludwig-Müller 2003) un *Rhododendron* ssp. *Tsutusi* cv. 'Zihudie' dzinumiem *in vitro* (Elmongy et al. 2018a). Līdzīgi arī eksperimentā ar mūžzaļo rododendru vienpumpura spraudņiem ar lapu bioķīmiskās rizoģenēzes fāzes pēc peroksidāzes aktivitātes izmaiņām nebija iespējams noteikt rododendru šķirnes 'Babītes Lavanda' kontroles un ar *Mortierella* sp. un *Calcarisporium arbuscula* inokulētajiem spraudņiem, kā arī rododendru šķirnes 'Nova Zembla' visu apstrādes variantu spraudņiem (3.33. un 3.34. attēls). Rododendru šķirnes 'Nova Zembla' kontroles varianta spraudņiem tas varētu būt skaidrojams ar salīdzinoši zemo šķirnes apsākšanās spēju, ko apstiprina salīdzinoši vēla pirmā saknes iniciāļa parādīšanās un zemais apsākšanās procents (38%). Savukārt agrīna iniciāļu attīstība 3. eksperimenta dienā šīs šķirnes vienpumpura spraudņiem ar lapu pēc apstrādes ar ISS liecina par īsu indukcijas fāzi, kas nav konstatēta. Dažas stundas ilga indukcijas fāze aprakstīta dažādu kokaugu sugu dzinumiem *in vitro* un *ex vitro* apsākšanās laikā (Caboni et al 1997, Gonçalves et al. 1998, Naija et al. 2008). Turklāt ne vienmēr bioķīmiskās adventīvo sakņu attīstības fāzes, kas noteiktas pēc peroksidāzes aktivitātes izmaiņām, atbilst anatomiski veiktajiem novērojumiem. Pēc apstrādes ar ISS *Ebenus cretica* pirmie sakņu aizmetņi konstatēti bioķīmiskās iniciācijas fāzes beigās, kad pēc teorijas būtu jābūt redzamiem tikai pirmajiem sakņu iniciāļiem (Syros et al. 2004). Savukārt *Cotinus coggyria* dzinumiem *in vitro* apsākšanās laikā pirmie sakņu aizmetņi novēroti jau indukcijas fāzē, kad nekādām anatomiskām izmaiņām nevajadzētu notikt (Ilczuk and Jacygrad 2016). Šajā pētījumā vienīgais eksperimenta variants, kuram novēroja bioķīmisko un anatomisko adventīvo sakņu attīstības fāzu atbilstību, bija rododendru šķirnes 'Babītes Lavanda' ar ISS apstrādātie vienpumpura spraudņi. Indukcijas fāze ar peroksidāzes aktivitātes kritumu bija no 2. līdz 3. eksperimenta dienai. Tai sekoja iniciācijas fāze ar peroksidāzes aktivitātes maksimumu 5. eksperimenta dienā, un pirmo saknes iniciāli novēroja 4. eksperimenta dienā. Turpmākajā eksperimenta gaitā peroksidāzes aktivitāte pakāpeniski

samazinājās un saknes aizmetni konstatēja 23. eksperimenta dienā. Rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ kontroles, ISS un *Calcarisporium arbuscula* apstrādes variantu vienpumpura spraudeņiem eksperimenta laikā nenovēroja būtiskas anatomiskas vai fizioloģiskas atšķirības adventīvo sakņu attīstībā, un arī apsakņošanās procents bija līdzīgs. Savukārt ar *Mortierella* sp. inokulētajiem vienpumpura spraudeņiem pirmo saknes aizmetni konstatēja ātrāk nekā pārējiem eksperimenta variantiem, taču divus mēnešus pēc eksperimenta sākuma apsakņojušies bija 85% vienpumpura spraudeņu, kas bija zemāks rādītājs nekā pārējiem apstrādes variantiem. Savukārt vislabākā ietekme uz izdzīvojušo vienpumpura spraudeņu procentu ilgtermiņā bija *Calcarisporium arbuscula* un ISS apstrādei, kam izdzīvoja attiecīgi 70 un 73% spraudeņu, salīdzinot ar 54 un 47% attiecīgi kontroles un *Mortierella* sp. apstrādes variantiem (3.4. tabula). Literatūrā aprakstīta pozitīva ISS ietekme uz rododendru spraudeņu sakņu sistēmas lielumu (Nawrocka-Grzeškowiak 2004), kas var ietekmēt spraudeņu dzīvotspēju ilgtermiņā.

Savukārt rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ vienpumpura spraudeņiem labāko rezultātu ar ātrāku sakņu iniciāļu un aizmetņu attīstību un augstāku apsakņošanās procentu ieguva pēc spraudeņu apstrādes ar ISS (70%) un *Calcarisporium arbuscula* (63%). Interesanti, ka šai šķirnei apsakņošanās laikā novēroja traheīdu ligzdu attīstību, kas izteiktāk notika kontroles varianta vienpumpura spraudeņiem (3.4. tabula). *Ceratonia siliqua* dzinumiem *in vitro* bez ārējas augsnes apstrādes traheīdu ligzdu attīstība konkurē ar adventīvo sakņu attīstību, kas liecina par rizoģenēzes programmas aizstāšanu ar ksiloģenēzes programmu nepietiekoša augsnes apstākļos (Ricci et al. 2016). Novērots, ka neapsakņojušies, kallusu veidojoši *Pinus sylvestris* dzinumi *in vitro* aug vienlīdz labi kā saknes veidojošie dzinumi, un vadaudu savienojumu izveide starp traheīdu ligzdām kallusus un spraudeņa vadaudiem norāda uz potenciālu traheīdu ligzdu līdzdalību barības vielu un ūdens uzņemšanā (Grönroos and von Arnold 1985). Šajā pētījumā rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ vienpumpura spraudeņiem traheīdu ligzdas novēroja tikai pēc apstrādes ar *Mortierella* sp., kas apsakņojās salīdzinoši sliktāk, taču pārējiem apstrādes variantiem, kas apsakņojās labi, traheīdu ligzdu attīstību nenovēroja. Rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ vienpumpura spraudeņiem visvairāk traheīdu ligzdu konstatēja kontroles variantam, kas apsakņojās vissliktāk (3.4. tabula). Šī un iepriekšējo pētījumu (Grönroos and von Arnold 1985, Ricci et al. 2016) rezultāti kopumā norāda uz iespējamo traheīdu ligzdu lomu ūdens un barības vielu uzņemšanā un transportā gadījumos, kad taksonam raksturīga vājāka augsnes atbildes reakcija vai zemāka augsnes uzkrāšanās spraudeņu bazālajās daļās, kā rezultātā ir kavēta adventīvo sakņu attīstība.

Līdz šim konstatēts, ka apsākņošanās substrāta inokulācija ar endofītisko sēni *Piriformospora indica* veicina adventīvo sakņu attīstību pelargoniju un puansetiju spraudeņiem. Tas skaidrots ar *Piriformospora indica* ietekmi uz augsīna, etilēna un poliamīnu līmeņa izmaiņām augos (Druege et al. 2007). Zināms, ka adventīvo sakņu attīstība ir atkarīga no daudziem endogēniem un eksogēniem faktoriem, taču galveno lomu adventīvo sakņu attīstības indukcijā spēlē augsīns (de Klerk et al. 1999). Līdzīgi jau iepriekš *ex vitro* apsākņošanās eksperimentā konstatēja *Calcarisporium arbuscula* pozitīvo ietekmi uz rododendru šķirņu ‘Babītes Lavanda’ un ‘Nova Zembla’ dzinumam apsākņošanās, un eksperiments ar vienpumpura spraudeņiem ar lapu, īpaši, rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ gadījumā šos rezultātus apstiprina.

Patogēno un endofītisko sēņu un augu mijiedarbība sākotnēji ir fizioloģiski līdzīga un sākas ar hitīna un tā oligomēru atpazīšanu, ko veic auga receptori, un sākotnēju augu aizsargmehānismu ierosināšanu (Lo Presti et al. 2015, Zeilinger et al. 2015). Patogēnas infekcijas laikā III klases peroksidāzes ir iesaistītas lignifikācijas, suberinizācijas, kā arī aktīvo skābekļa un slāpekļa formu izveidē un antimikrobiālo metabolītu sintēzes katalīzē (Almagro et al. 2009). Tādējādi infekcijas procesa laikā būtu sagaidāma peroksidāzes aktivitātes palielināšanās. Tā tas ir novērots pēc *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* rezistentu *Dianthus caryophyllus* apsāknotu spraudeņu apstrādes ar *Fusarium oxysporum*, savukārt uzņēmīgai *D. caryophyllus* izmaiņas gvajakola peroksidāzes aktivitātē nav novērotas (Ardila et al. 2014). Savukārt augu un endofītu asociāciju izveides laikā peroksidāzes aktivitātes izmaiņas līdz šim nav pētītas. Šajā pētījumā peroksidāzes aktivitāte ar *Calcarisporium arbuscula* inokulētu rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ vienpumpura spraudeņu lapās visa eksperimenta laikā bija būtiski augstāka nekā kontroles un ISS apstrādes varianta spraudeņiem. Savukārt rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ vienpumpura spraudeņiem peroksidāzes aktivitātes izmaiņas starp apstrādes variantiem būtiski neatšķirās. Šāda atšķirība, iespējams, saistāma ar rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ kā endofīta saimniekauga atšķirīgu fizioloģisko reakciju uz endofīta suspensiju. Savukārt rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ vienpumpura spraudeņu ātrā reakcija uz sēnes micēlija suspensiju, sēnes struktūru trūkums spraudeņa audos, kā arī veicinātā adventīvo sakņu attīstība un apsākņošanās liecina par aktīvu savienojumu klātbūtni sēnes suspensijā. Iespējams, tie ir sēnes proteīni vai augu hormoniem līdzīgi savienojumi.

Līdzīgi kā pēc abu rododendru šķirņu *in vitro* dzinumam inokulācijas ar *Calcarisporium arbuscula* un apsākņošanas *ex vitro* apstākļos, eksperimentos ar vienpumpura spraudeņiem izteiktāka sēnes ietekme vērojama uz rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ spraudeņiem. Salīdzinot ar kontroli, šīs rododendru šķirnes vienpumpura spraudeņiem vērojama ātrāka

saknes iniciāļu attīstībā un augstāks apsakņošanās procents. Savukārt uz rododendru šķirnes 'Babītes Lavanda' vienpumpura spraudņiem sēnei ir pozitīva ilgtermiņa ietekme, jo palielinās izdzīvojušo spraudņu procents.

Neraugoties uz *Mortierella* sp. pozitīvo ietekmi uz rododendru šķirnes 'Babītes Lavanda' *in vitro* pavairotu dzinumu apsakņošanās *ex vitro* un adventīvo sakņu aizmetņu attīstību vienpumpura spraudņiem ar lapu, tās ietekmē apsakņojušos un ilgtermiņā izdzīvojušo vienpumpura spraudņu procents bija zemāks nekā kontrolei. Līdz ar to var uzskatīt, ka no visiem pētītajiem endofītiem pozitīva ietekme un praktiskās pielietojamības potenciāls ir *Calcarisporium arbuscula*.

SECINĀJUMI

1. Mūžzaļo rododendru šķirnes 'Babītes Lavanda' trīsgadīgu augu saknes ir kolonizētas galvenokārt ar mikorizālām sēnēm, un kolonizācija ir robežās no 37% līdz 100%. Saknes kolonizē sterili sēņu micēliji, *Calcarisporium arbuscula* un *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cylindrocarpon*, *Mortierella*, *Penicillium* un *Trichoderma* ģinšu sēnes.
2. *In vitro* pavairotus mūžzaļo rododendru šķirņu 'Babītes Lavanda' un 'Nova Zembla' dzinumus veido epiderma, miza, vāji attīstīta lūksne, kambijs, koksne un serde, taču tiem nav attīstījušies mehāniskie audi. Nepārtrauktā gredzenā vadaudi izkārtoti 80% rododendru šķirnes 'Nova Zembla' un 50% rododendru šķirnes 'Babītes Lavanda' dzinumu. Pastāv statistiski būtiska atšķirība dzinumu anatomiskajā uzbūvē gan starp abām šķirnēm, gan katras šķirnes ietvaros.
3. *In vitro* pavairotiem mūžzaļo rododendru šķirnes 'Nova Zembla' dzinumiem *ex vitro* apsākšanās laikā raksturīga tiešā adventīvo sakņu attīstība no kambija – lūksnes rajonā esošām šūnām. Zema *in vitro* pavairotu dzinumu lūksnes : koksnes attiecība kavē adventīvo sakņu attīstību *ex vitro*.
4. Rododendru sakņu endofītiskajām sēnēm raksturīga atšķirīga ietekme uz dažādu mūžzaļo rododendru šķirņu *in vitro* pavairotiem un inokulētiem dzinumiem. *Acremonium* ģints sēnēm ir negatīva vai neitrāla ietekme uz rododendru dzinumiem *in vitro*, kas atkarīga gan no izmantotā endofīta izolāta, gan rododendru šķirnes. *Mortierella* sp. ir šķirnes specifiska ietekme uz rododendru dzinumiem un pigmentu koncentrāciju. *Calcarisporium arbuscula* veicina rododendru šķirnes 'Nova Zembla' meristemoīdu attīstību *in vitro* un pozitīvi ietekmē pigmentu koncentrāciju dzinumu lapās. Tai ir neitrāla ietekme uz rododendru šķirnes 'Babītes Lavanda' dzinumiem.
5. *Calcarisporium arbuscula* un *Mortierella* sp. veicina ātrāku *ex vitro* adventīvo sakņu attīstību *in vitro* inokulētiem mūžzaļo rododendru dzinumiem.
6. *Calcarisporium arbuscula* un *Mortierella* sp. atšķirīgi ietekmē mūžzaļo rododendru vienpumpura spraudeņu apsākšanos. *Mortierella* sp. veicina adventīvo sakņu anatomisko posmu ātrāku norisi rododendru šķirnes 'Babītes Lavanda' vienpumpura spraudeņos, taču apsākšanās procentu un spraudeņu dzīvotspēju ilgtermiņā tā ietekmē negatīvi. *Calcarisporium arbuscula* kavē adventīvo sakņu anatomisko posmu norisi rododendru šķirnes 'Babītes Lavanda' vienpumpura spraudeņos un samazina apsākšanās procentu, taču tai ir pozitīva ietekme uz spraudeņu dzīvotspēju ilgtermiņā. *Calcarisporium arbuscula*

veicina ātrāku adventīvo sakņu anatomisko posmu norisi rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ vienpumpura spraudeņos un palielina apsākņošanās procentu.

7. Mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ vienpumpura spraudeņu inokulācija ar *Mortierella* sp. un *Calcarisporium arbuscula* būtiski neietekmē gvajakola peroksidāzes aktivitāti spraudeņu lapās adventīvo sakņu attīstības laikā, savukārt mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ vienpumpura spraudeņu inokulācija ar *Calcarisporium arbuscula* būtiski palielina gvajakola peroksidāzes aktivitāti spraudeņu lapās.
8. *Calcarisporium arbuscula* veicina adventīvo sakņu attīstību *in vitro* pavairotos mūžzaļo rododendru dzinumos *ex vitro* un vienpumpura spraudeņos, kā arī šim endofītam nav vērojama negatīva ietekme uz augiem, tāpēc šai sēnei ir potenciāls tikt izmantotai rododendru pavairošanā ar spraudeņiem.

AIZSTĀVĒŠANAI IZVIRZĪTĀS TĒZES

1. Mūžzaļo rododendru saknes kolonizē gan mikorizālās, gan endofītiskās sēnes.
2. *In vitro* pavairotu mūžzaļo rododendru dzinumu anatomiskās uzbūves īpatnības ietekmē dzinumu apsākņošanas *ex vitro* apstākļos.
3. Endofītisko sēņu izmantošana augu audu kultūrā ietekmē mūžzaļo rododendru dzinumus un to tālāko apsākņošanas *ex vitro* apstākļos.
4. Endofītiskās sēnes ir iespējams izmantot mūžzaļo rododendru pavairošanā ar vienpumpura spraudņiem ar lapu, un to pielietošana ietekmē adventīvo sakņu attīstību.

PATEICĪBAS

Es vēlos izteikt lielu pateicību mana promocijas darba vadītājam *Dr. biol.*, asoc. prof. Uldim Kondratovičam par ilggadējo sadarbību, atbalstu un ieguldīto laiku un enerģiju.

Liels un sirsnīgs paldies darba konsultantei un draugam *Dr. biol.*, pētn. Dacei Megrei par laiku, enerģiju, atbalstu un daudzajām vērtīgajām diskusijām, kas ļāva paskatīties uz lietām no cita skatu punkta. Īpašs paldies *Dr. habil. biol.*, prof. Ģedertam Ieviņam par vērtīgiem komentāriem, ieteikumiem, diskusijām un plašo zināšanu bāzi augu fizioloģijā. Paldies *Dr. biol.*, vad. pētn. Signei Tomsonei par konsultācijām ar audu kultūrām saistītajos jautājumos.

Izsaku lielu pateicību arī saviem studentiem *MSc. biol.* Madarai Lazdānei, *MSc. biol.* Leldei Stirnai un *MSc. biol.* Kārlim Dūmiņam, kuri lielā mērā piedalījās šī darba praktiskās daļas izpildē. Paldies *Dr. biol.*, vad. pētn. Leldei Grantiņai-Ieviņai un *Dr. biol.*, asoc. prof. Vizmai Nikolajevai un Latvijas Mikroorganismu kultūru kolekcijas kolēģiem par endofītu identificēšanu. Paldies *Dr. med.*, pētn. Ilvai Trapiņai par konsultācijām ar datu apstrādi saistītajos jautājumos. Paldies LU Botāniskā dārza Augu fizioloģijas laboratorijas un LU Rododendru selekcijas un izmēģinājumu audzētavas „Babīte” kolēģiem par eksperimentos izmantoto augu materiālu.

Liels paldies *Dr. biol.*, pētn. Dainai Rozei par par morālo atbalstu, iedrošināšanu un labiem vārdiem. Paldies maniem kolēģiem no Latvijas Universitātes Bioloģijas fakultātes Augu fizioloģijas katedras un Latvijas Universitātes Bioloģijas institūta Genomikas un bioinformātikas laboratorijas par vērtīgiem padomiem un līdzī jušanu darba tapšanas laikā.

Vislielāko pateicību vēlos izteikt saviem vecākiem par atbalstu, palīdzību, pacietību un labiem vārdiem visā manā garajā izglītības ceļā.

Darbs izstrādāts ar Eiropas Sociālā fonda projekta „Atbalsts doktora studijām Latvijas Universitātē ” Nr.2009/0138/ 1DP/1.1.2.1.2./ 09/IPIA/ VIAA/004 atbalstu.

LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Ahemad M., Kibret M. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *J. King Saud Univ.-Sci.* 26: 1-20.
2. Aimé S., Alabouvette C., Steinberg C., Olivain C. 2013. The endophytic strain *Fusarium oxysporum* Fo47: a good candidate for priming the defense responses in tomato roots. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 26: 918-926.
3. Akello J., Dubois T., Gold C. S., Coyne D., Nakavuma J., Paparu P. 2007. *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin as an endophyte in tissue culture banana (*Musa* spp.). *J. Invertebr. Pathol.* 96: 34-42.
4. Almagro L., Gómez Ros L. V., Belchi-Navarro S., Bru R., Ros Barceló A., Pedreno M. A. 2008. Class III peroxidases in plant defence reactions. *J. Exp. Bot.* 60: 377-390.
5. Almeida R., Gonçalves S., Romano A. 2005. *In vitro* micropropagation of endangered *Rhododendron ponticum* L. subsp. *baeticum* (Boissier & Reuter) Handel-Mazzetti. *Biodiv. & Conserv.* 14: 1059-1069.
6. Altamura M. M. 1996. Root histogenesis in herbaceous and woody explants cultured *in vitro*. A critical review. *Agronom.* 16: 589-602.
7. Aly A. H., Debbab A., Proksch P. 2011. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90: 1829-1845.
8. Amisah J. N., Paolillo D. J., Bassuk N. 2008. Adventitious root formation in stem cuttings of *Quercus bicolor* and *Quercus macrocarpa* and its relationship to stem anatomy. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 133: 479-486.
9. Amri E., Lyaruu H. V. M., Nyomora A. S., Kanyeka Z. L. 2010. Vegetative propagation of African Blackwood (*Dalbergia melanoxylon* Guill. & Perr.): effects of age of donor plant, IBA treatment and cutting position on rooting ability of stem cuttings. *New For.* 39: 183-194.
10. Anderson W. C. 1984. A revised tissue culture medium for shoot multiplication of rhododendron. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 109: 343-347.
11. Andersone U., Ievinsh G. 2002. Changes of morphogenic competence in mature *Pinus sylvestris* L. buds *in vitro*. *Ann. Bot.* 90: 293-298.
12. Anith K. N., Aswini S., Varkey S., Radhakrishnan N. V., Nair D. S. 2018. Root colonization by the endophytic fungus *Piriformospora indica* improves growth, yield and piperine content in black pepper (*Piper nigrum* L.). *Biocat. Agricult. Biotechnol.* 14: 215-220.

13. Anith K. N., Faseela K. M., Archana P. A., Prathapan K. D. 2011. Compatibility of *Piriformospora indica* and *Trichoderma harzianum* as dual inoculants in black pepper (*Piper nigrum* L.). *Symb.* 55: 11-17.
14. Aoun M., Rioux D., Simard M., Bernier L. 2009. Fungal colonization and host defense reactions in *Ulmus americana* callus cultures inoculated with *Ophiostoma novo-ulmi*. *Phytopathol.* 99: 642-650.
15. Apter R. C., McWilliams E. L., Davies F. T. 1993. *In vitro* and *ex vitro* adventitious root formation in Asian jasmine (*Trachelospermum asiaticum*) I. Comparative morphology. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 118: 902-905.
16. Arena M. E., Pastur G. M., Benavides M. P., Zappacosta D., Eliasco E., Curvetto N. 2003. Peroxidase and polyamine activity variation during the *in vitro* rooting of *Berberis buxifolia*. *New Zeal. J. Bot.* 41: 475-485.
17. Ardila H. D., Torres A. M., Martínez S. T., Higuera B. L. 2014. Biochemical and molecular evidence for the role of class III peroxidases in the resistance of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) to *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Physiol. Mol. Plant Path.* 85: 42-52.
18. Arnold A. E. 2007. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biol. Rev.* 21: 51-66.
19. Bacon C. W., Hill N. S. 1996. Symptomless grass endophytes: products of coevolutionary symbioses and their role in the ecological adaptations of grasses. In Redlin S. C., Carris L. M. (eds), *Endophytic fungi in grasses and woody plants*. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN. p. 155-178.
20. Bae H., Sicher R. C., Kim M. S., Kim S.-H., Strem M. D., Melnick R. L., Bailey B.A. 2009. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *J. Exp. Bot.* 60: 3279-3295.
21. Ballester A., San-José M. C., Vidal N., Fernández-Lorenzo J. L., Vieitez A. M. 1999. Anatomical and biochemical events during *in vitro* rooting of microcuttings from juvenile and mature phases of chestnut. *Ann. Bot.* 83: 619-629.
22. Baltruschat H., Fodor J., Harrach B. D., Niemczyk E., Barna B., Gullner G., Janeczko A., Kogel K.-H., Schaefer 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 Phytol.* 180: 501-510.

23. Beck C. B. 2005. *An introduction to plant structure and development: plant anatomy for the twenty-first century*. Cambridge University Press, Cambridge. 464 p.
24. Berg G., Rybakova D., Grube M., Köberl M. 2015. The plant microbiome explored: implications for experimental botany. *J. Exp. Bot.* 67: 995-1002.
25. Bhattacharyya D. 2011. Rhododendron species and their uses with special reference to Himalayas—a review. *Assam Univ. J. Sci. Techn.* 7: 161-167.
26. Bills G. F., Christensen M., Powell M., Thorn G. 2004. Saprobiic soil fungi. In: Mueller G. M., Bills G. F., Foster M. S. (eds) *Biodiversity of Fungi Inventory and Monitoring Methods*, Elsevier Academic Press, Burlington. pp. 271-302.
27. Bisbis B., Kevers C., Crèvecoeur M., Dommes J., Gaspar T. 2003. Restart of lignification in micropropagated walnut shoots coincides with rooting induction. *Biol. Plant.* 47: 1-5.
28. Bizabani C., Dames J. 2015. Effects of inoculating *Lachnum* and *Cadophora* isolates on the growth of *Vaccinium corymbosum*. *Microbiol. Res.* 181: 68-74.
29. Brader G., Compant S., Vescio K., Mitter B., Trognitz F., Ma L. J., Sessitsch A. 2017. Ecology and genomic insights into plant-pathogenic and plant-nonpathogenic endophytes. *Ann. Rev. Phytopathol.* 55: 61-83.
30. Braune W., Leman A., Taubert H. 1999. *Pflanzenanatomisches Praktikum I*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin. 368 S.
31. Caboni E., Tonelli M. G., Lauri P., Iacovacci P., Kevers C., Damiano C., Gaspar T. 1997. Biochemical aspects of almond microcuttings related to *in vitro* rooting ability. *Biol. Plant.* 39: 91-97.
32. Carroll G. 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecol.* 69: 2-9.
33. Chamberlain D.F., Hyam R., Argent G., Fairweather G., Walter K.S. 1996. *The genus Rhododendron: its classification and synonymy*. Royal Botanic Garden Edinburgh, Edinburgh. 181 p.
34. Contreras-Cornejo H. A., Macías-Rodríguez L., del-Val E., Larsen J. 2016. Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92: fiw036.
35. Cosio C., Dunand C. 2009. Specific functions of individual class III peroxidase genes. *J. Exp. Bot.* 60: 391-408.
36. Cullen J. 2005. *Hardy Rhododendron Species: A Guide to Identification*. Edinburgh: Timber Press, 496 p.

37. Da Costa C. T., De Almeida M. R., Ruedell C. M., Schwambach J., Maraschin F. D. S., Fett-Neto A. G. 2013. When stress and development go hand in hand: main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings. *Front. Plant Sci.* 4: 133.
38. Dalpé Y. 1986. Axenic synthesis of ericoid mycorrhiza in *Vaccinium angustifolium* Ait. by *Oidiodendron* species. *New Phytol.* 103: 391-396.
39. Davies P. J. 2004. *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 750 pp.
40. Davis T. D., Potter J. R. 1987. Physiological response of rhododendron cuttings to different light levels during rooting. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 112: 256-259.
41. De Bary A. 1866. *Morphologie un Physiologie der Pilze, Flechten, und Myxomyceten. Hofmeister's Handbook of Physiological Botany. Vol 2.* Leipzig. 316 S.
42. De Klerk G.-J. 1996. Markers of adventitious root formation. *Agron.* 16: 609-616.
43. De Klerk G.-J. 2002. Rooting of microcuttings: theory and practice. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 38: 415-422.
44. De Klerk G.-J., van der Krieken W., de Jong J. C. 1999. Review the formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 35(3), 189-199.
45. Deshmukh S., Hüchelhoven R., Schäfer P., Imani J., Sharma M., Weiss M., Waller F., Kogel K. H. 2006. The root endophytic fungus *Piriformospora indica* requires host cell death for proliferation during mutualistic symbiosis with barley. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 103: 18450-18457.
46. Dias M. P., Bastos M. S., Xavier V. B., Cassel E., Astarita L. V., Santarém E. R. 2017. Plant growth and resistance promoted by *Streptomyces* spp. in tomato. *Plant Physiol. Biochem.* 118: 479-493.
47. Domokos E., Jakab-Farkas L., Darkó B., Bíró-Janka B., Mara G., Albert C., Balog A. 2018. Increase in *Artemisia annua* plant biomass, artemisinin content and guaiacol peroxidase activity using the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. *Front. Plant Sci.* 9: 478.
48. Donnelly D. J., Vidaver W. E., Lee K. Y. 1985. The anatomy of tissue cultured red raspberry prior to and after transfer to soil. *Plant Cell Tis. Org. Cult.* 4: 43-50.
49. Druege U., Baltruschat H., Franken P. 2007. *Piriformospora indica* promotes adventitious root formation in cuttings. *Sci. Hort.* 112: 422-426.
50. Druege U., Franken P., Hajirezaei M. R. 2016. Plant hormone homeostasis, signalling, and function during adventitious root formation in cuttings. *Front. Plant Sci.* 7: 381.

51. Druege U., Hilo A., Pérez-Pérez J. M., Klopotek Y., Acosta M., Shahinnia F., Zerche S., Franken P., Hajirezaei M. R. 2019. Molecular and physiological control of adventitious rooting in cuttings: phytohormone action meets resource allocation. *Ann. Bot.*
52. Eeckhaut T., Janssens K., De Keyser E., De Riek J. 2010. Micropropagation of rhododendron. In *Protocols for in vitro propagation of ornamental plants*. Humana Press. pp. 141-152.
53. El-Deeb H. M., Arab Y. A. 2013. *Acremonium* as an endophytic bioagent against date palm *Fusarium* wilt. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* 46: 1214-1221.
54. Elmongy M. S., Cao Y., Zhou H., Xia Y. 2018a. Root development enhanced by using indole-3-butyric acid and naphthalene acetic acid and associated biochemical changes of *in vitro* azalea microshoots. *J. Plant Growth Reg.* 37: 813-825.
55. Elmongy M. S., Zhou H., Cao Y., Liu B., Xia Y. 2018b. The effect of humic acid on endogenous hormone levels and antioxidant enzyme activity during *in vitro* rooting of evergreen azalea. *Sci. Hort.* 227: 234-243.
56. Eram D., Arthikala M. K., Melappa G., Santoyo G. 2018. *Alternaria* species: endophytic fungi as alternative sources of bioactive compounds. *Ital. J. Mycol.* 47: 40-54.
57. Evert R. F. 2006. *Esau's Plant Anatomy 3rd edition*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 601 p.
58. Fahn A. 1990. *Plant Anatomy*. 4th ed. Pergamon Press, Oxford. 588 p.
59. Ferus P., Konôpková J., Bošiaková D., Hořka P. 2017. Effective rhododendron propagation through stem cuttings. *J. App. Hort.* 19: 226-229.
60. Fleurat-Lessard P., Béré E., Lallemand M., Dédaldéchamp F., Roblin G. 2016. Co-occurrence of tannin and tannin-less vacuoles in sensitive plants. *Protoplasma* 253: 821-834.
61. Gaspar T., Kevers C., Hausman J. F., Ripetti V. 1994. Peroxidase activity and endogenous free auxin during adventitious root formation. In *Physiology, Growth and Development of plants in Culture*. Springer, Dordrecht. pp. 289-298.
62. Gaspar T., Penel C., Greppin H. 1997. Do rooting induction and flowering evocation involve a similar interplay between indoleacetic acid, putrescine and peroxidases? In Greppin H., Penel C., Simon P. (eds) *Traveling Shot on Plant Development*. University of Geneva, Geneva. pp. 35-49.
63. Gertner D., Tomsone S. 1996. Induction of morphogenesis of various *Rhododendron* L. taxa flower buds *in vitro*. *Proc. Latv. Acad. Sci. Sec. B* 50: 345-319.

64. Goetsch L., Eckert A. J., Hall B. D. 2005. The molecular systematics of *Rhododendron* (Ericaceae): a phylogeny based upon *RPB2* gene sequences. *System. Bot.* 30: 616-626.
65. Gonçalves J. C., Diogo G., Amâncio S. 1998. *In vitro* propagation of chestnut (*Castanea sativa* × *C. crenata*): Effects of rooting treatments on plant survival, peroxidase activity and anatomical changes during adventitious root formation. *Sci. Hort.* 72: 265-275.
66. Grönroos A., von Arnold S. 1985. Initiation and development of wound tissue and roots on hypocotyl cuttings of *Pinus sylvestris* *in vitro*. *Physiol. Plant.* 64: 393-401.
67. Grunewaldt-Stöcker G., von Alten H. 2016. Is the root-colonizing endophyte *Acremonium strictum* an ericoid mycorrhizal fungus? *Mycorrh.* 26: 429-440.
68. Gunduz A., Durmus I., Turedi S., Nuhoglu I., Ozturk S. 2007. Mad honey poisoning-related asystole. *Emerg. Med. J.* 24: 592-593.
69. Guo J., McCulley R. L., McNear Jr D. H. 2015. Tall fescue cultivar and fungal endophyte combinations influence plant growth and root exudate composition. *Front. Plant Sci.* 6: 183.
70. Halarewicz A., Płaskowska E., Sokół-Łętowska A., Kucharska A. 2013. The effect of *Monilinia seaveri* (Rehm) Honey infection on the condensed tannins content in the leaves of *Prunus serotina* Ehrh. *Acta Scient. Pol. Hort. Cult.* 12: 95-106.
71. Halmschlager E., Kowalski T. 2004. The mycobiota in nonmycorrhizal roots of healthy and declining oaks. *Can. J. Bot.* 82: 1446-1458.
72. Hamann A. 1998. Adventitious root formation in cuttings of loblolly pine (*Pinus taeda* L.): developmental sequence and effects of maturation. *Trees.* 12: 175-180.
73. Harbage J. F., Stimart D. P., Evert R. F. 1993. Anatomy of Adventitious Root Formation in Microcuttings of *Malus domestica* Borkh. 'Gala'. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 118: 680-688.
74. 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. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 79: 293-320.
75. Harmaja H. 1991. Taxonomic notes on *Rhododendron* subsection *Ledum* (*Ledum*, Ericaceae), with a key to its species. In *Annales Botanici Fennici*. The Finnish Botanical Publishing Board. pp. 171-173.
76. Hartmann H. T., Kester D. E., Davies F. T., Geneve R. L. 2014. *Hartmann & Kester's Plant Propagation: Principles and Practices 8th ed.* Harlow – Pearson Education Limited, 922 p.

77. Hatzilazarou S. P., Syros T. D., Yupsanis T. A., Bosabalidis A. M., Economou A. S. 2006. Peroxidases, lignin and anatomy during *in vitro* and *ex vitro* rooting of gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) microshoots. *J. Plant Physiol.* 163: 827-836.
78. Hayman D. S. 1970. Endogone spore numbers in soil and vesicular-arbuscular mycorrhiza in wheat as influenced by season and soil treatment. *Transact. Brit. Mycol. Soc.* 54: 53-63.
79. Hilaire R. S., Berwart C. A. F., Pérez-Muñoz C. A. 1996. Adventitious root formation and development in cuttings of *Mussaenda erythrophylla* L. Schum. & Thonn. *Hort. Sci.* 31: 1023-1025.
80. Hirsch G., Braun U. 1992. Communities of parasitic microfungi. In Winterhoff W. (ed) *Fungi in vegetation science*, Kluwer Academics, Dordrecht, Netherlands. pp. 225-250.
81. Holt T. A., Maynard B. K., Johnson W. A. 1998. Low pH enhances rooting of stem cuttings of rhododendron in subirrigation. *J. Environm. Hort.* 16: 4-7.
82. Husen A. 2008. Clonal propagation of *Dalbergia sissoo* Roxb. and associated metabolic changes during adventitious root primordium development. *New For.* 36: 13-27.
83. Ilczuk A., Jacygrad E. 2016. The effect of IBA on anatomical changes and antioxidant enzyme activity during the *in vitro* rooting of smoke tree (*Cotinus coggygria* Scop.). *Sci. Hort.* 210: 268-276.
84. Iliev I., Kitin P., Funada R. 2001. Morphological and anatomical study on *in vitro* root formation of silver birch (*Betula pendula* Roth.). *Prop. Orn. Plants* 1: 10-19.
85. Immanen J., Nieminen K., Smolander O. P., Kojima M., Serra J. A., Koskinen P., Zhang J., Elo A., Mähönen A. P., Street N., Bhalerao R. P., Paulin L., Auvinen A., Sakakibara H., Helariutta Y. 2016. Cytokinin and auxin display distinct but interconnected distribution and signaling profiles to stimulate cambial activity. *Curr. Biol.* 26: 1990-1997.
86. Jaber L. R., Vidal S. 2009. Interactions between an endophytic fungus, aphids and extrafloral nectaries: do endophytes induce extrafloral-mediated defences in *Vicia faba*? *Funct. Ecol.* 23: 707-714.
87. Jansa J., Vosátka M. 2000. *In vitro* and *post vitro* inoculation of micropropagated Rhododendrons with ericoid mycorrhizal fungi. *App. Soil Ecol.* 15: 125-136.
88. Jermuntiea W., Aki T., Kawamoto S., Ono K. 2011. Metabolism and synthesis of lipids in the polyunsaturated fatty acid-producing fungus *Mortierella alliacea*. *J. Oleo Sci.* 60: 11-17.
89. Ji L. L., Song Y. C., Tan R. X. 2004. A potent feed preservative candidate produced by *Calcarisporium* sp., an endophyte residing in stargrass (*Cynodon dactylon*). *J. App. Microbiol.* 96: 352-358.

90. Kevers C., Hausman J. F., Faivre-Rampant O., Evers D., Gaspar T. 1997. Hormonal control of adventitious rooting: progress and questions. *J. App. Bot.* 71: 71-79.
91. Khare E., Mishra J., Arora N. K. 2018. Multifaceted interactions between endophytes and plant: Developments and Prospects. *Front. Microbiol.* 9.
92. Kondratovičs R. 2005. *Rododendri un to selekcija Latvijā*. LU Akadēmiskais apgāds, Rīga. 102 lpp.
93. Kondratovičs R., Kondratovičs U. 2002. „*Rododendru avīze*”, AS „Preses nams”, 14 lpp.
94. Kondratovičs R., Riekstiņa G., Kondratovičs U. 2010. *Rododendri, LU Rododendru selekcijas un izmēģinājumu audzētavai „Babīte” – 30*. LU Akadēmiskais apgāds, Rīga. 103 lpp.
95. Kondratovičs U., Megre D. 1999. Anatomische Eigenarten der Adventivwurzel Bildung von Rhododendronstecklingen während der Bewurzelung. *Rhododendron und immergrüne Laubgehölze, Jahrbuch*: 72-85.
96. Kose C., Erdal S., Kaya O., Atici O. 2011. Comparative evaluation of oxidative enzyme activities during adventitious rooting in the cuttings of grapevine rootstocks. *J. Sci. Food Agricult.* 91: 738-741.
97. Kwasna H., Szewczyk W. 2016. Effects of fungi isolated from *Quercus robur* roots on growth of oak seedlings. *Dendrobiol.* 75: 99-112.
98. Lacercat-Didier L., Berthelot C., Foulon J., Errard A., Martino E., Chalot M., Blaudez D. 2016. New mutualistic fungal endophytes isolated from poplar roots display high metal tolerance. *Mycorrh.* 26: 657-671.
99. Leite C., Pereira H. 2017. Cork-containing barks – a review. *Front. Mater.* 3: 63.
100. Leopold D. R. 2016. Ericoid fungal diversity: challenges and opportunities for mycorrhizal research. *Fungal Ecol.* 24: 114-123.
101. Leroux O. 2012. Collenchyma: a versatile mechanical tissue with dynamic cell walls. *Ann. Bot.* 110: 1083-1098.
102. Li S. W., Xue L., Xu S., Feng H., An L. 2009. IBA-induced changes in antioxidant enzymes during adventitious rooting in mung bean seedlings: the role of H₂O₂. *Env. Exp. Bot.* 66: 442-450.
103. Lichtenthaler H.K. 1987. [34] Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Meth. Enzymol.* 148: 350-382.
104. Lo Presti L., Lanver D., Schweizer G., Tanaka S., Liang L., Tollot M., Zuccaro A., Reissmann S., Kahmann R. 2015. Fungal effectors and plant susceptibility. *Ann. Rev. Plant Biol.* 66: 513-545.

105. Ludwig-Müller J. 2003. Peroxidase isoenzymes as markers for the rooting ability of easy-to-root and difficult-to-root *Grevillea* species and cultivars of *Protea obtusifolia* (Proteaceae). *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 39: 377-383.
106. Luo J., Walsh E., Miller S., Blystone D., Dighton J., Zhang N. 2017. Root endophytic fungal communities associated with pitch pine, switchgrass, and rosette grass in the pine barrens ecosystem. *Fungal Biol.* 121: 478-487.
107. Macedo E., Vieira C., Carrizo D., Porfirio S., Hegewald H., Arnholdt-Schmitt B., Calado M. L., Peixe A. 2013. Adventitious root formation in olive (*Olea europaea* L.) microshoots: anatomical evaluation and associated biochemical changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities. *J. Hort. Sci. Biotechn.* 88: 53-59.
108. Mao X. M., Xu W., Li D., Yin W. B., Chooi Y. H., Li Y. Q., Tang Y., Hu Y. 2015. Epigenetic genome mining of an endophytic fungus leads to the pleiotropic biosynthesis of natural products. *Ang. Chem. Int. Ed.* 54: 7592-7596.
109. Martins F., Pereira J. A., Bota P., Bento A., Baptista P. 2016. Fungal endophyte communities in above-and belowground olive tree organs and the effect of season and geographic location on their structures. *Fungal Ecol.* 20: 193-201.
110. Mayerhofer M. S., Kernaghan G., Harper K. A. 2012. The effects of fungal root endophytes on plant growth: a meta-analysis. *Mycorrh.* 23: 119-128.
111. McMillan Browse F. 1983. *Plant propagation. Seeds, roots, bulbs and corms, layering, stem cuttings, leaf cuttings, budding and grafting.* Mitchell Beasley, London. 96 p.
112. Megre D. 2011. *Anatomiskās un fizioloģiskās izmaiņas mūžzaļajos rododendros to veģetatīvās pavairošanas laikā.* Promocijas darbs. Latvijas Universitāte, Rīga. 98 lpp.
113. Megre D., Dokane K., Kondratovics U. 2011. Can changes in starch content and peroxidase activity be used as rooting phase markers for rhododendron leaf bud cuttings? *Acta Biol. Cracov. S. Bot.* 53: 74-79.
114. Merev N., Yavuz H. 2000. Ecological wood anatomy of Turkish *Rhododendron* L.(*Ericaceae*). Intraspecific variation. *Turk. J. Bot.* 24: 227-238.
115. Metaxas D. J., Syros T. D., Yupsanis T., Economou A. S. 2004. Peroxidases during adventitious rooting in cuttings of *Arbutus unedo* and *Taxus baccata* as affected by plant genotype and growth regulator treatment. *Plant Growth Reg.* 44: 257-266.
116. Millán-Orozco L., Corredoira E., San-José M. C. 2011. *In vitro* rhizogenesis: histoanatomy of *Cedrela odorata* (*Meliaceae*) microcuttings. *Int. J. Trop. Biol.* 59: 447-453.

117. Min Y. J., Park M. S., Fong J. J., Quan Y., Jung S., Lim Y. W. 2014. Diversity and saline resistance of endophytic fungi associated with *Pinus thunbergii* in coastal shelterbelts of Korea. *J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 324-333.
118. Monreal M., Berch S. M., Berbee M., 1999. Molecular diversity of ericoid mycorrhizal fungi. *Can. J. Bot.* 77: 1580-1594.
119. Moreno J., León J. D., Osorio N. W. 2016. Tree seedling growth promotion by dual inoculation with *Rhizoglyphus fasciculatum* (Thaxt.) Sieverding, Silva & Oehl and *Mortierella* sp., rhizosphere fungi for reforestation purposes, to promote plant P uptake and growth at the nursery state. *Acta Agronom.* 65: 239-247.
120. Mostert L., Crous P. W., Petrini O. 2000. Endophytic fungi associated with shoots and leaves of *Vitis vinifera*, with specific reference to the *Phomopsis viticola* complex. *Sydowia* 52: 46-58.
121. Mucciarelli M., Scannerini S., Berteà C., Maffei M. 2003. *In vitro* and *in vivo* peppermint (*Mentha piperita*) growth promotion by nonmycorrhizal fungal colonization. *New Phytol.* 158: 579-591.
122. Naija S., Elloumi N., Jbir N., Ammar S., Kevers C. 2008. Anatomical and biochemical changes during adventitious rooting of apple rootstocks MM 106 cultured *in vitro*. *CR Biol.* 331: 518-525.
123. Nawrocka-Grzeskowiak U. 2004. Effect of growth substances on the rooting of cuttings of rhododendron species. *Folia Hort.* 16: 115-123.
124. Nawrocka-Grzeskowiak U., Grzeskowiak W. 2003. Rooting of azalea shoot cuttings depending on the degree of lignification. *Dendrobiol.* 49: 53-59.
125. Newman M. A., Sundelin T., Nielsen J. T., Erbs G. 2013. MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Front. Plant Sci.* 4: 139.
126. Oliveira H., Sousa A., Alves A., Nogueira A. J., Santos C. 2012. Inoculation with *Ophiostoma novo-ulmi* subsp. *americana* affects photosynthesis, nutrition and oxidative stress in *in vitro* *Ulmus minor* plants. *Env. Exp. Bot.* 77: 146-155.
127. Osselton M. D., Baum H., Beechey R. B. 1974. Isolation, purification and characterization of aurovertin B. *Biochem. Soc. Transact.* 2: 200-202.
128. Osterc G. 2009. A change in perspective: Stock plant qualities that influence adventitious root formation in woody species. In Niemi K., Scagel C. (eds) *Adventitious Root Formation of Forest Trees and Horticultural Plants – from Genes to Applications*. Kerala:Research Signpost. pp 175-186.

129. Ozimek E., Jaroszuk-Ścisiel J., Bohacz J., Kornilowicz-Kowalska T., Tyśkiewicz R., Słomka A., Nowak A., Hanaka A. 2018. Synthesis of indoleacetic acid, gibberellic acid and ACC-deaminase by *Mortierella* strains promote winter wheat seedlings growth under different conditions. *Int. J. Mol. Sci.* 19: 3218.
130. Parsa S., Ortiz V., Vega F. E. 2013. Establishing fungal entomopathogens as endophytes: towards endophytic biological control. *J. Vis. Exp.* 74: 50360.
131. Partida-Martinez L. P. P., Heil M. 2011. The microbe-free plant: fact or artifact? *Front. Plant Sci.* 2: 100.
132. Passardi F., Longet D., Penel C., Dunand C. 2004. The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. *Phytochem.* 65: 1879-1893.
133. Paunescu A. 2008. *In vitro* and *in vivo* variability of histological traits of *Dianthus callizonus* (Caryophyllaceae) aerial vegetative organs. *Phytol. Balc.* 14: 417-423.
134. Petrini O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. In Andrews J. H., Hirano S. S. (eds), *Microbial ecology of leaves*. Springer-Verlag, New York, NY. pp 179-197.
135. Pinto C., Rodrigues L. S., Azevedo J. L., Pereira J. O., Carneiro Vieira M. L., Labate C. A. 2000. Symptomless infection of banana and maize by endophytic fungi impairs photosynthetic efficiency. *New Phytol.* 147: 609-615.
136. Plett J. M., Martin F. M. 2018. Know your enemy, embrace your friend: using omics to understand how plants respond differently to pathogenic and mutualistic microorganisms. *Plant J.* 93: 729-746.
137. Popescu R., Kopp B. 2013. The genus *Rhododendron*: an ethnopharmacological and toxicological review. *J. Ethnopharmacol.* 147: 42-62.
138. Purmale L., Apine I., Nikolajewa V., Grantina L., Verkley G., Tomsone S. 2012. Endophytic fungi in evergreen rhododendron cultivated *in vitro* and *in vivo*. *Env. Exp. Biol.* 10: 1-7.
139. Qaddoury A., Amssa M. 2004. Effect of exogenous indole butyric acid on root formation and peroxidase and indole-3-acetic acid oxidase activities and phenolic contents in date Palm offshoots. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45.
140. Racedo J., Salazar S. M., Castagnaro A. P., Ricci J. D. 2013. A strawberry disease caused by *Acremonium strictum*. *Europ. J. Plant Pathol.* 137: 649-654.
141. Rao H. Y., Rakshith D., Harini B. P., Satish S. 2017. Antimicrobial profiling and molecular identification of *Alternaria arborescens* CLB12, a myco-endosymbiont inhabiting *Combretum latifolium* Blume. *J. Biol. Active Prod. Nat.* 7: 1-9.

142. Ravel C., Courty C., Coudret A., Charmet G. 1997. Beneficial effects of *Neotyphodium lolii* on the growth and the water status in perennial ryegrass cultivated under nitrogen deficiency or drought stress. *Agron.* 17: 173-181
143. Read D. J. 1974. *Pezizella ericae* sp. nov., the perfect state of a typical mycorrhizal endophyte of Ericaceae. *Transact. Brit. Mycol. Soc.* 63: 381-383.
144. Read D. J. 1996. The structure and function of the ericoid mycorrhizal root. *Ann. Bot.* 77: 365-374.
145. Ren L. L., Liu Y. J., Liu H. J., Qian T. T., Qi L. W., Wang X. R., Zeng Q. Y. 2014. Subcellular relocalization and positive selection play key roles in the retention of duplicate genes of *Populus* class III peroxidase family. *Plant Cell* 26: 2404-2419.
146. Ricci A., Rolli E., Brunoni F., Dramis L., Sacco E., Fattorini L., Ruffoni B., Díaz-Sala, C., Altamura M. M. 2016. 1,3-di(benzo[d]oxazol-5-yl)urea acts as either adventitious rooting adjuvant or xylogenesis enhancer in carob and pine microcuttings depending on the presence/absence of exogenous indole-3-butyric acid. *Plant Cell Tis. Organ Cult.* 126: 411-427.
147. Ridout M., Houbraken J., Newcombe G. 2017. Xerotolerance of *Penicillium* and *Phialocephala* fungi, dominant taxa of fine lateral roots of woody plants in the intermountain Pacific Northwest, USA. *Rhizosph.* 4: 94-103.
148. Rival A., Bernard F., Mathieu Y. 1997. Changes in peroxidase activity during *in vitro* rooting of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Sci. Hort.* 71: 103-112.
149. Robinson J., Britto S. J., Senthilkumar S. 2009. Comparative anatomical studies on *Emilia zeylanica* c. B. Clarke with *in vitro* regenerated plants. *Middle-East J. Sci. Res.* 4: 140-143.
150. Rodriguez R. J., White Jr J. F., Arnold A. E., Redman A. R. A. 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytol.* 182: 314-330.
151. Ropars J., de La Vega R. R., López-Villavicencio M., Gouzy J., Dupont J., Swennen D., Dumas E., Giraud T., Branca A. 2016. Diversity and mechanisms of genomic adaptation in *Penicillium*. In DeVries R. G., Andersen M. R (eds) *Aspergillus and Penicillium in the Post-Genomic Era.* pp 27-42.
152. Rozpądek P., Wężowicz K., Nosek M., Ważny R., Tokarz K., Lembicz M., Miszalski Z., Turnau K. 2015. The fungal endophyte *Epichloë typhina* improves photosynthesis efficiency of its host orchard grass (*Dactylis glomerata*). *Planta* 242: 1025-1035.
153. Ruzin S.E. 1999. *Plant Microtechnique and Microscopy.* Oxford University Press, New York. 322 p.

154. Sahay N. S., Varma A. 1999. *Piriformospora indica*: a new biological hardening tool for micropropagated plants. *FEMS Microbiol. Lett.* 181: 297-302.
155. San-José M. C., Romero L., Janeiro L. V. 2012. Effect of indole-3-butyric acid on root formation in *Alnus glutinosa* microcuttings. *Silva Fennica* 46: 643-654.
156. San-José M. C., Vidal N., Ballester A. 1992. Anatomical and biochemical changes during root formation in oak and apple shoots cultured *in vitro*. *Agron.* 12: 767-774.
157. Sánchez Márquez S., Bills G. F., Herrero N., Zabalgogezcoa Í. 2012. Non-systemic fungal endophytes of grasses. *Fungal Ecol.* 5: 289-297.
158. Schulz B., Boyle C. 2005. The endophytic continuum. *Mycol. Res.* 109: 661-686.
159. Scagel C. F. 2005. Isolate-specific rooting responses of *Leucothoe fontanesiana* cuttings to inoculation with ericoid mycorrhizal fungi. *J. Hort. Sci. Biotechn.* 80: 254-262.
160. Selosse M. A., Schneider-Maunoury L., Martos F. 2018. Time to re-think fungal ecology? Fungal ecological niches are often prejudged. *New Phytol.* 217: 968-972.
161. Shah S., Shrestha R., Maharjan S., Selosse M. A., Pant B. 2019. Isolation and characterization of plant growth-promoting endophytic fungi from the roots of *Dendrobium moniliforme*. *Plants* 8: 5.
162. Shekhawat M. S., Manokari M. 2018. Micromorphological and anatomical evaluation of *in vitro* and field transferred plants of *Coccinia indica*. *Agricult. Res.* 7: 135-144.
163. Shen H. F., Zhao B., Xu J. J., Liang W., Huang W. M., Li H. H. 2017. Effects of heat stress on changes in physiology and anatomy in two cultivars of *Rhododendron*. *South Afr. J. Bot.* 112: 338-345.
164. Shigeto J., Tsutsumi Y. 2016. Diverse functions and reactions of class III peroxidases. *New Phytol.* 209: 1395-1402.
165. Sieber T. N. 2007. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? *Fungal Biol. Rev.* 21: 75-89.
166. Sirrenberg A., Göbel C., Grond S., Czempinski N., Ratzinger A., Karlovsky P., Santos P., Feussner I., Pawlowski K. 2007. *Piriformospora indica* affects plant growth by auxin production. *Physiol. Plant.* 131: 581-589.
167. Spiering M. J., Greer D. H., Schmid J. 2006. Effects of the fungal endophyte, *Neotyphodium lolii*, on net photosynthesis and growth rates of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) are independent of *in planta* endophyte concentration. *Ann. Bot.* 98: 379-387.
168. Stone J. K., Polishook J. D., White J. F. 2004. Endophytic Fungi. In Mueller G. M., Bills G. F., Foster M. S. (eds), *Biodiversity of Fungi Inventory and Monitoring Methods*, Elsevier Academic Press, Burlington. pp 239-269.

169. Strzelecka K. 2007. Anatomical structure and adventitious root formation in *Rhododendron ponticum* L. cuttings. *Acta Sci. Pol.* 6: 15-22.
170. Suárez E., Alfayate C., Pérez-Francés J. F., Rodríguez-Pérez J. A. 2018. Structural and ultrastructural variations in in vitro and ex vitro rooting of microcuttings from two micropropagated *Leucospermum* (*Proteaceae*). *Sci. Hort.* 239: 300-307.
171. Sukumar P., Legue V., Vayssières A., Martin F., Tuskan G. A., Kalluri U. C. 2013. Involvement of auxin pathways in modulating root architecture during beneficial plant–microorganism interactions. *Plant Cell Env.* 36: 909-919.
172. Summerbell R. C. 2005. Root endophyte and mycorrhizosphere fungi of black spruce, *Picea mariana*, in a boreal forest habitat: influence of site factors on fungal distributions. *Stud. Mycol.* 53: 121-145.
173. Sun X., Guo L. D., Hyde K. D. 2011. Community composition of endophytic fungi in *Acer truncatum* and their role in decomposition. *Fungal Div.* 47: 85-95.
174. Sun C., Johnson J., Cai D., Sherameti I., Oelmüller R., Lou B. 2010. *Piriformospora indica* confers drought tolerance in Chinese cabbage leaves by stimulating antioxidant enzymes, the expression of drought related genes and the plastid-localized CAS protein. *J. Plant Physiol.* 167: 1009-1017.
175. Syros T., Yupsanis T., Zafiriadis H., Economou A. 2004. Activity and isoforms of peroxidases, lignin and anatomy, during adventitious rooting in cuttings of *Ebenus cretica* L. *J. Plant Physiol.* 161: 69-77.
176. Tall S., Meyling N. V. 2018. Probiotics for plants? Growth promotion by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* depends on nutrient availability. *Microb. Ecol.* 1-7.
177. Tallman K. J., Meyer M. M. Jr. 1980. The effect of photoperiod and growth regulator application on the rooting of certain broad-leaved evergreen cuttings. *Plant Propag.* 26: 11-13.
178. Tejesvi M. V., Kajula M., Mattila S., Pirttilä A. M. 2011. Bioactivity and genetic diversity of endophytic fungi in *Rhododendron tomentosum* Harmaja. *Fungal Div.* 47: 97-107.
179. Tejesvi M. V., Mahesh B., Nalini M. S., Prakash H. S., Kini K. R., Subbiah V., Shetty H. S. 2006. Fungal endophyte assemblages from ethnopharmacologically important medicinal trees. *Can. J. Microbiol.* 52: 427-435.
180. Terzioğlu S., Merev N., Anşın R. 2001. A study on Turkish *Rhododendron* L. (*Ericaceae*). *Turk. J. Agricult. For.* 25: 311-317.

181. Tewoldemedhin Y. T., Mazzola M., Mostert L., McLeod A. 2011. *Cylindrocarpon* species associated with apple tree roots in South Africa and their quantification using real-time PCR. *Europ. J. Plant Pathol.* 129: 637-651.
182. Tezgül Çakır N., Güvenç A., Kökdil G., Duran N., Arslan G. J. 2005. Studies on the anatomical, phytochemical and antimicrobial properties of endemic *Rhododendron smirnowii* Trautv. *Fac. Pharm. Ankara* 34: 165-182.
183. Tognolli M., Penel C., Greppin H., Simon P. 2002. Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 288: 129-138.
184. Toju H., Tanabe A. S., Ishii H. S. 2016. Ericaceous plant–fungus network in a harsh alpine–subalpine environment. *Mol. Ecol.* 25: 3242-3257.
185. Tomsone S., Gertnere D. 1994. *Rhododendron* L. genus callusogenesis *in vitro*. *Proc. Latv. Acad. Sci. Sect. B*, 11/12: 109-112.
186. Tomsone S., Gertnere D. 2003. *In vitro* shoot regeneration from flower and leaf explants in *Rhododendron*. *Biol. Plant.* 46: 463-465.
187. Tyagi J., Varma A., Pudake R. N. 2017. Evaluation of comparative effects of arbuscular mycorrhiza (*Rhizophagus intraradices*) and endophyte (*Piriformospora indica*) association with finger millet (*Eleusine coracana*) under drought stress. *Europ. J. Soil Biol.* 81: 1-10.
188. Vadassery J., Ritter C., Venus Y., Camehl I., Varma A., Shahollari B., Novák O., Strnad M., Ludwig-Müller J., Oelmüller R. 2008. The role of auxins and cytokinins in the mutualistic interaction between *Arabidopsis* and *Piriformospora indica*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21: 1371-1383.
189. Van der Does H. C., Rep M. 2017. Adaptation to the host environment by plant-pathogenic fungi. *Ann. Rev. Phytopathol.* 55: 427-450.
190. Van Doorn W. G., Ketsa S. 2014. Cross reactivity between ascorbate peroxidase and phenol (guaiacol) peroxidase. *Posth. Biol. Technol.* 95: 64-69.
191. Varma A., Verma S., Sahay N., Bütehorn B., Franken P. 1999. *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2741-2744.
192. Veloso J., Díaz J. 2012. *Fusarium oxysporum* Fo47 confers protection to pepper plants against *Verticillium dahliae* and *Phytophthora capsici* and induces the expression of defence genes. *Plant Pathol.* 61: 281-288.

193. Vohník M., Albrechtová J. 2011. The co-occurrence and morphological continuum between ericoid mycorrhiza and dark septate endophytes in roots of six European *Rhododendron* species. *Folia Geobot.* 46: 373-386.
194. Vohník M., Fendrych M., Albrechtová J., Vosátka M. 2007. Intracellular colonization of *Rhododendron* and *Vaccinium* roots by *Cenococcum geophilum*, *Geomyces pannorum* and *Meliniomyces variaibilis*. *Folia Microbiol.* 52: 407-414.
195. Walker J. F., Aldrich-Wolfe L., Riffel A., Barbare H., Simpson N. B., Trowbridge J., Jumpponen A. 2011. Diverse Helotiales associated with the roots of three species of Arctic Ericaceae provide no evidence for host specificity. *New Phytol.* 191: 515-527.
196. Watson P. 1965. Further observations on *Calcarisporium arbuscula*. *Transact. Brit. Mycol. Soc.* 48: 9-17.
197. Wei X., Chen J., Zhang C., Pan D. 2016. A new *Oidiodendron maius* strain isolated from *Rhododendron fortunei* and its effects on nitrogen uptake and plant growth. *Front. Microbiol.* 7: 1327.
198. Wilson D. 1995. Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos* 73: 274-276.
199. Yuan Z. L., Chen Y. C., Ma X. J. 2011. Symbiotic fungi in roots of *Artemisia annua* with special reference to endophytic colonizers. *Plant Biosys.* 145: 495-502.
200. Yuan Z. L., Zhang C. L., Lin F. C., Kubicek C. P. 2010. Identity, diversity, and molecular phylogeny of the endophytic mycobiota in the roots of rare wild rice (*Oryza granulate*) from a nature reserve in Yunnan, China. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 1642-1652.
201. Zeilinger S., Gupta V. K., Dahms T. E., Silva R. N., Singh H. B., Upadhyay R. S., Gomes E. V., Tsui C. K.-M., Nayak S. C. 2015. Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions with plants. *FEMS Microbiol. Rev.* 40: 182-207.
202. Zhang C., Yin L., Dai S. 2009. Diversity of root-associated fungal endophytes in *Rhododendron fortunei* in subtropical forests of China. *Mycorrh.* 19: 417-423.
203. Zhang W., Fan J., Tan Q., Zhao M., Zhou T., Cao F. 2017. The effects of exogenous hormones on rooting process and the activities of key enzymes of *Malus hupehensis* stem cuttings. *PloS one*, 12: e0172320.
204. Zhao X. Y., Su Y. H., Cheng Z. J., Zhang X. S. 2008. Cell fate switch during *in vitro* plant organogenesis. *J. Integr. Plant Biol.* 50: 816-824.
205. Zhou J., Wu H., Collet G. F. 1992. Histological study of initiation and development *in vitro* of adventitious roots in minicuttings of apple rootstocks of M26 and EMLA9. *Physiol. Plant.* 84: 433-440.

206. Zhou Y. K., Shen X. Y., Hou C. L. 2017. Diversity and antimicrobial activity of culturable fungi from fishscale bamboo (*Phyllostachys heteroclada*) in China. *World J. Microbiol. Biotechn.* 33: 104.
207. Zogli P., Libault M. 2017. Plant response to biotic stress: Is there a common epigenetic response during plant-pathogenic and symbiotic interactions? *Plant Sci.* 263: 89-93.
208. Еремин В. М., Бойко В. И. 1998. Анатомическое строение коры стебля некоторых видов семейства Ericaceae. *Бот. журн.* 83: 1-15.