

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE
AUGU FIZIOLOĢIJAS KATEDRA

MŪŽZAĻO RODODENDRU VIENPUMPURA
SPRAUDEŅU AR LAPU RIZOĢENĒZE NO
RODODENDRU SAKNĒM IZOLĒTU ENDOFĪTISKO
SĒŅU *MORTIERELLA* SP. UN *CALCARISPORIUM*
ARBUSCULA IETEKMĒ

Maģistra darbs

Autors: Lelde Stirna

Stud. apl. Nr. ls11135

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

Recenzents: Dr.biol. Inga Apine

Konsultanti: Msc. biol. Kristīne Dokāne

Dr. biol. Dace Megre

RĪGA 2016

KOPSAVILKUMS

Tā kā Latvijā un citviet pasaulē rododendrus plaši izmanto visa veida apstādījumos – gan pilsētu parkos, gan arī piemājas teritorijās, ir svarīgi tos pavairot iespējami īsākā laikā un iegūt kvalitatīvus jaunus augus. Visplašāk tiek izmantotas veģetatīvās pavairošanas metodes, jo šķirnēm ir būtiski saglabāt to ģenētisko materiālu.

Ir novērota atsevišķu endofītisko sēņu pozitīvā ietekme uz apsakņošanās procesu, taču trūkst informācijas par endofītisko sēņu ietekmi uz rizoģenēzes procesu, pavairojot augus ar klasiskajām pavairošanas metodēm.

Darba mērķis ir noskaidrot, kā no mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ saknēm izolētās endofītiskās sēnes *Calcarisporium arbuscula* un *Mortierella* sp. ietekmē šīs šķirnes vienpumpura spraudeņu ar lapu rizoģenēzi un turpmāko attīstību.

Šajā pētījumā novēroja endofītiskās sēnes *Calcarisporium arbuscula* pozitīvo ietekmi uz rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ vienpumpura spraudeņu apsakņošanos, kā arī dzīvotspēju ilgtermiņā, savukārt apstrāde ar endofītisko sēni *Mortierella* sp. veicina ātrāku iniciāļu un aizmetņu veidošanos, tomēr apsakņošanās procentuālais iznākums ir zems. Gan 1 % ISS, gan *Mortierella* sp. variantiem peroksidāzes aktivitātes līknēs ir novērojams sadalījums indukcijas, iniciācijas un ekspresijas fāzēs, ko apstiprināja anatomiskā izpēte spraudeņu pamatnēs.

Eksperimentu veica no 2014. gada novembra līdz 2016. gada janvārim Latvijas Universitātes Bioloģijas fakultātes Augu fizioloģijas katedrā.

Atslēgvārdi: endofītiskās sēnes, rododendri, rizoģenēze, vienpumpura spraudeņi ar lapu.

SUMMARY

Rhododendrons are known as decorative plants, which are widely used in all type of gardens – public parks and infield territories, so there is a need to improve methods of their propagation for the shortest possible time to obtain high-quality young plants. The most widely used methods of propagation are the vegetative ones, because they can provide with genetically uniform plant material.

Fungal endophytes appear to have stimulating effect in rhizogenesis in plants; however there is lack of information about fungal endophyte effect on adventitious root formation propagating plants by cuttings.

The aim of this study was to appraise how fungal endophytes *Calcarisporium arbuscula* and *Mortierella* sp. effect formation of adventitious roots and further development in elepidote rhododendron ‘Babītes Lavanda’ leaf-bud cuttings.

We found out that fungal endophyte *Calcarisporium arbuscula* promotes formation of adventitious roots and further development in elepidote rhododendron ‘Babītes Lavanda’ leaf-bud cuttings, meanwhile fungal endophyte *Mortierella* sp. promotes formation of adventitious roots, but further development of cuttings are poor. Peroxides activity in elepidote rhododendron ‘Babītes Lavanda’ leaf-bud cuttings treated with 1 % IAA and *Mortierella* sp revealed phases of rooting – induction, initiation and expression, it was confirmed by anatomical investigation.

Studies were carried out from November 2014 till January 2016 at the Faculty of Biology, the Department of Plant Physiology, University of Latvia.

Key words: fungal endophytes, rhododendron, rhizogenesis, leaf-bud cuttings.

SATURS

Ievads.....	5
1. Literatūras apskats	6
1.1. Rododendru ģints īss raksturojums	6
1.2. Mūžzaļo rododendru pavairošana	6
1.3. Mūžzaļo rododendra viengadīga dzinuma anatomiskā uzbūve	9
1.4. Adventīvo sakņu veidošanās anatomiskais raksturojums	11
1.5. Adventīvo sakņu veidošanās fizioloģiskais raksturojums	12
1.6. Augu un mikroskopisko sēņu mijiedarbība	16
1.6.1. Augu un to endofītisko sēņu raksturojums.....	16
1.6.2. Rododendru sakņu mikroskopiskās sēnes	19
2. Materiāli un metodes	22
2.1. Eksperimentos izmantotā mūžzaļo rododendru šķirne	22
2.2. Eksperimentos izmantotās mikroskopiskās sēnes.....	22
2.3. Rododendru pavairošana ar vienpumpura spraudņiem ar lapu.....	22
2.4. Anatomisko preparātu pagatavošana un izpēte.....	24
2.5. Sēņu izolēšana un noteikšana	26
2.6. Gvajakola peroksidāzes aktivitātes noteikšana.....	27
3. Rezultāti.....	28
3.1. Mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ vienpumpura spraudņu stumbra un adventīvo sakņu veidošanās anatomiskais raksturojums	28
3.2. Mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ vienpumpura spraudņu peroksidāzes aktivitāte adventīvo sakņu veidošanās laikā	33
4. Diskusija	37
Secinājumi	41
Pateicības	42
Literatūras saraksts	43

IEVADS

Pēc Vitekera klasifikācijas, dzīvos organismus iedala 5 grupās – augu, dzīvnieku, sēņu, protistu un monēru valstīs. Sēņu valsti veidojošie organismi ir mikroskopiskās un makroskopiskās sēnes. Mikroskopiskās sēnes iesaistās dažāda veida attiecībās ar augiem – mutuālistisku attiecību gadījumā tās var veidot mikorizu, citas savukārt var būt augu endofīti, kā arī augu parazīti vai patogēni.

Endofīti ir mikroorganismi, kas kolonizē dzīvo augu iekšējos audus, neizraisot tūlītēju acīm redzamu negatīvu efektu, bet var kļūt patogēni, saimniekaugam novecojot. Endofītiskās sēnes ir daudzu bioloģiski svarīgu savienojumu sintezētājas, tās spēj aizsargāt augus no patogēnajiem mikroorganismiem, paaugstināt augu stresa izturību un sadalīt mirstošos un mirušos augu audus.

Ēriku dzimtai piederošie rododendri tiek plaši izmantoti apstādījumos, tāpēc ir svarīga šo augu sekmīga pavairošana. Šobrīd izmanto dažādus rododendru veģetatīvās pavairošanas veidus, kā viena no plašāk izmantotajām metodēm ir rododendru pavairošana ar spraudņiem. Spraudņu rizoģenēzes potenciāls dažādām šķirnēm variē, tādēļ ir svarīgi noskaidrot, kā stimulēt adventīvo sakņu veidošanos rododendru spraudņos, izmantojot ne tikai sintētiskos augšanas regulatorus, bet arī augu un mikroorganismu savstarpējo mijiedarbību.

Endofītiskās sēnes *Mortierella* sp. un *Calcarisporium arbuscula* ir izolētas no mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ saknēm. Līdzšinējos pētniecības grupas veiktajos pētījumos ir noskaidrota šo endofītisko sēņu pozitīvā ietekme uz *in vitro* pavairošanu un mikrospraudņu apsakņošanu *ex vitro*.

Darba mērķis ir noskaidrot, kā no mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ saknēm izolētās endofītiskās sēnes *Calcarisporium arbuscula* un *Mortierella* sp. ietekmē šīs šķirnes vienpumpura spraudņu ar lapu rizoģenēzi un turpmāko attīstību.

Darba uzdevumi ir:

1. Pētīt vienpumpura spraudņu ar lapu adventīvo sakņu iniciāļu un aizmetņu veidošanos dažādiem apstrādes variantiem.
2. Noskaidrot peroksidāzes aktivitātes izmaiņas vienpumpura spraudņu lapās saistībā ar adventīvo sakņu attīstības posmiem atkarībā no apstrādes varianta.
3. Salīdzināt dažādu apstrādes variantu ietekmi uz vienpumpura spraudņu apsakņošanu un turpmāko attīstību.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Rododendru ģints īss raksturojums

Rododendru ģints *Rhododendron* L. ar vairāk nekā 1000 sugām pieskaitāma ēriku dzimtai *Ericaceae* un ir viena no lielākajām un izplatītākajām divdīgļlapjiem piederošajām kokaugu ģintīm (Çakir et al. 2005). Rododendri ir izplatīti galvenokārt Ziemeļu puslodes aukstajos un mērenajos apgabalos (Väinölä 2000), kā arī Dienvidaustrumāzijā un Ziemeļaustrumāstrālijā (Çakir et al. 2005). Vislielākā rododendru dažādība (vairāk nekā 700 sugas) ir novērojama Ķīnā, Tibetā, Birmā, Indijā un Nepālā (Çakir et al. 2005), savukārt Eiropā ir sastopamas tikai septiņas rododendru sugas (Väinölä 2000).

Ģints augu izmēri variē – tie ir zemi vai vidēji augsti krūmi, retāk koki ar mūžzaļām, daļēji mūžzaļām vai vasarzaļām lapām (Terzioğlu et al. 2001, Kondratovičs 2005). Lapas ir kātainas, aug pamīšus, izmēru ziņā var sasniegt lielu dažādību. Ziedi ar kātiem, vairogveida ķekaros, dažreiz pa vienam vai tikai dažiem, parasti attīstās no galotnes pumpuriem, retāk – no sānpumpuriem. Kauslapas un vainaglapas ir saaugušas. Ziedu krāsa ir ļoti dažāda – no baltas līdz koši sarkanai, no dzeltenas līdz oranžai, no bāli violetas līdz gandrīz zilai (Kondratovičs 2005), bieži ir novērojami kontrastējoši plankumi (Cullen 2005). Krāsu veido trīs pigmenti – vakuolā atrodamie antociāni un antoksantīni, kā arī citoplazmā esošie karotinoīdi (Väinölä 2000). Auglis - pogaļa, parasti ovāla līdz iegarena, atveras daļēji vai visā garumā. Sēklas sīkas, 0,5-2 mm garas, daudz, ieslēgtas vaļējā, pagarinātā čaulā, gaiši vai tumši brūnas, spīdīgas (Kondratovičs 2005).

Rododendrus kā kultūraugus sāka izmantot 17. gs. otrajā pusē un līdz šim selekcionāri izveidojuši ap 28000 šķirņu, bet Latvijā šīs ģints introdukcija sākusies 19. gs. divdesmitajos gados (Kondratovičs 2005) un pēc LU Rododendru selekcijas un izmēģinājumu audzētavas „Babīte” datiem šobrīd izveidotas 100 rododendru šķirnes (Riekstiņa 2015).

1.2. Mūžzaļo rododendru pavairošana

Rododendrus var pavairot ģeneratīvi vai veģetatīvi. Komerciāli izdevīgāka ir augu veģetatīvā pavairošana, tādējādi iegūstot lielāku skaitu ģenētiski vienādu augu, kas ir īpaši būtiski šķirņu pavairošanā. Mūžzaļos rododendrus pavairo ar spraudņiem, potējumiem un

audu kultūrām (Nawrocka-Grzeškowiak 2004a; Eeckhaut et al. 2010). Viena no rododendru pavairošanas metodēm ir pavairošana ar vienpumpura spraudņiem ar lapu. Šo metodi var izmantot, ja ir neliels pavairojamā materiāla daudzums (Hartmann et al. 2014).

Spraudņu rizoģenēzi ietekmē daudzu faktoru kopums:

- mātesauga fizioloģiskais stāvoklis, vecums un priekšapstrāde (Husen and Pal 2003, Oinam et al. 2011, Hartmann et al. 2014);
- spraudņu fizioloģiskais stāvoklis, ievainojums un apstrāde ar ekogēnajiem augšanas regulatoriem (Hartmann et al. 2014; Kurepin et al. 2011);
- vides apstākļiem spraudņu rizoģenēzes laikā (Hartmann et al. 2014).

Mātes auga fizioloģiskā stāvokļa ietekme uz spraudņu rizoģenēzi. Viens no faktoriem, kas ietekmē spraudņu apsākņošanu, ir mātesauga vecums. Juvenīlos spraudņos adventīvo sakņu veidošanās process notiek ātrāk nekā nobriedušos augos, kā arī apsākņošanās procentuālais iznākums ir lielāks (Husen and Pal 2003). Pētījumos par Smirnova rododendra (*Rhododendron smirnowii*) spraudņiem konstatēts, ka labi apsākņojās tikai no jauniem mātesaugu stādiem ņemti spraudņi (Czekalski 1988). Tomēr, pagatavojot spraudņus, svarīgs ir ne tikai paša mātes auga vecums, bet arī spraudņošanā izmantojamo auga daļu fizioloģiskais vecums, arī šajā gadījumā labāk apsākņojas no jaunākām auga daļām pagatavotie spraudņi (Hartmann et al. 2014).

Lai veicinātu spraudņu apsākņošanu, izmanto arī tādu metodi kā mātesaugu etiolāciju. Augi vai to daļas tiek turēti tumsas apstākļos, tādējādi izraisot anatomiskas un fizioloģiskas izmaiņas auga audos (Hartmann et al. 2014). Šādiem augiem ir novērojams hlorofila trūkums, dzinuma pagarināšanās, mazas lapas, kā arī samazināta lignīna sintēze, izmaiņas fenolu metabolismā un paaugstināt stumbra jutīgums pret auksīnu. Etiolācijas ietekmē izmainās arī mātesaugu dzinumu anatomija – samazinās sklerenhīmas un peridermas veidošanās, kā arī koksnes biezums, bet palielinās mizas biezums un lūksnes staru paplašinājumu skaits (Maynard and Bassuk 1996, Apine et al 2011, Hartmann et al. 2014). Šāda mātesaugu apstrāde var pozitīvi ietekmēt apsākņoto spraudņu skaitu un sakņu skaitu vienam spraudnim (Hansen and Potter 1997, Husen 2011).

Spraudņu rizoģenēzi ietekmējošie faktori. Kā iniciācijas faktors adventīvo sakņu attīstībai *de novo* kalpo spraudņa ievainošana griezuma pagatavošanas laikā, ar sekojošu ievainojuma atbildes reakciju un sakņu reģenerācijas procesu (Hartmann et al. 2014). Tomēr ne visām sugām spraudņa atdalīšana no mātes auga ir pietiekošs stimulants adventīvo sakņu veidošanai un šādām sugām, tostarp rododendriem, ir nepieciešama papildus ievainošana, lai

apsakņošanās process būtu sekmīgs (Well 1981). Ievainojuma rezultātā ne vien izmainās ievainoto šūnu metabolisms, bet arī palielinās augšanas regulatoru absorbcijas virsma.

Sekmīgai apsakņošanās procesa norisei, ir svarīgs ne vien spraudēju pagatavošanai ņemto auga daļu vecums, bet arī laiks, kurā tiek pagatavoti spraudēni. Mūžzaļajiem rododendriem optimālais spraudēju pagatavošanas laiks ir veģetācijas perioda beigās – oktobrī (Kondratovičs 1993; Nawrocka-Grzeškowiak 2004a). Liela loma daļēji pārkoksnētu spraudēju adventīvo sakņu veidošanās procesā ir arī spraudēja lapai. Tā nodrošina sakņu attīstībai nepieciešamos ogļhidrātus, fitohormonus un arī citus organiskos savienojumus. Tomēr lapas piedalās arī transpirācijā, tāpēc spraudēniem samazina lapu skaitu un izmēru, lai novērstu ūdens zudumu (Hartmann et al. 2014).

Dažādām rododendru sugām atšķiras apsakņošanās spēja, proti, dažām sugām adventīvās saknes veidojas bez īpašas apstrādes, savukārt citām ir nepieciešama papildus apstrāde ar augsības dabas savienojumiem. Biežāk izmantotais sakņu augšanas stimulators mūžzaļajiem rododendriem ir ISS (indolilviestskābe) ar koncentrāciju 0,8 – 2% atkarībā no kultivējamās sugas vai šķirnes (Nawrocka-Grzeškowiak 2004b; Hartmann et al. 2014).

Vides faktori. Abiotiskajiem faktoriem ir būtiska loma sekmīga rizoģenēzes procesa norisei, tāpēc ir svarīgi nodrošināt spraudēju augšanai optimālu mitrumu, temperatūru un apgaismojumu.

Mitrumi. Transpirācijas rezultātā spraudenī samazinās ūdens daudzums, kas var novest pie spraudēja bojāejas, tāpēc ir svarīgi uzturēt spraudenī ūdens balansu starp transpirāciju un ūdens uzņemšanu. Ūdens uzņemšana spraudenī ir proporcionāla ūdens saturam pavairošanas vidē, tādēļ nepieciešams uzturēt pastāvīgu mitrumu. Lielākajai daļai augu sugu ūdens uzņemšana caur lapām nav galvenais ūdens uzņemšanas veids, tāpēc sakņu trūkuma rezultātā viszemākais ūdens līmenis spraudenī ir novērojams pirmās dienas pēc spraudēšanas un tas pakāpeniski pieaug, izveidojoties saknes aizmetņiem. Pārmērīgi palielinot ūdens daudzumu, var samazināties aerācija, kas var novest pie anaerobiem apstākļiem un tādējādi pie spraudēju bojāejas (Hartmann et al. 2014).

Temperatūra. Optimālā apsakņošanās temperatūra mērenā klimata augiem ir 18 - 25 °C substrātam, 21 – 27 °C gaisa temperatūra dienas laikā un 15 °C – naktī, tomēr dažas sugas labāk apsakņojas zemākā temperatūrā. Augstas gaisa temperatūras nodrošina pumpura pagarināšanos, kas veicina apsakņošanos, tomēr šādā veidā tiek zaudēts vairāk ūdens (Hartmann et al. 2014).

Gaisma. Kokaugu spraudēni labāk apsakņojas relatīvi zemā apgaismojumā. Pārāk liels apgaismojums bojā spraudēju lapas un samazina sakņu augšanu, taču pārāk zems

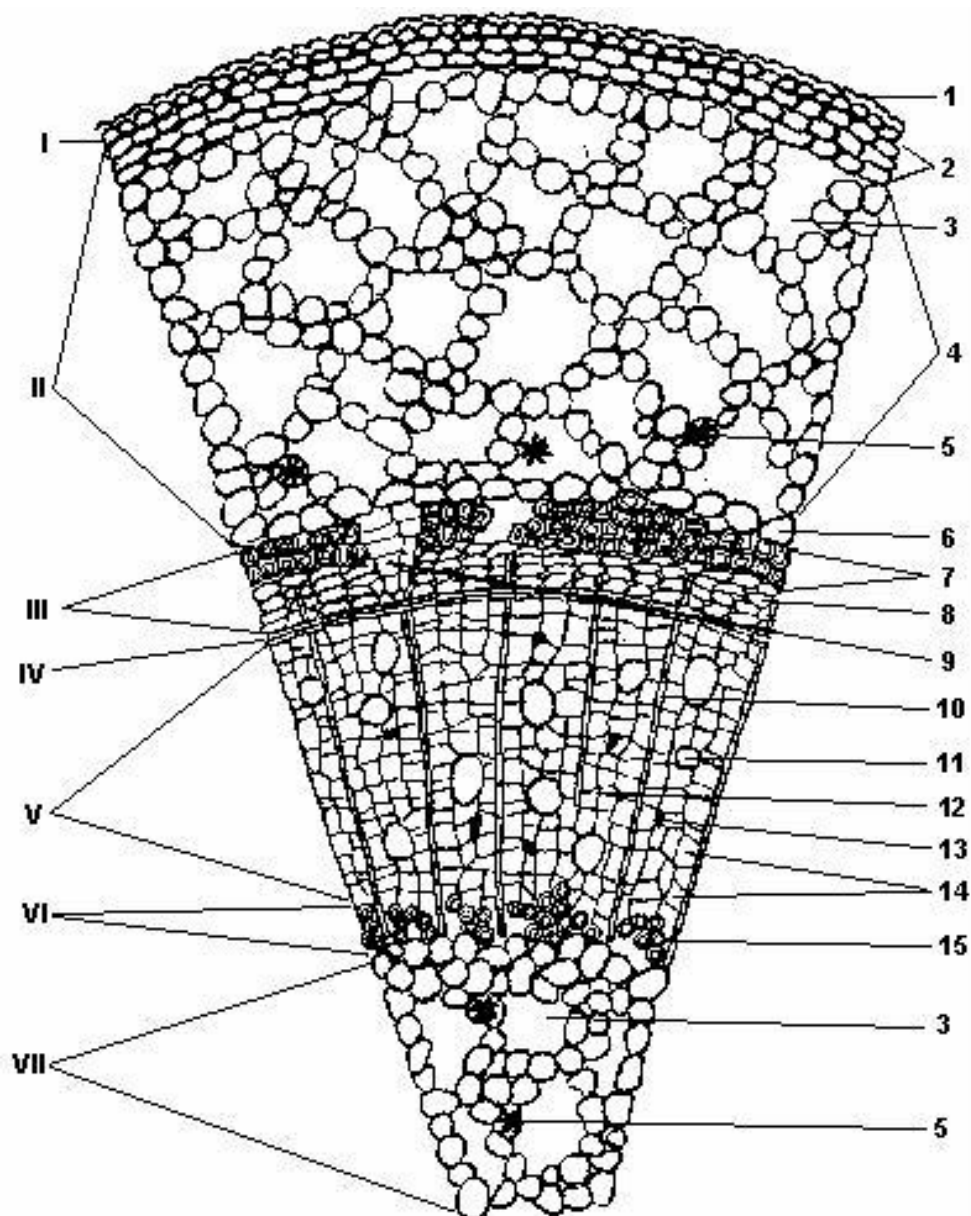
apgaismojuma līmenis palielina apsakņošanās laiku. Rododendru rizoģenēzei un tālākai attīstībai pēc apsakņošanās ir svarīgs arī fotoperiods. Dzinuma augšanu nodrošina dienas gaismas ilguma samazināšanās (Hartmann et al. 2014).

1.3. Mūžzaļo rododendra viengadīga dzinuma anatomiskā uzbūve

Mūžzaļo rododendru viengadīgiem dzinumiem raksturīga sekundārā uzbūve, ko veido segaudi, miza, lūksne, kambijs, koksne, serde (Kondratoviča 1986, Kondratovičs und Megre 1999, Strzelecka 2007) (1. attēls). Epiderma (primārie segaudi) augu attīstības sākumā sedz visas auga daļas – lapas, stumbru, sakni, izņemot saknes uznavu un augšanas konusu (Bumbura u.c. 1967). Mūžzaļo rododendru viengadīgiem dzinumiem raksturīga no vienas šūnu kārtas sastāvoša epiderma, ko sedz kutikula, mēdz būt arī trihomi (Jeremin and Boiko 1998, Kondratovičs und Megre 1999, Tezgül Çakir et al. 2005).

Miza ir stumbra daļa, kas atrodas starp epidermu un lūksni un to veido kolenhīma, primārās mizas parenhīma un endoderma (Fahn 1990). Rododendriem raksturīga plātņu kolenhīma, ko veido 2-3 garenu, blīvi sakārtotu šūnu kārtā, bez starpšūnu telpām. Primārās mizas parenhīma ir irdeni audi ar lielām starpšūnu telpām. Šūnās atrodami kalcija oksalāta kristāli – drūzas (Fahn 1990, Tezgül Çakir et al. 2005). Mizas parenhīmas šūnām ir raksturīga cietes uzkrāšanas funkcija (Evert 2006). Mūžzaļajiem rododendriem ir endoderma, ko veido blīvi sakārtotas, dzīvas šūnas (Kondratoviča 1986).

Mūžzaļo rododendru lūksni veido sietstobri, pavadītājšūnas, lūksnes parenhīma un lūksnes šķiedras jeb sklerenhīmas šķiedras (Jeremin and Boiko 1998). Sietstobri ir prozenhimatisku šūnu rindas, kuras savstarpēji savienotas ar sietplātnītēm. Pavadītājšūnas ir specializētas parenhīmas šūnas, kuras ir ontogēnētiski un fizioloģiski saistītas ar sietstobru posmiem (Fahn 1990) un sietstobru bojāejas gadījumā, iet bojā arī tā pavadītājšūnas. Sklerenhīmu veido nedzīvas šūnas ar lignificētiem šūnapvalkiem, kas nodrošina mehānisko izturību. Radiālo sistēmu veido lūksnes staru parenhīmas šūnas. Sietstobri nodrošina asimilātu transportu no to veidošanās vietas uz uzkrāšanās vietām ar osmotiskā spiediena palīdzību. Pa lūksni tiek pārvietotas arī aminoskābes, fitohormoni, RNS, proteīni, signālmolekulas, tādējādi lūksnei ir nozīmīga loma komunikācijas nodrošināšanā auga līmenī, kā arī augšanas procesa koordinēšanā (Evert 2006).



1. attēls. Mūžzaļo rododendru šķirnes 'Cunningham's White' viengadīga dzinuma anatomiskā uzbūve (modificēts Kondratoviča 1986). I – epiderma, II – miza, III – lūksne, IV – kambiji, V – sekundārā koksne, VI – primārā koksne, VII – serde, 1 – kutikula, 2 – plātņu kolenhīma, 3 – starpšūnu telpa, 4 – primārās mizas parenhīma, 5 – drūza, 6 – endoderma, 7 – lūksnes šķiedras (sklerenhīma), 8 – lūksne, 9 – primārā stara paplašinājums, 10 – primārās serdes stars, 11 – traheja, 12 – sekundārais stars, 13 – koksnes parenhīma, 14 – koksnes šķiedras, 15 – traheīda.

Figure 1. Anatomical structure of elepidote rhododendron cultivar 'Cunningham's White' one-year-old shoot. I – epidermis, II – cortex, III – phloem, IV – cambium, V – secondary xylem, VI – primary xylem, VII – pith, 1 – cuticle, 2 – collenchyma, 3 – intercellular space, 4 – cortex parenchyma, 5 – druse, 6 – endodermis, 7 – sclerenchyma, 8 – phloem, 9 – primary ray dilation, 10 – primary rays, 11 – vessel element, 12 – secondary rays, 13 – xylem parenchyma, 14 – xylem fibres, 15 – tracheids.

Kambiji ir sekundārie meristematiski audi (Fahn 1990), ko veido plāns šūnu slānis (Kitin et al. 2000). Tas ir veidojies no primārajiem veidotājaudiem – prokambija (Fahn 1990).

Kambija šūnām daloties, virzienā uz perifēriju veidojas sekundārā lūksne, bet uz centru – sekundārā koksne (Larson 1994). Mūžzaļo rododendru viengadīgam dzinumam kambija dalīšanās rezultātā sekundārā koksne veidojas biezākā slānī nekā sekundārā lūksne (Tezgül Çakir et al. 2005).

Rododendriem raksturīga difūzā koksne, kura sastāv no trahejām, traheīdām, koksnes šķiedrām (libriforma) un koksnes parenhīmas šūnām (Merev and Yavuz 2000). Trahejas sastāv no atsevišķiem posmiem, kas savstarpēji savienotas ar perforācijām (Dickison 2000). Trahejas posmus veido garenas šūnas ar lignificētiem šūnapvalkiem, augam sasniedzot briedumu, tās kļūst nedzīvas (Evert 2006). Sekundārā koksne veido vertikālo (aksiālo) un horizontālo (radiālo) sistēmu augā. Radiālo transportu starp koksni un lūksni nodrošina sekundārie stari. (Evert 2006). Trahejas veic ūdens un tajā izšķīdušo vielu transportu (Dickison 2000). Traheīdas, koksnes šķiedras un koksnes parenhīmas šūnas nodrošina barības vielu uzkrāšanas funkciju (Evert 2006).

Stumbra centrālo daļu aizņem serde (Trzelecka 2007). To veido lielas, irdeni sakārtotas parenhimatiskas šūnas. Serdes parenhīmas šūnās var uzkrāties rezerves barības vielas un veidoties drūzas (Kondratoviča 1986, Fahn 1990).

1.4. Adventīvo sakņu veidošanās anatomiskais raksturojums

Priekšnoteikums pavairošanai ar spraudņiem ir adventīvo sakņu veidošanās. Adventīvās saknes ir orgāni, kas veidojas no šūnām un audiem no iepriekš attīstījušās virszemes daļas un saknēm. Daudziem ekonomiski svarīgiem kokaugiem ir zema ģenētiskā un fizioloģiskā kapacitāte adventīvo sakņu veidošanā, kas ierobežo to pavairošanu komerciāliem mērķiem (Hartmann et al. 2014).

Adventīvo sakņu veidošanās ir atkarīga no auga šūnu dediferenciācijas un no tā, vai tālāk attīstīsies sakņu sistēmā vai virszemes daļā. Dediferenciācijas process ir atkarīgs no diferencēto šūnu spējas ierosināt dalīšanos, veidojot jaunu meristemātisku augšanas punktu (Hartmann et al. 2014).

Attīstības izmaiņas, kas notiek ievainojuma adventīvo sakņu *de novo* attīstībā, var iedalīt četrās stadijās:

1. specifisku diferencētu šūnu dediferencēšanās;
2. sakņu iniciāļu veidošanās no šūnām, kas atrodas vadaudu tuvumā un dediferencēšanās rezultātā kļuvušas meristematiskas;

3. saknes iniciāļu attīstība par saknes aizmetņiem;
4. aizmetņa augšana un vadaudu veidošanās starp aizmetni un spraudeņa stubbra vadaudiem (Hartmann et al. 2014).

Mūžzaļo rododendru vienpumpura spraudeņiem ar lapu raksturīga ievainojuma inducētā adventīvo sakņu veidošanās. Sākotnēji ārējās ievainotās šūnas iet bojā veidojot nekrotisku šūnu slāni, kas pasargā griezuma virsmu no izzūšanas un patogēniem (Hartmann et al. 2014, Strzelecka 2007). Vadaudu un kambija tuvumā esošajām parenhīmas šūnām palielinās kodoli un citoplazma kļūst blīvāka (San-José et al. 1992, Naija et al. 2008). Noteiktas šūnas kambija un lūksnes tuvumā sāk dalīties un veidot adventīvās saknes *de novo*. Spraudeņu adventīvo sakņu veidošanās ir vairākfāzu attīstības process. Šī procesa pamatā ir spraudeņa ievainošana, resursu mobilizācijas un signālsistēma visa spraudeņa līmenī (Druege et al. 2016).

1.5. Adventīvo sakņu veidošanās fizioloģiskais raksturojums

Augu hormoni jeb fitohormoni ir organisko vielu grupa, kas ietekmē fizioloģiskos procesus augā jau pie nelielām koncentrācijām (Davies 2010). To galvenā loma ir veicināt augu aklimatizāciju nepārtraukti mainīgajai apkārtējai videi, stimulējot augu augšanu, attīstību un stresa toleranci (Fahad et al. 2015).

Fitohormoni 1937. gadā tika definēti kā vielas, kas tiek pārvietotas no vienas organisma daļas uz citu (Davies 2010). Oriģināli šī termina lietojums augu fizioloģijā ir atvasināts no zīdītāju koncepcijas par jēdzienu hormoni, kas sevī ietver lokalizētu sintēzes vietu ar sekojošu pārvietošanos pa asinsrites sistēmu uz mērķaudiem (Evert 2006), kā arī fizioloģisko atbildes reakciju kontroli ar hormonu koncentrācijas palīdzību. Lai gan pirmais identificētais augu hormons auksīns ietekmē augu augšanu attālināti no sintēzes vietas, tomēr līdz ar citu mūsdienās pazīstamu fitohormonu atklāšanu, ir tapis skaidrs, ka fitohormoni neatbilst koncepcijai par zīdītāju hormoniem. Fitohormonu sintēze var būt lokalizēta, bet tā var notikt arī dažādos audos vai šūnās. Kā arī ne vienmēr ir novērojams fitohormonu transports, piemēram, etilēns, iedarbojas tajos pašos audos vai pat šūnā, kur tas ir sintezēts (Davies 2010). Fitohormoniem mēdz būt arī inhibējoša iedarbība, bet tas atkarīgs no mērķaudu un hormonu mijiedarbības. Daži augu hormoni ir spējīgi ietekmēt citu fitohormonu biosintēzi (Evert 2006).

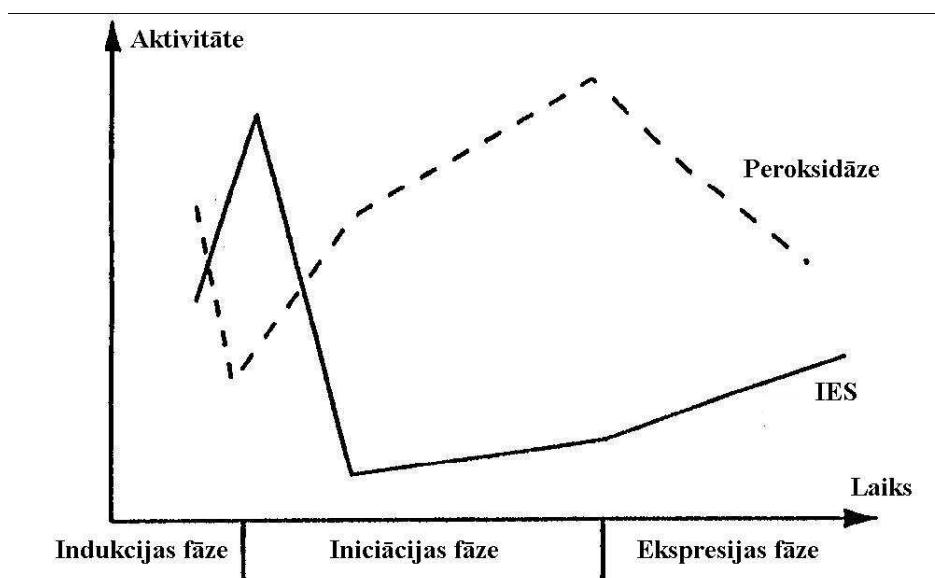
Tradicionāli ir zināmas piecas fitohormonu klases: auksīni, citokinīni, etilēns, abscizskābe un gibberelīni (Evert 2006). Literatūrā atrodama informācija arī par tādiem augu

hormoniem kā salicilskābe, brasinosteroīdi, jasmonāti, kā arī strigolaktons (Wani et al. 2016) u.c. Auksīnam ir liela nozīme adventīvo sakņu veidošanās, tomēr būtisks ir visu hormonu mijiedarbība un līdzsvars (2. attēls) rizoģenēzes procesa gaitā (Druege et al. 2016).

Visvairāk pētīta ir auksīna daba savienojumu ietekme. Dabīgais auksīns ir indolilietilskābe (IES), kas galvenokārt sintezējas lapu aizmetņos un jaunajās lapās (Evert 2006). Kaut gan auksīnu darbības mehānismi ir pētīti vairāk nekā 100 gadus, tā biosintēzes, transporta un signālsistēmu ceļi joprojām nav skaidri (Wani et al. 2016). IES ir iesaistīta daudzos auga attīstības posmos, tostarp, augu polaritātē, veidojot saknes un dzinuma asi embriogēneses, kā arī šūnu pagarināšanās, diferenciācijas un dalīšanās procesos un gravitropisma un fototropisma regulācijā. Polārajā auksīna transportā IES pārvietojas no šūnas uz šūnu, virzienā no dzinuma gala un lapām uz stumbru un no sakņu galiem virzienā uz saknes pamatu. Pārvietošanās ātrums ir 5 – 20 cm stundā, kas ir ātrāk nekā pasīvas difūzijas ātrums (Evert 2006).

Reaģējot uz vides pārmaiņām, nodrošināt signālistēmas darbību un šūnu specializāciju, auksīns iesaistās adventīvo sakņu veidošanās procesā (Druege et al. 2016). Pastāv saistība starp endogēnā auksīna un peroksidāzes daudzumu spraudņos rizoģenēzes laikā un tā kā peroksidāzes aktivitāte ir vieglāk nosakāma nekā endogēnā IES daudzums, šo saistību var izmantot kā marķieri (Gaspar et al. 1994).

Klasiskā augu peroksidāze ir hēmu saturošs enzīms, kas katalizē dažādu organisko savienojumu grupu oksidēšanos (Dawson 1988 cit. pēc Syros et al. 2004). Tiek uzskatīts, ka peroksidāze ir iesaistīta vairākos metabolisma posmos, kā, piemēram, auksīna katabolismā (De Klerk 1996, Haissig et al 1992 cit. pēc Syros et al. 2004). Ar šī marķiera palīdzību adventīvo sakņu veidošanos var sadalīt trīs attīstības fāzes (2. attēls): indukcijas, iniciācijas un ekspresijas fāzē (modificēts Gaspar et al. 1997).

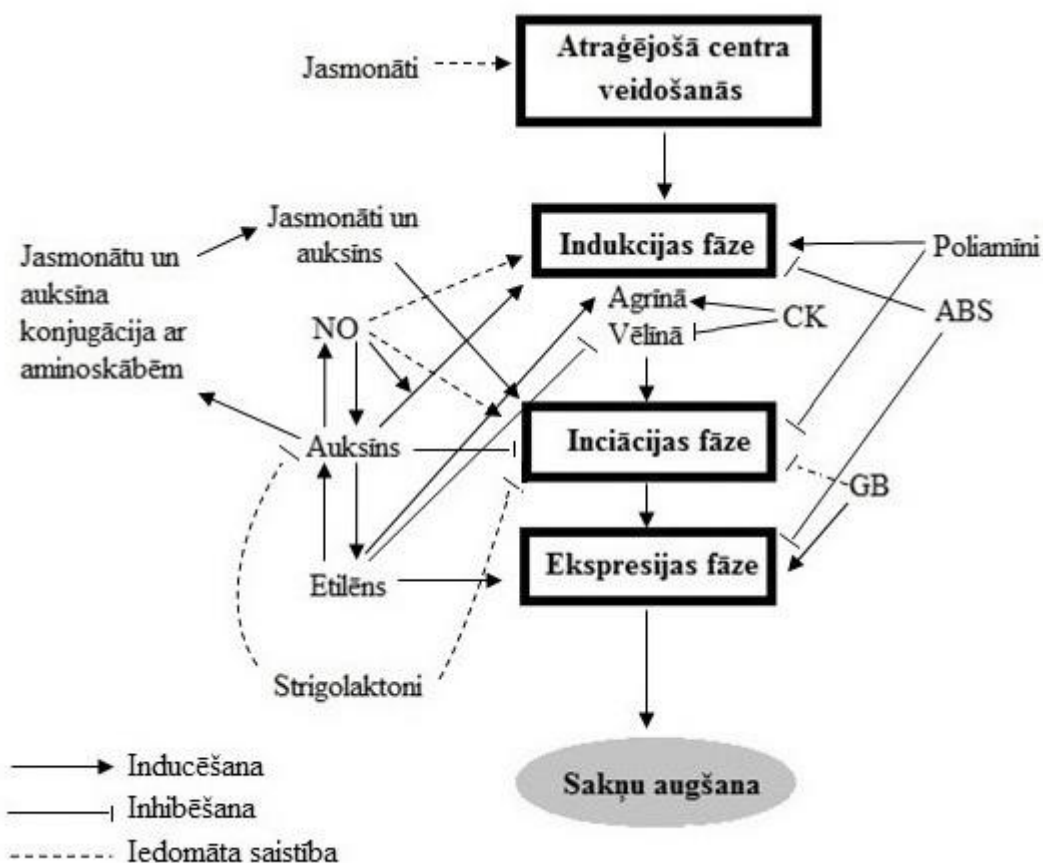


2. attēls. Peroksidāzes aktivitātes un brīvās endogēnās IES daudzuma izmaiņas rizogēnēzes procesā: indukcijas, iniciācijas un ekspresijas fāzē (modificēts Gaspar et al. 1997).

Figure 2. Generally occurring changes of peroxidase activity and of endogenous free IAA level along successive induction, initiative and expressive rooting phases.

Viszemākā peroksidāzes aktivitāte novērojama indukcijas fāzes beigās, šajā laikā endogēnā IES daudzums sasniedz maksimumu (Nag et al. 2001). Indukcijas fāzē notiek iniciācijas fāzes norisei nepieciešamās bioķīmiskās izmaiņas (Kevers et al. 1997), savukārt histoloģiskas izmaiņas nav novērojamas (Gaspars et al. 1994). Iniciācijas fāzē notiek šūnu dalīšanās, kas rezultējas ar iekšējo sakņu meristēmu un sakņu aizmetņu veidošanos (Kevers et al. 1997). Peroksidāzes aktivitātes maksimālā un IES aktivitātes zemākā līmeņa sasniegšana norāda uz iniciācijas fāzes beigām. Tam seko peroksidāzes līmeņa pakāpeniska krišanās un IES līmeņa lēns pieaugums, kas raksturīgs ekspresijas fāzei (Nag et al. 2001). Šajā fāzē norisinās saknes aizmetņa augšana spraudņa iekšienē ar sekojošu sakņu parādīšanos ārpus spraudņa (Kevers et al. 1997).

Fitohormonu mijiedarbība novērojama visu adventīvo sakņu veidošanās laiku (3. attēls) un atšķirīgās fāzēs viens un tas pats fitohormons var būt gan ar veicinošu, gan ar kavējošu iedarbību (Da Costa et al. 2013).



3. attēls. Iespējamā fitohormonu mijiedarbība adventīvo sakņu veidošanās laikā. NO – slāpekļa oksīds, CK – citokinīns, ABS – absciskābe, GB – giberelīni (modificēts Da Costa et al. 2013).

Figure 3. Possible phytohormonal interactions during distinct phases of the adventitious rooting process. NO – nitric oxide, CK – cytokinin, ABS – abscisic acid, GB – gibberellin.

Jasmonāti var veicināt ogļhidrātu atraģējošā centra veidošanos pirms indukcijas fāzes vai indukcijas fāzes sākumā. Indukcijas fāzē piedalās aukšsins un poliamīni, agrīnajā indukcijas fāzē piedalās arī citokinīni (CK) un etilēns, tomēr vēlīnajā indukcijas fāzē gan citokinīnam, gan etilēnam ir inhibējošs efekts, tāpat kā absciskābei (ABS).

Iniciācijas fāzē aukšsīnam, poliamīniem un giberelīniem (GB) ir inhibējoša loma. Jasmonāti un aukšsins ir saistīti ar aminoskābēm, tādējādi samazinot šo fitohormonu līmeni, ir iespējama sekmīga iniciācijas fāzes norise. Arī strigolaktoni var samazināt aukšsina darbību, samazinot to transportu un akumulāciju, kā arī tiešā veidā inhibēt aukšsina darbību. Savukārt slāpekļa oksīds (NO) veicina adventīvo sakņu veidošanos gan indukcijas, gan iniciācijas fāzē. Pastāv pozitīva mijiedarbība starp etilēnu un aukšsīnu - etilēns veicina aukšsina transportu un stimulē tā ekspresiju, savukārt aukšsins sekmē etilēna biosintēzi.

Ekspresijas fāzi inducē etilēns un GB, savukārt ABS to inhibē. Sakņu augšana ir novērojama pēc ekspresijas fāzes beigām.

1.6. Augu un mikroskopisko sēņu mijiedarbība

Augsne ir komplicēta vide, ekosistēma, kas sastāv no abiotiskajiem un biotiskajiem komponentiem. Dzīvie organismi: augi, sēnes, baktērijas un augsnes fauna augsnē aizņem dažādas nišas. Tās biotiskās kompleksitātes dēļ augsne ir visgrūtāk *in situ* pētāmā ekosistēma (Bills et al. 2004). Fizioloģiski visaktīvākie un vislielāko biomasu sastādošie mikroorganismi augsnē ir augsnes mikroskopiskās sēnes (Bills et al. 2004). Līdz 2004. gadam bija identificētas ap 74000 sēņu sugas, bet to skaits tiek lēsts ap 1,5 miljoniem (Hawksworth 2001, Muller et al. 2004, Mueller and Schmit 2005), taču ir atrodami avoti, kuros potenciālais sēņu sugu skaits sasniedz 3,5 - 5,1 miljonu (O'Brien et al. 2005, Nagy et al. 2011). Tomēr, nosakot patieso sēņu sugu skaitu, jāņem vērā, ka pastāv liela varbūtība, ka daļa ar nākamās paaudzes sekvecēšanas palīdzību atklātās jaunās sugas ir jau iepriekš aprakstītas, bet nesekvencētas sēnes vai arī tādas sēnes, kas nav atrodamas pieejamajās datu bāzēs. Šādas informācijas trūkums rada neskaidrības par patieso sēņu sugu skaitu (Nagy et al. 2011). Nav arī zināms, cik no sēņu sugām mijiedarbojas ar augiem. Augstāko augu saknes ir ļoti ciešā kontaktā ar substrātu un dažādi biotiski un abiotiski faktori ietekmē to attīstību un funkcijas. Mijiedarbību, kad mikroorganismi kolonizē saimniekauga audus, sauc par simbiozi. Mutuālistiskās simbiozēs, kad ieguvēji ir abi partneri, augs galvenokārt apgādā simbiontu ar oglekli apmaiņā pret aizsardzību vai limitētiem resursiem, kā ūdens vai minerālelementi (Peterson et al. 2004).

1.6.1. Augu un to endofītisko sēņu raksturojums

Laika gaitā izpratne par augu endofītiem ir attīstījusies un mainījusies, tāpēc literatūrā sastopamas dažāda veida definīcijas, kas tiek lietotas, lai aprakstītu endofītiskās sēnes. Senāk visbiežāk lietoja Petrini (1991) definīcija – visi organismi, kas bez acīmredzamiem bojājumiem saimniekaugam kādā tā dzīves posmā var kolonizēt iekšējos audus, uzskatāmi par endofītiem (Hyde and Soyong 2008). Savukārt jaunākos avotos ar terminu „augu endofīti” saprot mikroorganismus, kas kolonizē augu audus, neizraisot tūlītēju, acīm redzamu, negatīvu efektu, bet var kļūt patogēni, saimniekaugam novecojot (Aly et al. 2011, Partida-Martinez and Heil 2011), līdz ar to šī endofītu definīcija sevī ietver epifītiskus organismus, latentos

patogēnus (Ghimire et al. 2004) un saprotrofos (Promputtha 2007), kā arī mikroorganismus, kas veido mutuālistiskas attiecības ar saimniekaugu (Schulz 2006).

Mikroskopiskās sēnes kolonizē visus augu orgānus, tās atrodas uz lapu un zaru virsmas (epifīti), lapu iekšējos audos (lapu endofīti), mizā (mizas endofīti), koksnē (koksnes endofīti un noārdītāji), saknēs (sakņu endofīti) (Stone et al. 2004).

Endofītiskās sēnes augā var tikt pārnestas (transmitētas) vertikāli ar sēklām no mātes auga (Hartley and Gange 2009), vai horizontāli - ar sēņu sporām auga dzīves laikā. Pētījumos ir pierādījis, ka vertikāli pārnestajiem endofītiem ar saimniekaugu biežāk novērojamas mutuālistiskas attiecības, savukārt horizontāli (ar sporām) pārnestie endofīti nereti ir augam kaitīgi (Saikkonen et al. 2004, Aly et al. 2011). Pēc iekļūšanas saimniekauga audos, endofītiem raksturīgs latentais periods, kas var ilgt visu saimniekauga mūžu vai arī līdz sēnēm labvēlīgām pārmaiņām apkārtējā vidē vai arī līdz noteiktam auga ontogēnēzes posmam (Aly et al. 2011, Partida-Martinez and Heil 2011). Pēc latentā perioda endofītiskās sēnes var kļūt par patogēniem, saprotrofiem vai epifītiem, kā arī mijiedarboties ar citām augu audos atrodamajām sēnēm (Porras-Alfaro and Paul Bayman 2011).

Tas, vai endofītiskās sēnes un saimniekauga attiecības ir mutuālistiskas vai parazītiskas, ir atkarīgs no saimniekauga genotipa (Redman et al. 2001, Rodriguez and Redman 2008), jo endofītu gēnu ekspresija ir atbildes reakcija saimniekaugam. Tādējādi, nelielas ģenētiskās izmaiņas abu organismu genomos kontrolē attiecības starp saimniekaugu un endofītu (Kogel et al. 2006, Aly et al. 2011). Tas pierāda, ka atsevišķas sēņu sugas, kas spēj izmantīt attiecību modeli, var norādīt uz evolucionāro pāreju vai norāda, ka šīm sēnēm ir augsts ekoloģiskais plastiskums (Rodriguez and Redman 2008). Sēņu un auga attiecību modelis ir atkarīgs arī no saimniekauga sugas, jo vienas un tās pašas endofītiskās sēnes dažādos augos uzvedas atšķirīgi, piemēram, *Colletotrichum* ģints sēnes tiek klasificētas kā patogēni, tomēr tā var iesaistīties arī mutuālistiskās attiecībās ar augiem un nodrošināt tiem aizsardzību pret slimībām, sausumu un/vai veicināt augšanu (Redman et al. 2001).

Mutāciju ceļā arī no endofītiem var veidoties patogēni. *Arabidopsis* kolonizējošā *Piriformospora indica* viena gēna mutants samazina auga augšanu, kā arī sēnes iedarbības rezultātā samazinās sēklu raža salīdzinājumā ar nekolonizētiem augiem vai tiem augiem, kuru *Piriformospora indica* ir bez mutācijām. Izmaiņas gēnu ekspresijā, izplatības vietā, barības vielu daudzumā vai stresa ietekme endofītiem arīdžan var izraisīt patogenitāti (Porras-Alfaro and Bayman 2011).

Endofītiskās sēnes sintezē arī citus vērtīgus sekundāros metabolītus, piemēram, plaši izplatītā *Festuca pratensis* endofītiskā sēne *Neotyphodium uncinatum* sintezē savienojumus,

kas nodrošina saimniekauga aizsardzību pret zālēdājiem. Citas endofītiskās sēnes nodrošina augu aizsardzību pret baktērijām, piemēram, *Alternaria* sp., kas izolēta no *Sonneratia alba*, nodrošina aizsardzību pret *Staphylococcus aureus*, bet *Chalara* sp., kas izolēta no *Artemisia vulgaris*, nodrošina aizsardzību pret *Bacillus subtilis* (Aly 2010), savukārt *Beauveria bassiana* darbojas gan kā patogēno sēņu, gan insektu antagonists (Porras-Alfaro and Bayman 2011).

Endofītiskās sēnes spēj aizsargāt augus no patogēniem mikroorganismiem, aktivēt augu aizsardzības sistēmu, paaugstināt augu izturību pret oksidatīvo, sāls un karstuma stresu, producēt augu sekundāros metabolītus (Aly et al. 2011, Partida-Martinez and Heil 2011) un fitohormonus, kā arī mobilizēt saimniekauga barības vielu uzņemšanu no rizosfēras un veicināt augšanu (Schulz 2006). Šo īpašību dēļ šīs sēnes iespējams izmantot pavairošanā, piemēram, pētījums ar sakņu endofītisko sēni *Piriformospora indica* pierādīja, ka augu apstrāde ar sēni veicina augu augšana un biomasas pieaugumu (Varma et al. 1999). Visizteiktāk endofītisko sēņu pozitīvā ietekmi uz saimniekaugu augšanu novērojams apstākļos, kad saimniekaugs ir pakļauts stresam. Šāds pozitīvs efekts saistīts ar endofītsiko sēņu spēju producēt fitohormonus – giberelīnu un IES. Līdz šim augšanu veicošs efekts novērtos tādām endofītsikajām sēnēm kā *Phoma glomerata*, *Penicillium* sp. (Waqas et al. 2012), vairākām *Fusarium* sugām (*Fusarium proliferatum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium tricinctum*) (Tsavkelova et al. 2012, Khan et al. 2015), *Paecilomyces formosus* (Khan et al. 2012) un *Alternaria alternata* (Khan et al. 2015). Tieša endofītisko sēņu ietekme uz augšanu atklāta arī vairākām kokaugu sugām. Skotijas priedes un Norvēģijas egles sakņu endofīti veicina sakņu attīstību gan stādiem, gan spraudeņiem (Doty 2011).

Tie endofīti, kas ir latentie saprotrofi, kļūst aktīvi tūlīt pēc saimniekauga orgānu atmiršanas. Tādējādi saprotrofi, kas ir spējīgi kolonizēt dzīvus saimniekauga audus var sākt augt uzreiz pēc audu atmiršanas, iegūstot priekšrocības attiecībā pret tiem saprotrofiem, kuri organiskajā materiālā iekļūst vēlāk (Porras-Alfaro and Bayman 2011, Oses et al. 2008). Ir pierādīts, arī tas, ka liela daļa nobirās atrodamo saprotrofu ir cēlušies no endofītiem (Promputtha et al. 2007).

Sākotnēji augu materiālu kolonizē tādas saprotrofās sēnes kā *Mucor*, *Rhizopus* un citas zigomicēšu nodalījuma sēnes, kas bieži ir sastopamas augsnes vai trūdvielām bagātos materiālos, kā arī augu rizosfērā. Šajā kategorijā ietilpst arī dažas *Pithyium* sugas, kas kolonizē augsnē atrodamās augu atliekas, bet vēl labāk pazīstamas kā sakņu galu un citu sulīgu augu audu patogēni (Deacon 2006).

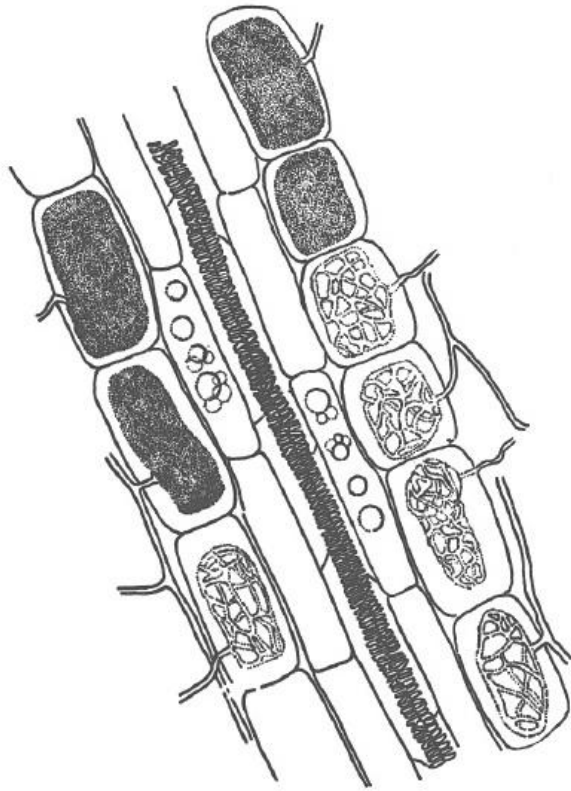
1.6.2. Rododendru sakņu mikroskopiskās sēnes

Zināmie rododendru endofīti ir *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Gliocladium*, *Aureobasidium*. Šos endofītus var atrast arī lapās, kurām ir sterilizēta virsma. Šī brīža pētījumos visbiežāk novērotās sēņu ģintis rododendru lapās *in vivo* ir *Phomopsis*, *Phoma*, *Alternaria*, *Collectotrichum* un *Cladosporium*. Šo ģinšu sēnes ir atrodamas dažādos neradnieciskos saimniekaugos. Tās ir konstatētas rododendros Japānā un Polijā. Latvijā izolētās *Guignardia* un *Pestalotiopsis* ir plaši sastopams rododendru lapu endofīts arī Japānā (Purmale et al. 2012). Savukārt no Somijā augošā *Rh. tomentosum* lapām izolētas tādas endofītiskās sēnes kā *Penicillium raciborskii*, *Fusarium sp.*, *Sphaeriothyrium filicinum*, *Penicillium namyslowskii*, *Sordaria fimicola*, *Pleosporeles sp.*, *Penicillium canescens*, *Arthrinium phaeospermum*, *Lecythophora sp.*, tostarp *Fusarium oxysporum*, kuras sintezētos savienojums izmanto pretvēža līdzekļos (Tejesvi et al. 2011).

Ir veikti pētījumi par endofītisko sēņu ietekmi uz auga pavairošanu *in vitro*, kuros novērota endofītisko sēņu pozitīvā ietekme uz augu augšanu un biomasas veidošanu (Varma et al. 1999), taču šādu pētījumu trūkst par klasiskajām pavairošanas metodēm.

Vēl viens augu un sēņu mijiedarbības veids ir mikoriza. Lielākā daļa sauszemes augu atrodas mutuālistiskās attiecībās ar saknes kolonizējošām mikorizas sēnēm (Cairney 2000).

Erikoīdā mikoriza (4. attēls) veido mutuālistiskas attiecības ar viršu rindai piederošajām *Ericaceae* un *Epacridaceae* dzimtām. Šis mikorizas veids ir īpaši nozīmīgs neauglīgās augsnēs augošiem augiem, kur augsnē esošais slāpeklis ir saistīts dažādos organiskos savienojumos. Slāpeklis augiem galvenokārt ir pieejams tikai caur sēnēm, kuras atrodas smalkajās saknēs (Peterson et al. 2004). Smalkāko sakņu epidermas šūnas kolonizējošo sēņu hifas veido iekššūnu hifu tinumus (Read 1996, Peterson et al. 2004). Identificētās sēņu sugas galvenokārt pieder *Ascomycotina* apakšnodalījumam (Peterson et al. 2004). Vislabāk pazīstamā erikoīdo mikorizu veidojošā sēne ir *Hymenoscyphus ericae*, kas ir dominantā suga Eiropā (Straker 1996, Berch et al. 2002). Taču zināms, ka erikoīdo mikorizu spēj veidot arī *Pezizella ericae* un *Oidiodendron maius* (Lin et al. 2010).



4. attēls Erikoīdā mikorizas kolonizētas *Epacris impressa* saknes epidermas šūnas (Read 1996).

Figure 4. *Epacris impressa* root epidermal cells root epidermal cells ericoid mycorrhiza.

No mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ divus gadus veca stāda saknēm ir izolētas tādas sēnes kā *Mortiarella* sp., *Hansfordia*, divas *Acremonium* ģints sēnes, kā arī *Calcarisporium arbuscula* (Dokane et al. 2012).

Calcarisporium arbuscula ir asku sēne, kas pieder *Hypocreales* rindai, *Clavicipitaceae* dzimtai (Hyde et al. 2011, Wijayawardene 2012).

Sākotnēji *C. arbuscula* tika izolēta no veselīgiem *Russula* un *Lactarius* augļķermeņiem un tika uzskatīts, ka *C. arbuscula* ir endofīts (Watson 1955). Pētījumiem turpinoties, tika atklāts, ka *C. arbuscula* piemīt zemas saprotrofās spējas, kā arī parazitiskas īpašības (Watson 1965) – spēja sadalīt hitīnu (Gray and Baxby 1968). Lēno augšanas īpašību dēļ, šī sēne ir spējīga izdzīvot augsnē tikai īsu laika periodu, kā arī nav spējīga konkurēt ar augsnes sēnēm kolonizējot sterilu substrātu, kas liek domāt par šīs sēnes parazitiskajām īpašībām. Taču *C. arbuscula* sintezē antibiotikas, kas inhibē daudzu sēņu augšanu, tādējādi sēņu augļķermeņi, kurus inficējusi *C. arbuscula* ir rezistenti citu sēņu izraisītajām infekcijām. Šīs īpašības dēļ var uzskatīt, ka *C. arbuscula* ir spējīga veidot endofītiskas attiecības ar atsevišķiem saimniekaugiem un pasargāt tos no mazāk specializētu sēņu infekcijas (Watson 1965).

Calcarisporium arbuscula ir izolēta arī no dažādiem augiem – *Dendrobium candidum*, *D. noble* (Yu et al. 2002), kā arī *Fagus* saknēm (Watson 1965).

Mortierella ģintij piederošie organismi ir plaši izplatītas augsnes sēnes (Bue'e et al. 2009, Nagy et al. 2011), šobrīd ir identificētas apmēram 100 sugas (Nagy et al. 2011). Ģints pieder Zigomicēšu (*Zygomycota*) nodalījumam, *Mortierellomycotina* apakštipam, *Mortierellales* rindai, *Mortierellaceae* dzimtai (Poll et al. 2010, Hoffmann et al. 2011). *Mortierellomycotina* apakštips izveidots 2011. gadā, atdalot *Mucorales* un *Mortierellales* rindas, kuras līdz šim veidoja *Mucoromycotina* apaštipu (Hoffmann et al. 2011).

Mortierella veidotās kolonijas ir baltā krāsā un bieži vien viļņveidīgi pārklājas, dažām sugām ir ķiploku vai sīpolu aromāts (Alexopoulos et al. 1996). Šai ģintij piederošajām sēnēm ir neregulāri septētas hifas, kā arī raksturīgi bazālie rizoīdi. Sporangijnesēji veidojas no micēlija vai gaisa hifām, tie parasti ir zaroti, retāk vienkārši. Sporangijos ir tikai viena vai vairākas sporas. Kolumella nav attīstījusies. Sporas ir apaļas vai elipsveida, ar gludu vai rievotu virsmu. *Mortierella* spp. veido kailas zigosporas. *Mortierella* sugas var būt homotalliskas, bet lielākoties tās ir heterotalliskas (Voigt and Woestemeyer 2001, Cannon and Kirk 2007, Shelest and Voigt 2014).

Sākotnēji *Mortierella* ģintij piederošās mikroskopās sēnes tika izolētas no sēņu augļķermeņiem, kuros tās parazitēja. Tomēr *Mortierella* sp. ir tipiski augsnes saprotrofi, tās aug uz ekskrementiem, mirstošiem augiem un makroskopiskajām sēnēm. Atsevišķos gadījumos ir novērots, ka *Mortierellales* ir cilvēku un dzīvnieku oportūniskie patogēni (Hoffmann et al. 2011).

Mortierella ģints sēnēm ir arī plašs komerciāli izmantojamo īpašību spektrs, tās ir spējīgas noārdīt herbicīdus (Badawi et al. 2009.) un hitīnu (Zhao et al. 2008), tomēr visplašāk tās pazīstamas ar spēju sintezēt lipīdus (Wu et al. 2015, Harde et al. 2016).

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. Eksperimentos izmantotā mūžzaļo rododendru šķirne

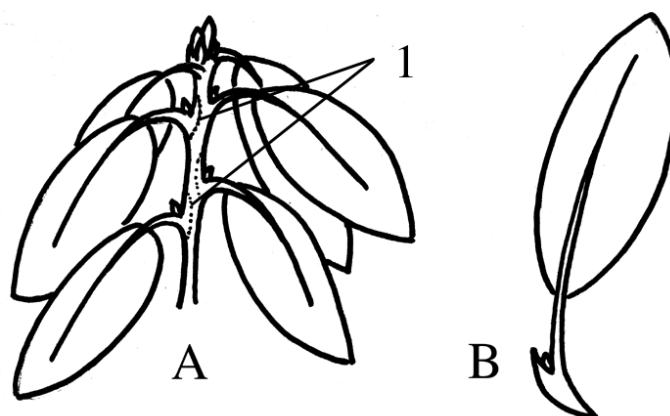
Eksperimentā izmantoja mūžzaļo rododendru šķirnes 'Babītes Lavanda' vienpumpura spraudeņus ar lapu. Šķirni 1979. gadā no Katavbas rododendra (*Rh. catawbiense* Michx.) brīvās apputeksnēšanās sējeņiem izdalījis R. Kondratovičs. Tā apstiprināta 2000. gadā (Leslie 2004). Mūžzaļo rododendru šķirnes 'Babītes Lavanda' krūmi mēdz būt 2-2,5 m augsti un 1,5 m plati un zied ar violetiem ziediem (Kondratovičs 2005).

2.2. Eksperimentos izmantotās mikroskopiskās sēnes

Endofītiskās sēnes *Calcarisporium arbuscula* un *Mortierella* sp. ir izolētas no mūžzaļo rododendru šķirnes 'Babītes Lavanda' 2 gadus vecu stādu saknēm. Tās audzēja uz kartupeļu dekstrozes agara barotnēm. *Mortierella* ģints sēnes turēja tumsā, istabas temperatūrā, bet *C. arbuscula* tumsā +4°C temperatūrā (atbilstoši apstākļiem, kādos tās izdalītas no saknēm).

2.3. Rododendru pavairošana ar vienpumpura spraudeņiem ar lapu.

Eksperimentā no svaigi grieztiem kārtējā gada dzinumiem pagatavoja vienpumpura spraudeņus ar lapu, kas sastāvēja no pieaugušas lapas ar paduses pumpuru un 2-3 cm garu dzinuma fragmenta (5. attēls). Lapu plātnes saīsināja par 1/3, lai samazinātu transpirācijas virsmu.



5. attēls. Mūžzaļo rododendru vienpumpura spraudeņu ar lapu pagatavošana. A – rododendra dzinums, B – vienpumpura spraudenis ar lapu; 1 – griezuma līnijas (Kondratoviča 1981).

Figure 5. Making of elepidote rhododendron leaf-bud cuttings. A - rhododendron shoot, B - leaf-bud cuttings; 1 – cutting lines.

Eksperimentā izmantoja četrus eksperimentālos vienpumpura spraudeņu variantus – trīs apstrādes variantus un kontroli. Divu apstrādes variantu spraudeņiem stumbra ievainojuma virsmu apstrādāja ar rododendru sakņu endofītisko sēņu *Mortierella* sp. un *Calcarisporium arbuscula* sporu suspensiju un talka pulveri. Vienam apstrādes variantam spraudeņu stumbra ievainojuma virsmu apstrādāja ar 1 % indolilsviestskābes (ISS) - talka pulveri. Kontroles varianta spraudeņiem stumbra ievainojuma virsmu apstrādāja ar tīru talka pulveri.

Abas eksperimentā izmantotās endofītiskās sēnes iepriekš ir izolētas no mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ divgadīga stāda saknēm. Tās izdalītas un saglabātas kultūrā uz kartupeļu dekstrozes agara (KDA) barotnēm. Suspensijas iegūšanai 1 cm² lielu gaisa micēlija fragmentu sajauc ar 20 ml destilēta ūdens un mikroskopiski, izmantojot hemocitometru noteica sēņu sporu koncentrāciju (Parsa et al. 2013). Sporu uzskaiti veica 10 atkārtojumos. Sporu koncentrācija abu sēņu suspensijās sasniedza 3×10^5 sporas ml⁻¹.

Spraudeņus spraudeņoja plastmasas dēstu kastēs (30 × 60 × 10 cm), kurās kā substrātu izmantojot kūdras un pussatrūdējušu priežu skuju maisījumu (pH 4.2). Substrātu pirms spraudeņošanas samitrināja. Ar piķējamā irbulīša palīdzību izveidoja bedrītes, kurās ievietoja spraudeņu dzinuma daļu līdz paduses pumpuram. Substrātu ap spraudeņiem nedaudz sablīvēja, lai, viegli pavelkot aiz lapas, spraudeņi turētos substrātā. Kastes nosedza ar plēvi un par normālu mitruma režīmu liecināja ūdens kondensāta pilieni uz plēves iekšējās virsmas. Spraudeņus turēja 23 °C temperatūrā dienā un 20 °C temperatūrā naktī, ar 16 h ilgu fotoperiodu.

Anatomisko preparātu pagatavošanai materiālu ievāca no 1. līdz 5. dienai, katru dienu un turpmāk katrā trešajā, respektīvi, 8., 11., 14., 17., 20., 23., 26., 29. dienā pēc spraudēšanas, pa 9 spraudējiem no katra apstrādes varianta. Trīs no ievāktajiem spraudējiem izmantoja anatomisko preparātu pagatavošanai, savukārt ievāktos spraudēņu lapas sasaldēja -20 °C, lai vēlāk tās varētu izmantot peroksidāzes aktivitātes noteikšanai.

2.4. Anatomisko preparātu pagatavošana un izpēte

Paraugus pēc ievākšanas fiksēja FEE (formalīns - etiķskābe - etanols) šķīdumā. 100 ml fiksatora (Ruzin 1999) pagatavošanai izmantoja:

- etanols 96% – 50ml;
- ledus etiķskābe – 5ml;
- formalīns (37% formaldehīds) – 10ml;
- destilēts ūdens – 35ml.

Pēc paraugu uzglabāšanas fiksatorā FEE paraugus pakāpeniski atūdeņoja etanola un terc-Butanola (TBA) šķīdumos (1. tabula) (Ruzin 1999).

1. tabula

Atūdeņošanas shēma ar Terc-Butanola maisījumiem.

Table 1.

Dehydration schema by Tert - Butanol mixture.

Nr. p. k.	96 % etanols (ml)	100 % etanols (ml)	Destilēts ūdens (ml)	TBA (ml)	Vazelīneļļa (ml)	Ekspozīcijas laiks (h)
1.	50		40	10		24
2.	50		30	20		24
3.	50		15	35		24
4.	50			50		24
5.		25		75		24
6.		25		75		24
7.				100		24
8.				100		24
9.				67	33	24

Pēc atūdeņošanas paraugiem veica histovaska (DiaWax, Diapath, Itālija) infiltrāciju.

1. Vispirms nolēja 1/3 tilpuma TBA un vazelīneļļas maisījuma un aizstāja to ar tādu pašu tilpumu tīra izkausēta histovaska, trauku bez vāka ievietoja termostatā 58 °C.

2. Pēc 24 stundām nolēja pusi maisījuma tilpuma un aizstāja ar tādu pašu tilpumu tīra izkausēta histovaska.

3. Procedūru atkārtoja 3 reizes ik pēc 24 h.

4. Histovaska infiltrāciju pēdējais solis bija visa TBA un vazelīneļļas maisījumu noliešana un aizstāšana ar tīru izkausētu histovasku.

5. Šo soli atkārtoja 3 reizes ik pēc 24h (Ruzin 1999).

Infiltrētos paraugus katru atsevišķi pārlēja ar histovasku un ievietoja atpakaļ termostatā uz 24 stundām. Pēc izņemšanas no termostata paraugiem ļāva sacietēt. Sacietējušo materiālu montēja uz rotācijas mikrotoma (Leica RM 2145 – Rotary Microtome, Leica Microsystems Nussloch GmbH) apaļajā paraugu turētājā, un pagatavoja 20 µm biezu griezumu sērijas. Griezumus ievietoja ūdenī (ūdens temperatūra +50°C), no kurienes tos izņēma ar priekšmetstikliem, kas iepriekš noklāti ar olas baltumu.

Priekšmetstiklus ar griezumiem ievietoja priekšmetstiklu turētājā un apstrādāja ar sekojošiem šķīdumiem:

- 100% ksilols – 10 min
- 100% ksilols – 10 min
- 100% etanols-ksilols (1:1) – 2min
- 96% etanols – 2min
- 70 % etanols – 2min
- 50 % etanols – 2min
- Destilēts ūdens – 2min
- Astra zilais – safranīns – 1min
- Destilēts ūdens – 2min
- Destilēts ūdens – 2min
- Destilēts ūdens – 2min
- 96% etanols – 2min
- 96% etanols – 2min
- 100% etanols – 2min

- 100% Etanols-ksilols (1:1) – 2min
- 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 veica, izmantojot darba staciju Dell Precision™ T7400 un datorprogrammu Image-Pro Plus v. 6.2.

2.5. Sēņu izolēšana un noteikšana

Endofītiskās sēnes no spraudeņu stumbriem un saknēm izolēja uz KDA.

Lai iegūtu 0,5 l kartupeļu dekstrozes agara barotnes izmantoja 150 g kartupeļu, 5 g dekstrozes un 10 g agara. Nemizotus kartupeļus nomazgāja, sagrieza nelielos gabaliņos, vārīja 20 min un nolēja. Tad tam pievienoja dekstrozi, agaru un nepieciešamības gadījumā papildināja ar ūdeni līdz 0,5 l šķīduma.

Sagatavotās barotnes un stikla Petri plates, kurās vēlāk salēja šķīdumus, autoklāvēja 20 min 121 °C 1 atm. spiedienā.

Lai pārlicinātos, vai inokulācija notikusi veiksmīgi, endofītiskās sēnes izolēja no vienpumpura spraudeņu stumbriem rizoģenēzes laikā. Divas un četras nedēļas pēc spraudeņošanas, trīs apstrādāto spraudeņu stumbrus no katra apstrādes varianta, ar rokas mikrotomu un bārdas nazi sagrieza ~25 µm biezus griezumus. Stumbra fragmentus 2 minūtes sterilizēja ar 3,5% nātrija hipohlorītu (70% balinātājs ACE) un trīs reizes skaloja ar destilētu, autoklāvētu ūdeni. No katra spraudeņa ~ 8 griezumus lika uz iepriekš sagatavotām kartupeļu dekstrozes agara barotnēm. Pēc tam, kad izolētās endofītiskās sēnes bija izaugušas, tās katru atsevišķi pārsēja uz barotnēm.

Sēņu izolēšanai no apsāknotajiem spraudeņiem izmantoja trīs spraudeņus no katra apstrādes varianta un kontroles varianta. Sēnes izolēja no vienpumpura spraudeņu saknēm, kuras ar skalpeļa palīdzību sadalīja nelielos fragmentos un sterilizēja tāpat kā stumbrus. No katra spraudeņa 10 sakņu fragmentus lika uz iepriekš sagatavotām KDA barotnēm tā, lai sakņu fragmenti savstarpēji nesaskartos, ar sterilizētu filtrpapīru atsūca lieko mitrumu. Pēc tam, kad izolētās endofītiskās sēnes bija izaugušas, tās katru atsevišķi pārsēja uz barotnēm.

Sākotnējo sēņu piederību noteica, balstoties uz morfoloģiskajām pazīmēm, un vajadzības gadījumā veica mikroskopēšanu.

2.6. Gvajakola peroksidāzes aktivitātes noteikšana

Gvajakola peroksidāzes aktivitātes noteikšanai izmantoja šķirnes 'Babītes Lavanda' vienpumpura spraudēņu lapas. No katra varianta ievāca 9 spraudēņus - tīrs bioloģiskos atkārtojumus - un izmantoja 0,5 g augu materiāla no katra atkārtojuma. Lapas sasaldēja šķidrā slāpekļī un saberza ar piestu porcelāna tīģelī. Enzīmu ekstrahēšanai izmantoja 25 mmol l⁻¹ HEPES/KOH buferi (pH 7.2), kas sastāvēja no 1 mmol l⁻¹ EDTA, 0.8 % Triton X-100 un 3 % polivinilpolipirrolidona. Enzīmus ekstrahēja 15 min 4 °C temperatūrā. Homogenātu centrifugēja 20 min, ar paātrinājumu 13000 g. Analīzēm izmantoja supernatantu (Andersone, Ievinsh 2002).

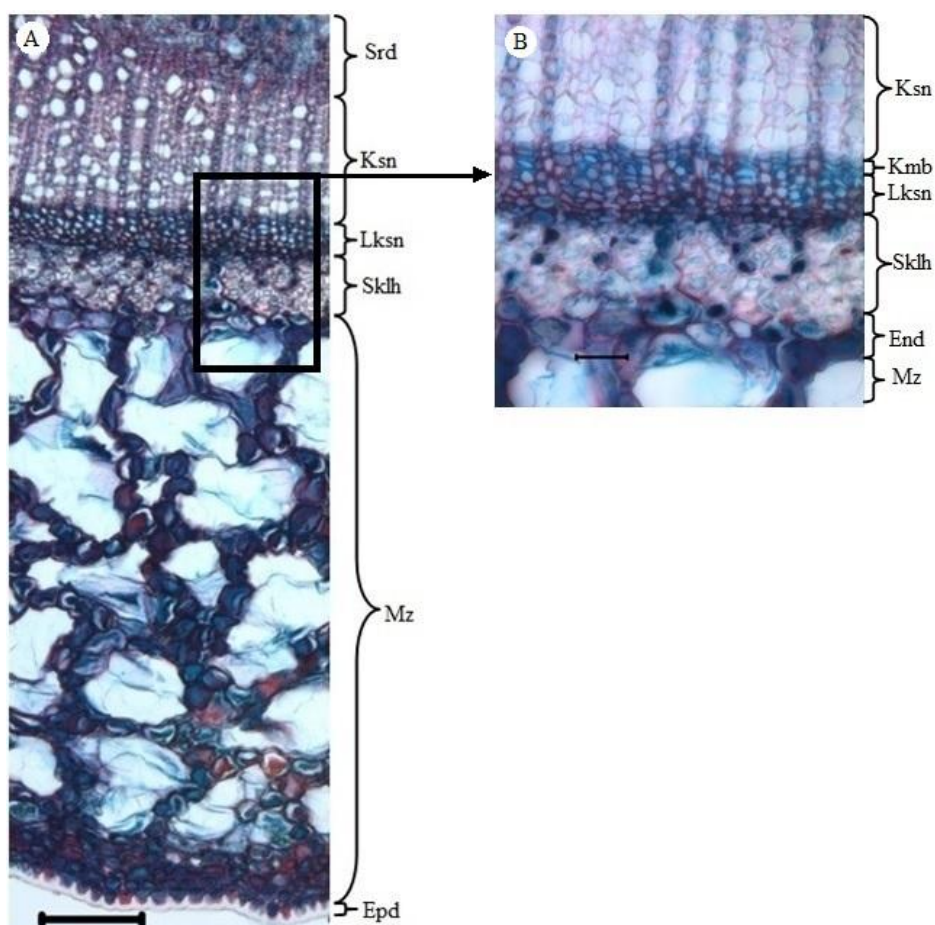
Peroksidāzes aktivitāti mērīja ar spektrofotometru 470 nm viļņu garumā. Reakcijas maisījums sastāvēja no 2 ml 50 mmol l⁻¹ Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ bufera (pH 7.0) ar 10 mmol l⁻¹ gvajakola, 0,5 ml 0,03 mol l⁻¹ H₂O₂ un 0,1 ml enzīmu ekstrakta. Kā kontrolšķīdumu izmantoja reakcijas šķīdumu pirms H₂O₂ pievienošanas. Enzīma aktivitāti aprēķināja kā absorbcijas izmaiņas minūtē uz 1 g audu svaigās masas.

3. REZULTĀTI

3.1. Mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ vienpumpura spraudeņu stumbra un adventīvo sakņu veidošanās anatomiskais raksturojums

Spraudeņu anatomisko izpēti veica mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ vienpumpura spraudeņos to adventīvo sakņu veidošanās laikā.

Lai noskaidrotu, kā notiek adventīvo sakņu veidošanās vienpumpura spraudeņos dažādiem apstrādes variantiem un kāda ir endofītisko sēņu ietekme uz apsākšanās procesu, veica spraudeņu anatomisko izpēti eksperimenta sākumā (6.attēls).



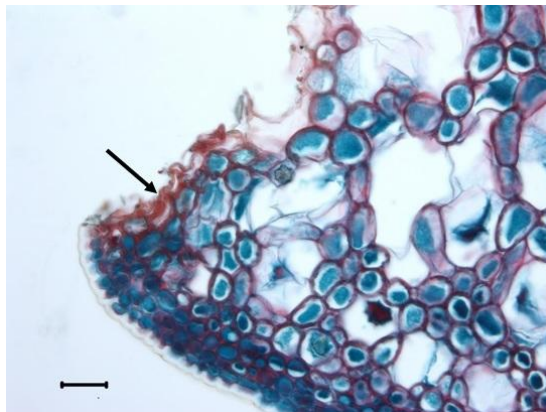
6. Attēls. Rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ kontrolas varianta vienpumpura spraudeņa stumbra anatomiskā uzbūve 1. dienā pēc spraudeņošanas. Srd- serde, Ksn – koksne, Kmb – kambijs, Lksn – lūksne, End – endoderma Mz – miza, Sklh - sklerenhīma, Epd – epiderma. Nogrieznis atbilst: A-100 μm , B – 30 μm .

Figure 6. Anatomical structure of rhododendron cultivar ‘Babītes Lavanda’ stem of leaf-bud cutting 1 day after insertion in substrate in untreated variant.

Srd – pith, Ksn – xylem, Kmb – cambium, Lksn – phloem, Mz – cortex, End – endodermis, Sklh – sclerenchyma, Epd – epidermis. Scale bar: A-100 μm , B – 30 μm .

Mūžzaļo rododendru šķirnes 'Babītes Lavanda' dzinumus sastāv no epidermas, mizas, lūksnes, kambija, koksnes un serdes.

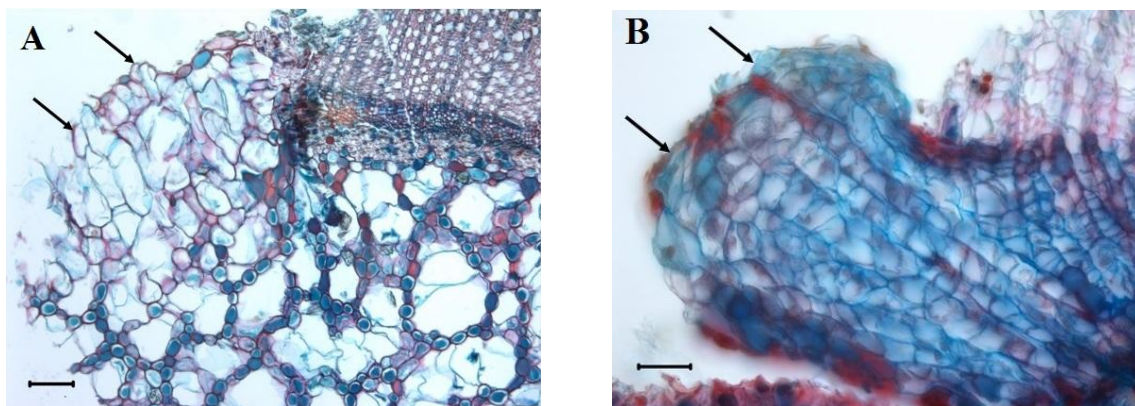
Eksperimenta pirmajās dienās varēja novērot nekrotisku audu slāņa veidošanos (7. attēls) uz ievainojuma virsmas. Griezuma izdarīšanas laikā ievainotās mizas šūnas gāja bojā un izveidoja aizsargslāni.



7. attēls. Nekrotisko audu slānis (bulta) rododendru šķirnes 'Babītes Lavanda' kontrolas varianta vienpumpura spraudeņiem 2. dienā pēc spraudeņošanas. Nogrieznis atbilst 50 μm .

Figure 7. Layer of necrotic cells (arrow) of rhododendron cultivar 'Babītes Lavanda' leaf-bud cutting 2 days after insertion in substrate in untreated variant. Scale bar - 50 μm .

Audu nekrotizēšanās ievainojuma vietā visiem eksperimentālajiem variantiem norisinājās vienlaicīgi, līdzīgi kā mizas rētaudu un kallusa veidošanās (8. attēls), kas bija nākošais anatomiski novērojamais posms.

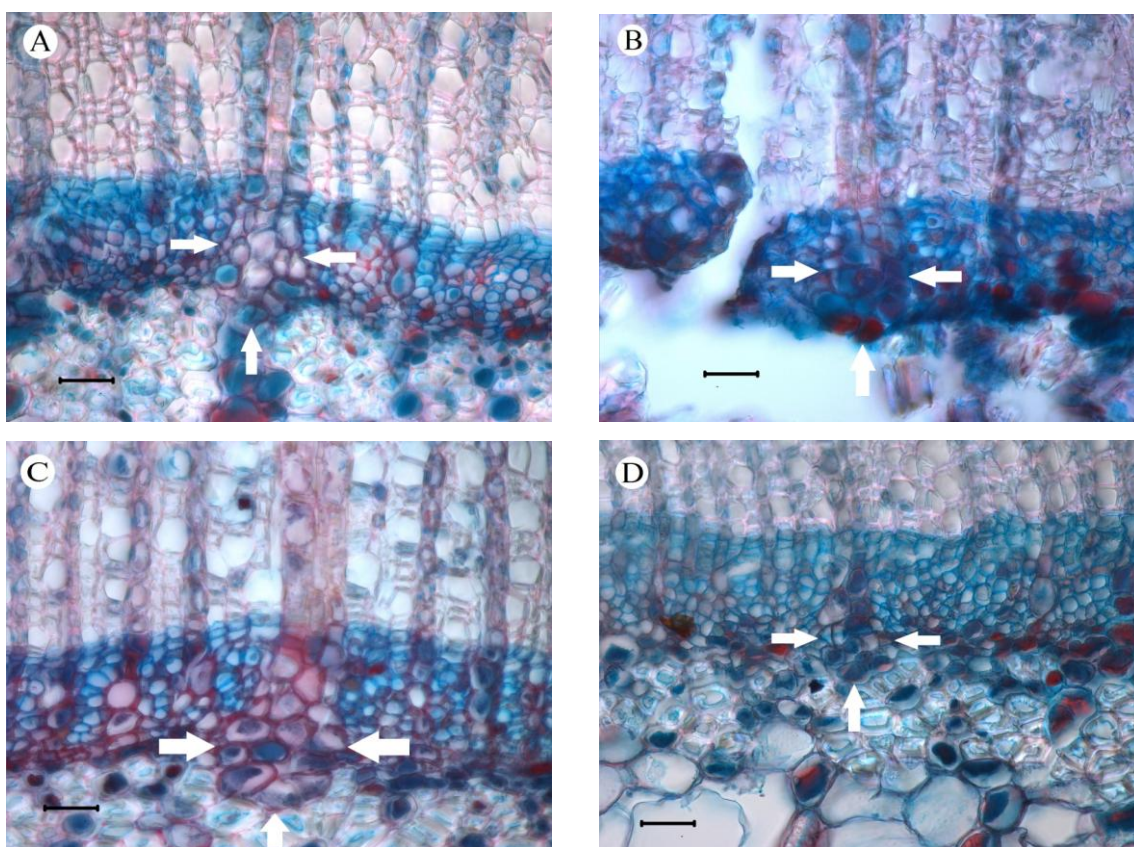


8.attēls. A Rododendru šķirnes 'Babītes Lavanda' vienpumpura spraudeņu A - mizas rētaudi (bultas) 4. dienā pēc spraudeņošanas; B - kalluss (bultas) 8. dienā pēc spraudeņošanas. Nogrieznis atbilst: A - 100 μm ; B - 30 μm .

Figure 8. Elepidote Rhododendron cultivar 'Babītes Lavanda' leaf-bud cutting A –scar tissues of cortex (arrows) 4 days after insertion in substrate in untreated variant; B - Callus cells (arrows) 8 days after insertion in substrate in untreated variant. Scale bar: A - 100 μm ; B - 30 μm .

Pirmie mizas rētaudi novērojami četras dienas pēc spraudņošanas, savukārt labi izveidojies kalluss visos eksperimentālajos variantos redzams astoņas dienas pēc spraudņošanas. Kallus un mizas rētaudi bija novērojami kā nediferējusies šūnu grupa, kas veidojās ievainojuma vietā.

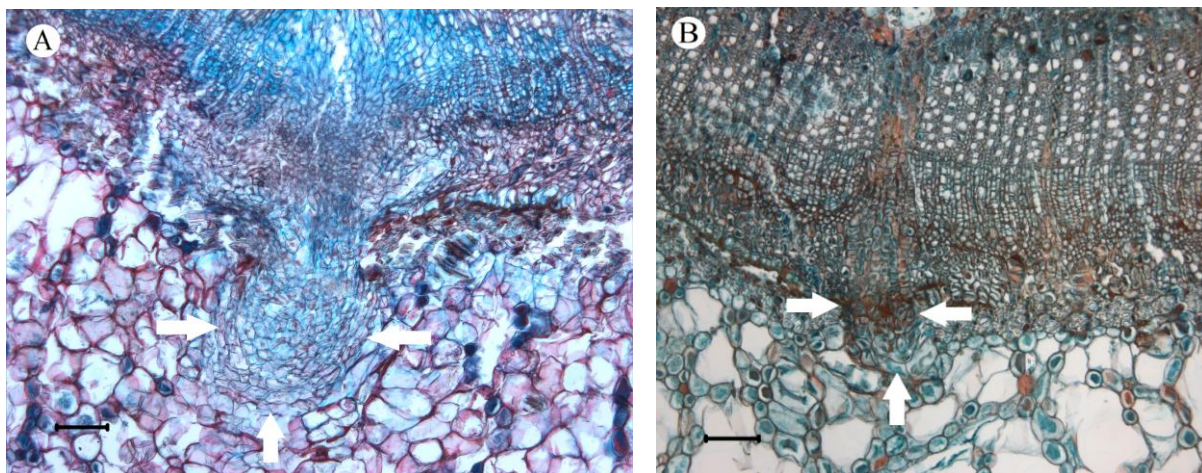
Nākamais anatomiski konstatējama posms bija adventīvās saknes iniciāļa veidošanās (9. attēls), kad lūksnes staru paplašinājumu vietās novēroja šūnu grupas, kas veidoja ieapaļas formas struktūras. Visātrāko iniciāļu veidošanos uzrādīja *C. arbuscula* apstrādes varianta spraudņi, kam pirmos iniciāļus konstatēja jau 3. dienā pēc spraudņošanas. Spraudņiem, kuru apstrādei izmantoja 1 % ISS un apstrādi ar endofītisko sēni *Mortierella* sp. pirmie iniciāļi bija novērojami 4. dienā pēc spraudņošanas, savukārt kontroles variantam - 5. dienā pēc spraudņošanas.



9. attēls Adventīvo sakņu iniciāļi (bultas) mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ vienpumpura spraudņiem ar lapu: A - kontrolres variantam 5 dienas pēc spraudņošanas; B – 1 % ISS apstrādes variantam 4. dienā pēc spraudņošanas; C - *Calcarisporium arbuscula* apstrādes variantam 3. dienā pēc spraudņošanas; D - *Mortierella* sp. apstrādes variantam 4 dienas pēc spraudņošanas. Nogriezis atbilst 30 μm.

Figure 9. Adventitious root initial (arrows) in leaf-bud cuttings of elepidote rhododendron cultivar ‘Babītes Lavanda’ A – control 5 days after insertion in substrate; B - treated with 1 % IAA 4 days after insertion in substrate; C - treated with *Calcarisporium arbuscula* 3 days after insertion in substrate; D - treated with *Mortierella* sp. 4 days after insertion in substrate. Scale bar - 30 μm.

Sakņu aizmetņu veidošanos novēroja diviem apstrādes variantiem (2. tabula) – spraudējiem, kas apstrādāti ar endofītisko sēni *Mortierella* sp. 11. dienā pēc spraudējošanas un spraudējiem, kas apstrādāti ar 1 % ISS 23. dienā pēc spraudējošanas (10. attēls). Anatomiskajos preparātos novērotie saknes aizmetņi bija pārrāvuši sklerenhīmas gredzenu un sākuši augšanu caur mizu. Saknes aizmetņu attīstības gaitā bija sākusī veidoties saknei raksturīgā forma un šūnu izkārtojums.



10. attēls. Saknes aizmetnis (bultas) mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ vienpumpura spraudenim: A - 1 % ISS apstrādes variantam 23. dienā pēc spraudējošanas; B - *Mortierella* sp. apstrādes variantam 11. dienā pēc spraudējošanas. Nogrieznis atbilst: 100 μ m.

Figure 10. Root primordia (arrows) in leaf-bud cutting of elepidote rhododendron cultivar ‘Babītes Lavanda’: A - treated with 1 % IAA 23 days after insertion in substrate; B - treated with *Mortierella* sp. 11 days after insertion in substrate. Scale bar - 100 μ m.

Kontroles variantā un apstrādes variantā ar endofītisko sēni *C. arbuscula* sakņu aizmetņus nenovēroja.

Divus mēnešus pēc eksperimenta sākuma, novērtēja spraudēņu apsākņošanās procentuālu iznākumu. Anatomisko novērojumu galvenie rezultāti, apsākņošanās procentuālais iznākums eksperimenta gaitā, kā arī spraudēņu dzīvotspējas procentuālais iznākums ilgākā laika periodā apkopoti 2. tabulā.

Anatomisko struktūru attīstība mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ vienpumpura spraudeņiem ar lapu un tālāka spraudeņu attīstība.

Table 2

Development of anatomical structures in elepidote rhododendron cultivar ‘Babītes Lavanda’ during formation of adventitious roots and further development.

Variants	Pirmais saknes iniciāls (dienas pēc spraudeņošanas)	Pirmais saknes aizmetnis (dienas pēc spraudeņošanas)	Apsakņotie spraudeņi 2 mēnešus pēc spraudeņošanas (%)	Apsakņotie spraudeņi 7 mēnešus pēc spraudeņošanas (%)
Kontrole	5. diena	29 dienu laikā nenovēroja	96 %	58 %
1 % ISS	4. diena	23. diena	94 %	73 %
<i>Calcarisporium arbuscula</i>	3. diena	29 dienu laikā nenovēroja	92 %	70 %
<i>Mortierella</i> sp.	4. diena	11. diena	85 %	47 %

Sākotnēji *C. arbuscula*, 1 % ISS un kontroles varianti uzrādīja līdzīgus rezultātus - apsakņoto spraudeņu skaits bija > 90 %, savukārt apstrāde ar *Mortierella* sp. nodrošināja veiksmīgu apsakņošanās procesu 85 % apstrādāto spraudeņu.

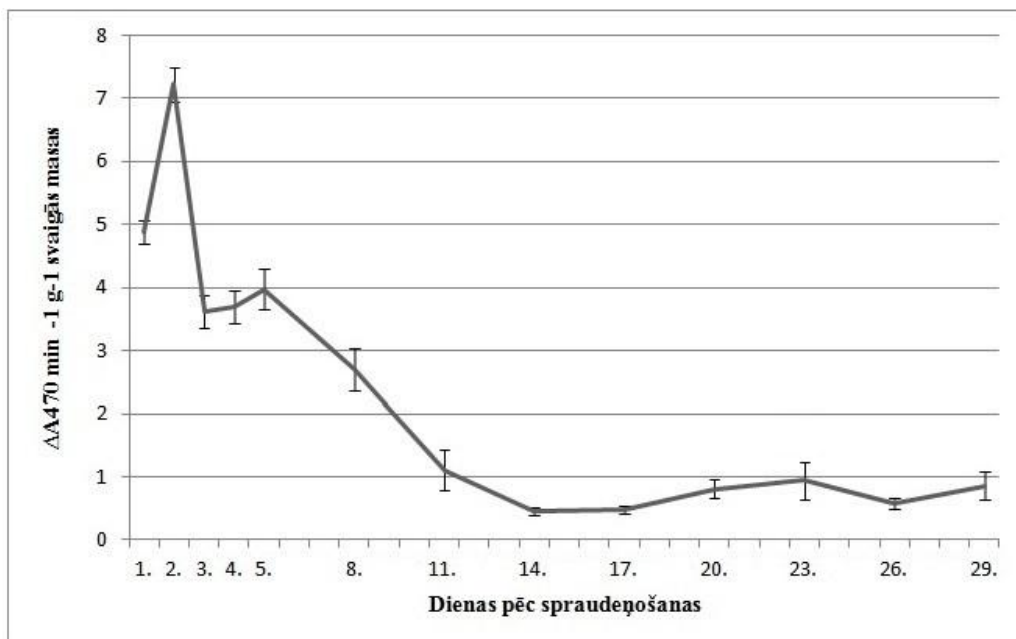
Pirms izstādīšanas ārā apstākļos spraudeņu aklimatizācija notika siltumnīcās, kur augšanas apstākļi vairs netiek stingri kontrolēti. Šādos apstākļos ne visiem apsakņotajiem spraudeņiem bija pietiekami augsta adaptācijas spēja un no sākotnēji apsakņotajiem spraudeņiem visaugstāko dzīvotspēju ilgākā laika periodā uzrādīja tie spraudeņi, kuru apstrādei izmantoja augšanas regulatoru – 1 % ISS un endofītisko sēni *C. arbuscula*, savukārt vissliktāk apkārtējās vides pārmaiņām pielāgojās kontroles varianta spraudeņi, kā arī tie mūžzaļo rododendru spraudeņi, kuru apstrādei izmantoja *Mortierella* sp. sporu suspensiju.

Lai pārbaudītu, vai endofītiskās sēnes *Mortierella* sp. un *C. arbuscula* ir kolonizējušas vienpumpura spraudēju audus, eksperimenta beigās veica atkārtotu sēņu izolēšanu. No vienpumpura spraudēju stumbra atkārtoti izolēja tikai *C. arbuscula*.

3.2. Mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ vienpumpura spraudēju peroksidāzes aktivitāte adventīvo sakņu veidošanās laikā

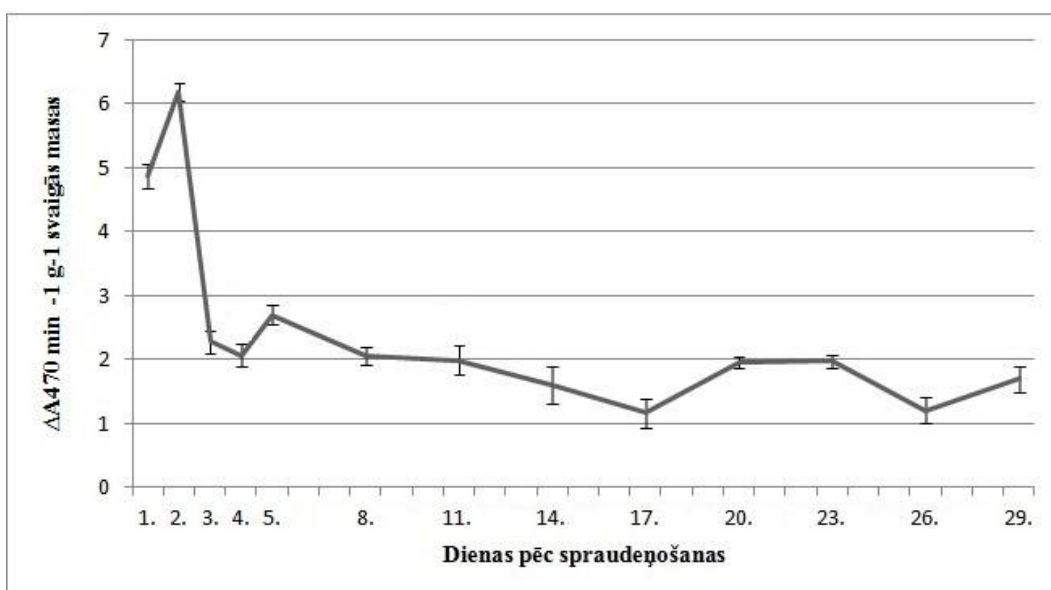
Lai sekotu rizoģenēzes procesa norisei, kā marķieri pētījumā izmantoja peroksidāzes aktivitātes izmaiņas mūžzaļo rododendru lapās. Tā kā anatomiskajiem pētījumiem izmantoja spraudēju pamatnes, spraudēju lapu izmantošana peroksidāzes pētījumiem nodrošināja to, ka peroksidāzes aktivitāte tiek noteikta tiem pašiem paraugiem, kuri tiek mikroskopēti.

Mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ vienpumpura spraudēju 1 % ISS apstrādes variantam (11. attēls) un *Mortierella* sp. apstrādes variantam (12. attēls) sākotnēji novērojams peroksidāzes aktivitātes straujš kāpums līdz eksperimenta 2. dienai, kam sekoja straujš peroksidāzes aktivitātes kritums līdz 3. dienai 1 % ISS apstrādes variantam un līdz 4. dienai *Mortierella* sp. apstrādes variantam. Abos apstrādes variantos novēroja nelielu peroksidāzes aktivitātes pieaugumu līdz 5. dienai, kam sekoja peroksidāzes aktivitātes samazinšanās līdz 14. dienai 1 % ISS apstrādes variantam un līdz 17. dienai *Mortierella* sp. apstrādes variantam. Tālāk abiem apstrādes variantiem sekoja nelielas peroksidāzes svārstības līdz eksperimenta beigām.



11. attēls. Peroksidāzes aktivitātes izmaiņas rizoģenēzes laikā mūžzaļo rododendru šķirnes 'Babītes Lavanda' vienpumpura sprauņos 1 % ISS apstrādes variantam.

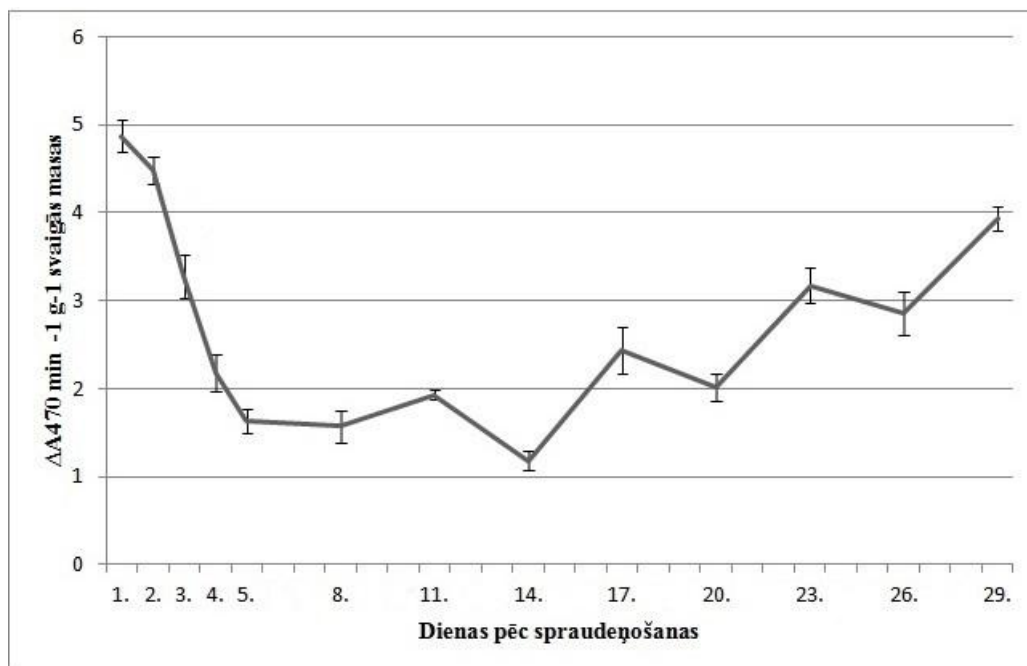
Figure 11. Change in peroxidase activity in leaf-bud cutting of elepidote rhododendron cultivar 'Babītes Lavanda' treated with 1 % IAA.



12. attēls. Peroksidāzes aktivitātes izmaiņas rizoģenēzes laikā mūžzaļo rododendru šķirnes 'Babītes Lavanda' vienpumpura sprauņos *Mortierella* sp. apstrādes variantam.

Figure 12. Change in peroxidase activity in leaf-bud cutting of elepidote rhododendron cultivar 'Babītes Lavanda' treated with *Mortierella* sp.

Calcarisporium arbuscula apstrādes variantam nebija novērojams peroksidāzes aktivitātes pieaugums eksperimenta 2. dienā, kā tas bija visos pārējos eksperimentālajos variantos (13. attēls), tomēr varēja novērot lēnāku tās aktivitātes samazināšanos.

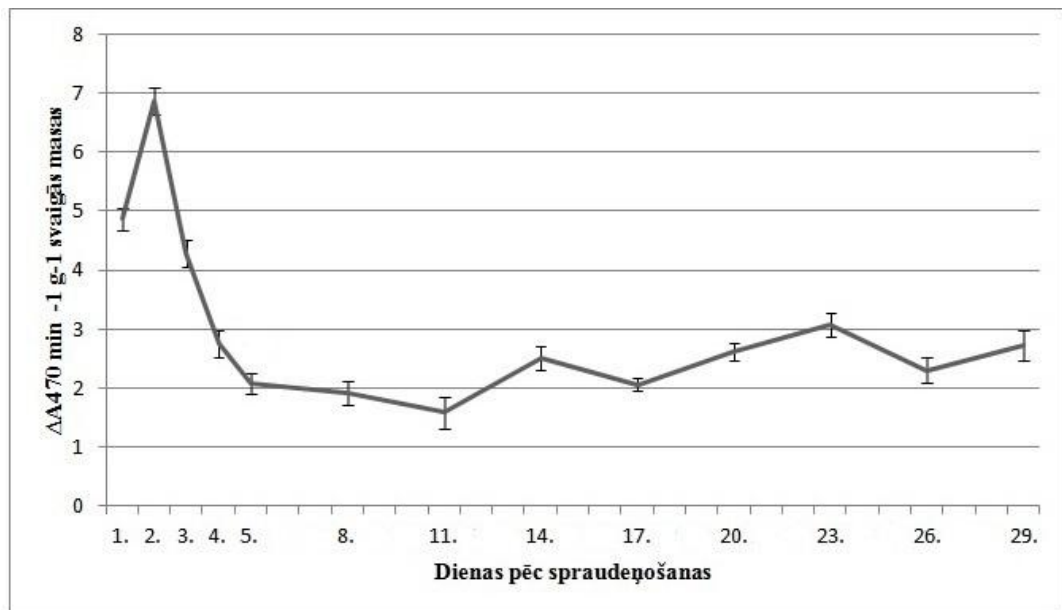


13. attēls. Peroxidāzes aktivitātes izmaiņas rizoģenēzes laikā mūžzaļo rododendru šķirnes 'Babītes Lavanda' vienpumpura sprauņos *Calcarisporium arbuscula* apstrādes variantā.

Figure 13. Change in peroxidase activity in leaf-bud cutting of elepidote rhododendron cultivar 'Babītes Lavanda' treated with *Calcarisporium arbuscula*.

Peroxidāzes aktivitātes kritumam līdz 5. eksperimenta dienai sekoja neliels pieaugums līdz 11. eksperimenta dienai ar kritumu 14. dienā, kam seko gvajakola peroksidāzes aktivitātes nevienmērīgs, bet straujš kāpums, kas norāda uz paaugstinātu peroksidāzes aktivitāti.

Kontroles variantam (14. attēls), tāpat kā 1 % ISS apstrādes variantam (11. attēls) un *Mortierella* sp.apstrādes variantam (12. attēls) līdz 2. dienai ir novērojams peroksidāzes aktivitātes pieaugums, kam sekoja peroksidāzes aktivitāte kritums līdz pat 11. dienai.



14. attēls. Peroksidāzes aktivitātes izmaiņas rizoģenēzes laikā mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ vienpumpura sprauņos kontroles variantam.

Figure 14. Change in peroxidase activity in leaf-bud cutting of elepidote rhododendron cultivar ‘Babītes Lavanda’ in control.

Pēc tam sekoja nevienmērīgs peroksidāzes aktivitātes kāpumu līdz pat eksperimenta pēdējai dienai.

4. DISKUSIJA

Par endofītisko sēņu ietekmi uz augu pavairošanu gan ar klasiskajām pavairošanas metodēm, gan audu kultūrās ir veikti dažādi pētījumi. Līdz šim galvenokārt aprakstīta endofītisko sēņu ietekme uz dažādiem morfoloģiskiem parametriem, piemēram, aprakstīta *Piriformospora indica* pozitīvā ietekme uz pelargoniju un puansetiju spraudēju sakņu skaitu un vidējo garumu (Druege et al. 2007), līdzīgi arī divi nenoteikti piparmētru endofītisko sēņu izolāti veicina piparmētru dzinumu augšanu *in vitro* apstākļos (Mucciarelli et al. 2003). Šādi rezultāti iegūti arī ar augstajām krūmmellenēm, kur *in vitro* audzētu augu apstrāde ar to sakņu endofītiskajām sēnēm *Lachnum* sp. un *Cadophora* sp. veicinājusi dažādu krūmmelleņu šķirņu dzinumu augšanu (Bizbani and Dames, 2015), taču anatomiski fizioloģisko pētījumu par endofītu izmantošanu gan klasiskās pavairošanas, gan mikropavairošanas procesā trūkst. Lai novērtētu endofītisko sēņu ietekmi uz mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ vienpumpura spraudēju ar lapu rizoģenēzi, ir svarīgi veikt ne vien konkrētu spraudēju anatomisko analīzi, bet arī izmantot kādu metodi, kas sniedz vispārīgu priekšstatu par eksperimenta materiālu. Bioķīmiskās analīzes var tikt lietotas kā marķieri, lai raksturotu spraudēju apsākņošanās procesu (De Klerk 1996). Kā marķieri rizoģenēzes procesa analīzē izmantoja gvajakola peroksidāzes aktivitātes dinamiku. Tā kā iepriekšējos pētījumos ir apstiprināts, ka peroksidāzes aktivitātes izmaiņas, kas raksturīgas rizoģenēzes procesam un klasiski konstatējamas mūžzaļo rododendru vienpumpura spraudēju pamatnēs, ir novērojamas arī spraudēju lapās (Megre et al. 2011), tad šajā pētījumā izmantoja mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ vienpumpura spraudēju lapas. Tas nodrošināja, ka spraudējus, kuru lapas izmantoja peroksidāzes aktivitātes noteikšanai, vēlāk mikroskopēja, lai precīzi noteiktu adventīvo sakņu veidošanās anatomiskās stadijas.

Eksperimenta sākumā anatomisko atbildes reakciju uz ievainojumu starp kontroles variantu un apstrādes variantiem nenovēroja, tādējādi var secināt, ka apstrāde ar endofītiskajām sēnēm un 1 % ISS neizraisīja izmaiņas kallusa un mizas rētaudu veidošanās procesā, lai gan literatūrā ir minēts, ka mikroskopiskās sēnes var ietekmēt augu metabolismu (Presti et al. 2015), tādējādi kavējot augu atbildes reakcijas uz ievainojumu – kallusa un mizas rētaudu veidošanos.

Peroksidāzes aktivitātes izmaiņas mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ vienpumpura spraudējos 1 % ISS un *Mortierella* sp. variantiem atbilst Gaspara 1997. gadā izveidotajai peroksidāzes aktivitātes liknei, ko var izmantot kā marķieri rizoģenēzes fāžu

raksturošanai. Indukcijas fāzē novērojams peroksidāzes aktivitātes kritums līdz minimumam, kam seko tās pieaugums līdz maksimumam iniciācijas fāzē. Savukārt, ekspresijas fāzē novērojama pakāpeniska peroksidāzes aktivitātes samazināšanās (Gaspar et al. 1997). Gan 1 % ISS, gan *Mortierella* sp. variantiem peroksidāzes aktivitātes līknēs ir novērojams sadalījums indukcijas, iniciācijas un ekspresijas fāzēs. Šāda likumsakarība novērota arī pētījumos ar zemeņkoka (*Arbutus unedo* L.) un parastās īves (*Taxus baccata* L.) dzinumu spraudeņiem (Metaxas et al. 2004). Vienīgā atšķirība, no klasiskās peroksidāžu aktivitātes dinamikas bija, ka šajā eksperimentā 1 % ISS, *Mortierella* sp. variantiem (11. un 12. attēls) iniciācijas fāzē pirms peroksidāzes aktivitātes krituma vispirms novēroja tās pieaugumu. Visticamāk tas saistīts ar atbildes reakciju uz ievainojumu (vienpumpura spraudeņiem ievainojuma virsma ir visā spraudeņa garumā), jo zināms, ka mehāniski bojājumi izraisa tūlītēju gvajakola peroksidāzes aktivitātes pieaugumu un paaugstinātu peroksidāzes gēnu ekspresiju (Minibayeva et al. 2015). Rizoģenēzes fāzes apstiprināja arī anatomiskie pētījumi – adventīvo sakņu iniciāļus abiem eksperimenta variantiem konstatēja iniciācijas fāzē 4. dienā (9. attēls). Lai gan sākotnēji abos variantos saknes iniciāļi veidojušies vienā dienā, turpmākā saknes aizmetņu attīstība norisinās atšķirīgi. *Mortierella* sp. variantam pirmo saknes aizmetni novēroja jau 11. dienā pēc spraudeņošanas, kamēr 1 % ISS eksperimenta variantam aizmetni novēroja 23. dienā pēc spraudeņošanas (10. attēls). Līdzīgi rezultāti iegūti arī ar mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Nova Zembla’ 1 % ISS spraudeņiem, kuriem 22. dienā konstatēja pirmo adventīvās saknes aizmetni (Dūmiņš 2015). Savukārt *Mortierella* sp. variantam adventīvās saknes aizmetņa ātro attīstību varētu skaidrot ar endofītiskās sēnes pozitīvo ietekmi uz rizoģenēzes procesu. Pētījumos ar *Mortierella* ģintij piederošo endofītisko sēni *Mortierella elongata* konstatēts, ka inokulētiem spraudeņiem novērojama izmainīta ar barības vielu uzņemšanu saistīto gēnu ekspresija, ārpusšūnas sekretēto proteīnu un plazmatiskās membrānas receptoru aktivitāte. Iespējams, *M. elongata* samazina auga aizsardzību, lai līdzsvarotu enerģijas resursus, kas nepieciešami auga augšanai un turpmākajam kolonizācijas procesam (Vilgalys et al. 2016).

C. arbuscula variantam nenovēroja peroksidāzes aktivitātes izmaiņas (13. attēls), kas atbilstu Gaspara 1997. gadā izveidotajai peroksidāzes aktivitātes izmaiņu liknei. Līdzīgi kā aprakstīts literatūrā (Gaspar et al. 1994, Gaspar et al. 1997., Nag et al. 2001), eksperimenta sākumā līdz 5. dienai novēroja strauju peroksidāzes aktivitātes samazināšanos, kas parasti ir raksturīgi indukcijas fāzei, kuras laikā anatomiskas izmaiņas netiek novērotas (Gaspar et al. 1994), taču *C. arbuscula* varianta spraudeņiem jau 3. dienā pēc spraudeņošanas konstatēja pirmo saknes iniciāli (9. attēls), kas ir neraksturīgi mūžzaļajiem rododendriem. Literatūrā

mūžzaļo rododendru šķirnes 'Babītes Baltais' vienpumpura spraudņiem pirmie adventīvo sakņu iniciāļi konstatēti 9. dienā (Megre et al. 2011), mūžzaļo rododendru šķirnes 'Babītes Lavanda' vienpumpura spraudņiem – 7. dienā (Dokāne 2010). Atšķirībā no pārējiem variantiem, *C. arbuscula* varianta vienpumpura spraudņiem nenovēroja peroksidāzes aktivitātes palielināšanos pirmajās eksperimenta dienās, kas, iespējams, varētu būt saistāms ar kādu peroksidāzes aktivitāti inhibējošu savienojumu klātbūtni sēnes suspensijā, ar ko pirms spraudņošanas apstrādāja spraudņus. Literatūrā aprakstīts, ka, sākoties infekcijas procesam, kurš sākotnēji bioķīmiskā līmenī notiek tāpat kā kolonizācijas process (Presti et al. 2015), mikroskopiskās sēnes izdala efektorus, kuru darbības rezultātā augos novērojama dažādu enzīmu, tajā skaitā arī peroksidāzes, aktivitātes samazināšanās (Zeilinger et al. 2015). Tas notiek, lai veiksmīgam infekcijas vai kolonizācijas procesa sākumā apspiestu saimniekauga aizsargreakciju (Rafiqi et al. 2012; Presti et al. 2015). Iespējams, arī *C. arbuscula* suspensija saturēja šos savienojumus, kuru darbības rezultātā nebija novērojams peroksidāzes aktivitātes pieaugums eksperimenta pirmajās dienās. Peroksidāzes aktivitātes kritumam līdz 5. eksperimenta dienai sekoja neliels pieaugums līdz 11. eksperimenta dienai ar kritumu 14. dienā un turpmāku nevienmērīgu peroksidāzes aktivitātes pieaugumu līdz eksperimenta beigām. Iespējams, tas saistāms ar endofītiskās sēnes iesaistīšanos spraudņa metabolisma procesos pēc vienpumpura spraudņu inokulācijas. Adventīvo sakņu aizmetņu attīstību šī varianta vienpumpura spraudņiem nenovēroja, taču eksperimenta beigās bija apsakņojušies 92 % spraudņu.

Līdzīgi kā 1 % ISS un *Mortierella* sp. variantam, kontroles variantam pirmajās eksperimenta dienās novēroja peroksidāzes aktivitātes pieaugumu, kam sekoja straujš peroksidāzes aktivitātes kritums līdz 5. eksperimenta dienai un turpmākas aktivitātes svārstības līdz eksperimenta beigām (14. attēls), kas tāpat kā *C. arbuscula* variantam, neatbilda Gaspara 1997. gadā izveidotajai peroksidāzes aktivitātes līknei. Saknes iniciāļu veidošanās kontroles variantā notika vislēnāk, kas norāda uz visu trīs apstrādes variantu pozitīvo ietekmi uz sakne iniciāļu veidošanos. Arī kontroles varianta anatomiskajos preparātos saknes aizmetņus nenovēroja.

Lai pārliecinātos par mūžzaļo rododendru vienpumpura spraudņu rizoģenēzes procesa sekmīgu norisi, divus mēnešus pēc spraudņošanas noteica spraudņu apsakņošanās procentuālo iznākumu. Sākotnēji kontroles variantā apsakņotu spraudņu skaits bija par 2 - 11 % lielāks nekā pārējos apstrādes variantos. Procentuāli visaugstāko rezultātu no šiem variantiem uzrādīja spraudņu apstrāde ar 1 % ISS.

Spraudeņu attīstības procesā ir būtiska ne vien spraudēju apsākņošanās, bet arī spēja pielāgoties apkārtējās vides mainīgajiem apstākļiem. Rododendru vienpumpura spraudēni apsākņojās kontrolētos augšanas apstākļos, bet aklimatizācija pirms izstādīšanas uz lauka notika siltumnīcās. Šādos apstākļos, kur gaisa temperatūra vairs netiek stingri kontrolēta un arī gaisa relatīvais mitrums variē, ne visi apsākņotie spraudēni bija spējīgi izdzīvot. Dzīvotspējīgo spraudēju skaitu atkārtoti noteica pēc septiņiem mēnešiem. Šajā uzskaitē konstatēja, ka kontroles varianta spraudēni nespēj tik labi pielāgoties mainīgajiem vides apstākļiem, iespējams, šiem spraudēniem nebija tik labi attīstīta sakņu sistēma. Vislabāko efektu spraudēju aklimatizācijā uzrādīja apstrāde ar 1 % ISS un mūžzaļo rododendru šķirnes ‘Babītes Lavanda’ sakņu endofītisko sēni *C. arbuscula*, kuras veiksmīga inokulāciju aptiprināja ar atkārtotu izolāciju. Abi apstrādes varianti ilgtermiņā nodrošināja dzīvotspēju vairāk nekā 70 % apstrādāto augu. Iespējams, ka *C. arbuscula* pozitīvā ietekme ir saistīta ar spēju producēt fitohormonus – giberelīnu un IES, līdzīgi kā citām literatūrā aprakstītajām endofītiskajām sēnēm (Tsavkelova et al. 2012, Waqas et al. 2012, Khan et al. 2015). *C. arbuscula* sintezē arī antibiotikas, kas inhibē daudzu sēņu augšanu, tādējādi šī endofītiskās sēne var pasargāt saimniekaugu no mazāk specializētu sēņu infekcijas un palielināt spraudēju dzīvotspēju ilgtermiņā (Watson 1965).

Apstrāde ar *Mortierella* sp.veicināja pirmo adventīvo sakņu attīstību vienpumpura spraudēniem, tomēr jau 2 mēnešus pēc spraudēnošanas šī apstrāde uzrādīja viszemāko apsākņošanās procentuālo iznākumu. Arī septiņus mēnešus pēc apstrādes šī negatīvā ietekme pastiprinājās, iespējams tas ir saistīts ar *Mortierella* ģints sēņu saprofītisko dzīvesveidu. Literatūrā aprakstīts, ka mikroskopiskās sēnes infekcijas un kolonizācijas laikā izdala dažādus savienojumus, kas spēj aktivēt dažādus ar fitohormoniem, piemēram, etilēnu, jasmonskābi vai salicilskābi, saistītus metabolisma ceļus (Presti et al. 2015). Iespējams, ka arī *Mortierella* sp. gadījumā sēnes suspensijai ir šāda ietekme, kas ir kā blakus ietekme pašam kolonizācijas procesam, kas tiešā veidā nav saistāma ar sēnes saprotrofo dzīvesveidu, kurš izpaužas eksperimenta beigu posmā.

Ņemot vērā, ka apstrāde ar 1 % ISS un *C. arbuscula* eksperimenta gaitā uzrādīja līdzīgus rezultātus, pētījumus ar šo endofītisko sēni būtu jāturpina, izvērtējot ietekmi uz vienpumpura spraudēju dzīvotspēju ilgākā laika periodā.

SECINĀJUMI

1. Mūžzaļo rododendru šķirnes 'Babītes Lavanda' vienpumpura spraudēju apstrāde ar 1 % ISS un šīs šķirnes sakņu endofītisko sēni *Calcarisporium arbuscula* nodrošina ātrāku sakņu iniciāļu veidošanos, lielāku apsakņošanās procentuālo iznākumu, kā arī dzīvotspēju ilgtermiņā.
2. Mūžzaļo rododendru šķirnes 'Babītes Lavanda' vienpumpura spraudēju apstrāde ar šīs šķirnes sakņu endofītisko sēni *Mortierella* sp. veicina ātrāku adventīvo sakņu iniciāļu un aizmetņu veidošanos, tomēr apsakņošanās procentuālais iznākums ir zemāks nekā citiem variantiem.
3. Visi izmantotie apstrādes varianti pozitīvi ietekmē mūžzaļo rododendru šķirnes 'Babītes Lavanda' vienpumpura spraudēju adventīvo sakņu iniciāļu veidošanos, salīdzot ar kontroles variantu.
4. Gvajakola peroksidāzes aktivitātes izmaiņas mūžzaļo rododendru šķirnes 'Babītes Lavanda' vienpumpura spraudēju lapās ir neviennozīmīgas, un to izmantošana par marķieri rizoģenēzes fāzu atpazīšanai ir šķirnes specifiska.

PATEICĪBAS

Paldies darba vadītājam Dr.biol., asoc. prof. Uldim Kondratovičam, konsultantēm Mag.biol. Kristīnei Dokānei, Dr.biol. Dacei Megrei.

LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Alexopoulos C. J., Mims C. W., Blackwell M. M. 1996. Introductory Mycology 4th Edition. New York : John Wiley & Sons, Inc., 868 p.
2. Aly A. H., Debbab A., Proksch P. 2011. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. – Applied Microbiology and Biotechnology, 90: 1829–1845.
3. Aly A. H., Debbab A., Kjer J., Proksch P. 2010. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. – Fungal Diversity, 41: 1–16.
4. Andersone U., Ievinsh G. 2002. Changes of morphogenic competence in mature. - Ann Bot., 90(2): 293–298.
5. Apine I., Freidenfelds K., Megre D., Dokane K., Kondratovics U. 2013. The Effect of Stock Plant Etiolation on Rooting and Overwinter Survival of Deciduous Azalea Cuttings. – Acta Hort., 990: 465 – 472.
6. Badawi N., Rønshede S., Olsson S., Kragelund B. B., Johnsen A. H., Jacobsen O. S., Aamand J. 2009. Metabolites of the phenylurea herbicides chlorotoluron, diuron, isoproturon and linuron produced by the soil fungus *Mortierella* sp. - Environmental Pollution, 157: 2806–2812.
7. Berch S. M., Allen T. R., Berbee M.L. 2002. Molecular detection, community structure and phylogeny of ericoid mycorrhizal fungi. – Plant and Soil, 244: 55–66.
8. Bills G. F., Christensen M., Powell M., Thorn G. 2004. Saprobiic soil fungi. – In: G.M. Muller, G. F. Bills, M. S. Foster (ed.), Biodiversity of Fungi Inventory and Monitoring Methods. Elsevier Academic Press, Burlington, MA, 273-294 pp.
9. Braune W., Leman A., Taubert H. 1999. Pflanzenanatomisches Praktikum I. Berlin: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 368 S.
10. Bue'e M., Reich M., Murat C., Morin E., Nilsson R. H., Uroz S., Martin F. 2009. 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. – New Phytologist, 184: 449–456.
11. Bumbura M., Jaudzeme V., Muižarāja E., Pētersone A. 1967. Augu morfoloģija un anatomija. Zvaigzne, Rīga. 507 lpp.
12. Cairney J. W. G., 2000. Evolution of mycorrhiza systems. – In: Naturwissenschaften - Springer 87: 467–475S.
13. Cannon P. F., Kirk P. M. 2007. Fungal Families of the World, CABI. 456 pp.

14. Cullen J. 2005. Hardy Rhododendron Species: A Guide to Identification. Edinburgh: Timber Press, 496 pp.
15. Czekalski M. 1988. Propagation of *Rhododendron maximum* and *Rhododendron smirnowii* by stem cuttings. - Acta Hort., 226: 573–576.
16. Da Costa C. T., De Almeida M.R., Ruedell C. M., Schwambach J., Maraschin F. 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., 14:133.
17. Davies P. J. 2010. PLANT HORMONES: Biosynthesis, Signal Transduction, Action! Rev. 3rd ed.. NY: Springer, 802 pp.
18. Deacon J. W. 2006. Fungal Biology 4th ed. UK: Blackwell Publishing, 371 pp.
19. De Klerk G. 1996. Markers of adventitious root formation. - Agronomie, 16: 609-616.
20. Dickison W. C. 2000. Integrative Plant Anatomy. Academic Press, San Diego. 533 p.
21. Dokane K., Lazdane M., Kondratovics U. 2012. Endophytic fungi in roots of elepidote rhododendron. – In: Scandinavian Plant Physiology Society 7th PhD Student Conference. Abstract book., Laulasmaa, Estonia, September 12-15, 2016.
22. Dokāne K. 2010. Anatomisko un fizioloģisko procesu izpēte rododendru vienpumpura spraudeņos ar lapu rizoģenēs laikā. Maģistra darbs. Rīga, Latvijas Universitāte, 51 lpp.
23. Doty S. L. 2011. Growth-Promoting Endophytic Fungi of Forest Trees. – In: Pirttilä A. M., C. Endophytes of Forest Trees. Springer Science & Business Media. pp. 151-156.
24. Druege U., Baltruschat H., Franken P. 2007. Piriformospora indica promotes adventitious root formation in cuttings. - Scientia Horticulturae, 11: 422-426.
25. Druege U., Franken P., Hajirezaei M. R. 2016. Plant Hormone Homeostasis, Signaling, and Function during Adventitious Root Formation in Cuttings. - Plant Science, 7:381(133).
26. Dūmiņš K. 2015. Anatomiskās un fizioloģiskās izmaiņas mūžzaļo rododendru vienpumpura spraudeņos ar lapu rizoģenēzes laikā endofītiskās sēnes *Calcarisporium arbuscula* ietekmē. Bakalāru darbs. Rīga, Latvijas Universitāte, 50 lpp.
27. Eeckhaut T., Janssens K., De Keyser E., De Riek J. 2010. Micropropagation of rhododendron. In: Jain S.M., Ochatt S.J. (eds) Protocols for *In Vitro* Propagation of Ornamental Plants. Springer Protocols Humana Press, pp. 141–152.
28. Evert R.F. 2006. Esau's Plant Anatomy 3rd edition. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 601 pp.
29. Fahad S., Hussain S., Bano A., Saud S., Hassan S., Shan D., Khan F. A., Khan F., Chen Y., Wu C., Tabassum M. A., Chun M. X., Afzal M., Jan A., Jan M. T., Huang J. 2015.

- Potential role of phytohormones and plant growth-promoting rhizobacteria in abiotic stresses: consequences for changing environment. - *Environmental Science and Pollution Research*, 22: 4907-4921.
30. Fahn A. 1990. *Plant Anatomy*. 4th ed. Pergamon Press, Oxford. 588 p.
 31. Gaspar T., Kevers C., Hausman J. F., Ripetti V. 1994. Peroxidase activity and endogenous free auxin during adventitious root formation. – In: Lumsden P.J., Nicholas L.R., Davies W.J. (eds) *Physiology, Growth and Development of Plants in Culture*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 289–298.
 32. 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.
 33. Ghimire S. R., Hyde K. D. 2004. Fungal endophytes. - In: A. Varma, L. Abbott, D. Werner, R. Hampp (ed.), *Plant Surface Microbiology*. Springer-Verlag, Berlin, 281–292 pp.
 34. Gray T. R. G., Baxby P. 1968. Chitin decomposition in soil II. The ecology of chitinoclastic micro-organisms in forest soil. - *Trans. Br. mycol. Soc.*, 51: 293-309.
 35. Hansen O. B., Potter J. R. 1997. Rooting of apple, rhododendron, and mountain laurel cuttings from stock plants etiolated under two temperatures. – *HortScience*, 32: 304–306.
 36. Harde S.M., Wang Z., Horne M., Zhu J.Y., Pan X. 2016. Microbial lipid production from SPORL-pretreated Douglas fir by *Mortierella isabellina*. - *Fuel* 175:64–74.
 37. 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 pp.
 38. Hawksworth D. L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1-5 million species estimate revisited. *Mycol. Res.*, 105 (12): 1422–1432.
 39. Hoffmann K., Voigt K., Kirk P. M. 2011. *Mortierellomycotina* subphyl. nov., based on multi-gene genealogies. – *Mycotaxon*, 115:353–363.
 40. Husen A., Pal M. 2003. Effect of nitrogen, phosphorous and potassium fertilizers on growth of stock plants of *Tectona grandis* (Linn. f.) and rooting behaviour of shoot cuttings. – *Silvae genet.*, 52: 249–254.
 41. Husen A. 2011. Rejuvenation and adventitious rooting in coppice-shoot cuttings of *Tectona grandis* as affected by stock-plant etiolation. - *Amer. J. Plant Sci.*, 2: 370–374.

42. Hyde K. D., Soyong K. 2008. The fungal endophyte dilemma. – *Fungal Diversity*, 33:163-173.
43. Hyde K. D., McKenzie E. H. C., KoKo T. W. 2011. Towards incorporating anamorphic fungi in a natural classification – checklist and notes for 2010. – *Mycosphere*.
44. Jeremin V. M., Boiko V. I. 1998. Bark anatomy of the stem in some species of the Ericaceae. - *Bot. Zhurn.* 83: 1–15. (in Russian)
45. Kevers C., Hausman J. F., Faivre-Rampant O., Evers D., Gaspar T. 1997. Hormonal control of adventitious rooting: Progress and Questions. - *Angew Bot.*, 71: 71–79.
46. Khan A. L., Hamayun M., Kang S., Kim Y., Jung H., Lee J., Lee I. 2012. Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: an example of *Paecilomyces formosus* LHL10. - *BMC Microbiology*, 12:3.
47. Khan A. R., Ullah I., Waqas M., Shahzad R., Hong S., Park G., Jung B. K., Kwon B., Lee I., Shin J. 2015. Plant growth-promoting potential of endophytic fungi isolated from *Solanum nigrum* leaves. - *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31: 1461-1466.
48. Kitin P., Funada R., Sano Y., Ohtani J. 2000. Analysis by confocal microscopy of the cambium in the hardwood *Kalopanax pictus*. - *Ann. Bot.* 86: 1109–1117.
49. Kogel K. H., Franken P., Hüchelhoven R. 2006. Endophyte or parasite - what decides? - *Current Opinion in Plant Biology*, 9: 358-363.
50. Kondratoviča D. 1986. Rododendru viengadīgā stumbra anatomisko elementu attīstība. Diplomdarbs, Rīga, 81 lpp.
51. Kondratovičs U. 1993. Brīvdabas rododendru pavairošanas bioloģiskās īpatnības Latvijā. Disertācija. Latvijas Universitāte, Rīga. 210 lpp.
52. Kondratovičs R. 2005. Rododendri un to selekcija Latvijā. LU Akadēmiskais apgāds. 102 lpp.
53. Kondratovičs U., Megre D. 1999. Anatomische Eigenarten der Adventivwurzelbildung von Rhododendronstecklingen während der Bewurzelung. – *Rhododendron und immergrüne Laubgehölze. Jahrbuch 1999*, S. 72-85.
54. Kurepin L., Haslam T., Lopez – Villalobos A., Oinam G., Yeung E. 2011. Adventitious root formation in ornamental plants: II. The role of plant growth regulators. – *Propagation of Ornamental Plants*, 11: 161 – 171.
55. Larson R. P. 1994. *The Vascular Cambium. Development and Structure*. Springer-Verlag, Berlin. 725 p.

56. Leslie, A. C. 2004. The International Rhododendron Register and Checklist, 2nd Edition. Royal Horticultural Society, London. 154 pp.
57. Lin L.C., Lee M.J., Chen J.L. 2010. Decomposition of organic matter by the ericoid mycorrhizal endophytes of Formosan rhododendron (*Rhododendron formosanum* Hemsl.). – In: Springer-Verlag.
58. Lo Presti. L., Lanver D., Schweizer G., Tanaka S., Liang L., Tollot M., Kahmann R. 2015. Fungal effectors and plant susceptibility. - Annual review of plant biology, 66: 513-545.
59. Maynard B. K., Bassuk N. L. 1996. Effects of stock plant etiolation, shading, banding, and shoot development on histology and cutting propagation of *Carpinus betulus* L. *fastigiata*. J. - Amer. Soc. Hort. Sci., 121: 853–860.
60. Megre D. 2011. Anatomiskās un fizioloģiskās izmaiņas mūžzaļajos rododendros to veģetatīvās pavairošanas laikā. Promocijas darbs. Rīga, Latvijas Universitāte, 98 lpp.
61. 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 biological cracoviensia Series Botanica 53/1: 74–79.
62. Merev N., Yavuz H. 2000. Ecological wood anatomy of Turkish *Rhododendron* L. (*Ericaceae*) intraspecific variation. - Turk. J. Bot., 24: 1–11.
63. Minibayeva F., Beckett R. P., Kranner I. 2015. Roles of apoplastic peroxidases in plant response to wounding. - Phytochemistry., 112:122-9.
64. 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 Regul.* 44: 257–266.
65. Mucciarelli M., Scannerini S., Berteà C., Maffei M., 2003. *In vitro* and *in vivo* peppermint (*Mentha piperita*) growth promotion by nonmycorrhizal fungal colonization. - *New Phytologist*, 158: 579-591.
66. Muller G. M., Bills G. F., Foster M.S. 2004. Biodiversity of Fungi Inventory and Monitoring Methods. Elsevier Academic Press, Burlington, MA, 777 pp.
67. Nag S., Saha K., Choudhuri M. A. 2001. Role of Auxin and Polyamines in Adventitious Root Formation in Relation to Changes in Compounds Involved in Rooting. - *Journal of Plant Growth Regulation*, 20:182-194.
68. Nagy L. G., Petkovits T., Kovács G. M., Voigt K., Vágvölgyi C., Papp T. 2011. Where is the unseen fungal diversity hidden? A study of *Mortierella* reveals a large

- contribution of reference collections to the identification of fungal environmental sequences. *New Phytologist*, 191: 789–794.
69. Naija S., Elloumi N., Jbir N., Ammar S., Kevers C. 2008. Anatomical and biochemical changes during adventitious rooting of apple rootstock MM 106 cultured *in vitro*. - *Comptes Rendus Biologies*, 331: 518-525.
 70. Nawrocka-Grześkowiak U. 2004a. Effect of stock and grafting method on successful graft union in rhododendrons. – *Dendrobiology*, 51: 53–57
 71. Nawrocka-Grześkowiak U. 2004b. Effect of growth substances on the rooting of cuttings of rhododendron species. – *Fol. Hort.*, 16: 115-123.
 72. O'Brien H. E., Parrent J. L., Jackson J. A., Moncalvo J. M., Vilgalys R. 2005. Fungal Community Analysis by Large-Scale Sequencing of Environmental Samples. - *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9):5544.
 73. Oinam G., Yeung E., Kurepin L., Haslam T., Villalobos A.L. 2011. Adventitious root formation in ornamental plants: I. General overview and recent successes. – *Propag. Ornam. Plants*, 1: 78–90.
 74. Oses R., Valenzuela S., Freer J., Sanfuentes E., Rodriguez J. 2008. Fungal endophytes in xylem of healthy Chilean trees and their possible role in early wood decay. - *Fungal Diversity*, 33: 77-86.
 75. Parsa S., Ortiz V., Vega F.E. 2013. Establishing Fungal Entomopathogens as Endophytes: Towards Endophytic Biological Control. - *J Vis Exp.*, 74: 50360.
 76. Partida-Martinez L.P., Heil M. 2011. The microbe-free plant: fact or artifact? - *Frontiers in Plant Science*, 2: 1-16.
 77. Peterson R. L., Massicotte H. B., Melville L. H. 2004. *Mycorrhiza Anatomy and Cell Biology*. Ottawa: NRC Research Press, 173 pp.
 78. Poll C., Brune T., Begerow D., Kandeler E. 2010. Small-scale Diversity and Succession of Fungi in the Detritosphere of Rye Residues. - *Microb Ecol*, 59:130–140.
 79. Porras-Alfaro A., Bayman P., 2011. Hidden Fungi, Emergent Properties: Endophytes and Microbiomes. - *Annual Review of Phytopathology*, 49:291–315.
 80. Promputtha I., Lumyong S., Dhanasekaran V., McKenzie E.H.C., Hyde K.D., Jeewon R. 2007. A Phylogenetic Evaluation of Whether Endophytes Become Saprotrophs at Host Senescence. - *Microbial Ecology*, 53: 579–590.
 81. Purmale L., Apine I., Nikolajeva V., Grantina L., Verkley G., Tomsone S. 2012. Endophytic fungi in evergreen rhododendrons cultivated *in vitro* and *in vivo*. – *Environmental and Experimental Biology*, 10: 1–7.

82. Rafiqi M., Ellis J. G., Ludowici V. A., Hardham A. R., Dodds, P. N. 2012. Challenges and progress towards understanding the role of effectors in plant–fungal interactions. - *Current opinion in plant biology*, 15:477-482.
83. Read D.J. 1996. The Structure and Function of the Ericoid Mycorrhizal Root. – *Annals of Botany*, 77: 365-374.
84. Redman R. S., Dunigan D. D., Rodriguez R. J. 2001. Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader? – *New Phytologist*, 151: 70 - 716.
85. Riekstiņa G. 2015. Septiņas jaunas šķirnes. Key. <http://www.rododendri.lu.lv/zinas/t/37193/> (12.05.2016.)
86. Rodriguez R. J., Redman R. S. 2008. More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. – *Journal of Experimental Botany*, 59: 1109–1114.
87. Ruzin S. E. 1999. *Plant Microtechnique and Microscopy*. New York: Oxford University Press, 322 pp.
88. Saikkonen K., Wali P., Helander M., Faeth S.H., 2004. Evolution of endophyte-plant symbioses. - *Plant Science*, 9:275-280.
89. San-José M. C., Vidal N., Ballester A. 1992. Anatomical and biochemical changes during root formation in oak and apple shoots cultured *in vitro*. - *Agronomie*, 12: 767-774.
90. Schulz B. J. E. 2006. Mutualistic Interactions with Fungal Root Endophytes. In: Schulz B. J. E., Boyle C.J.C., Sieber T. N. (Eds.), *Microbial Root Endophytes*. Springer Science & Business Media, 261-279 pp.
91. Shelest E., Voigt K. 2014. Genomics to Study Basal Lineage Fungal Biology: Phylogenomics Suggests a Common Origin. - *Fungal Genomic*, 31-60 pp.
92. Stone J. K., Polishook J. D., White J. F. 2004. Endophytic fungi. Saprobic soil fungi. – In: G.M. Muller, G.F. Bills, M.S. Foster (ed.), *Biodiversity of Fungi Inventory and Monitoring Methods*. Elsevier Academic Press, Burlington, MA, 224-269 pp.
93. Straker C. J. 1996. Ericoid mycorrhiza: ecological and host specificity. – *Springer-Verlag Mycorrhiza*, 6 :215–225.
94. Strzelecka K. 2007. Anatomical structure and adventitious root formation in *Rhododendron ponticum* L. cuttings. - *Acta Scientiarum Polonorum*, 6: 15–22.

95. 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. - Plant Physiol., 161: 69–77.
96. Tejesvi M. V., Kajula M., Mattila S., Pirttilä A. M. 2011. Bioactivity and genetic diversity of endophytic fungi in *Rhododendron tomentosum* Harmaja. – Fungal Diversity 47: 97–107.
97. Terzioğlu S., Merev N., Anşın R. 2001. A study on turkish *Rhododendron* L. (Ericaceae). - Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 25: 311-317.
98. Tezgül Çakır N., Güvenç A., Kökdil G., Duran N., Arslan G.J. 2005. Studies on the anatomical, phytochemical and antimicrobial properties of endemic *Rhododendron smirnovii* Trautv. Fac. Pharm. Ankara 34: 165–182.
99. Tsavkelova E., Oeser B., Oren-Young L., Israeli M., Sasson Y., Tudzynski B., Sharon A. 2012. Identification and functional characterization of indole-3-acetamide-mediated IAA biosynthesis in plant-associated *Fusarium* species. - Fungal Genetics and Biology, 49: 48–57.
100. Vilgalys R., Liao H. L., Bonito G., Hameed K., Grigoriev I., Schadt C., Labbe J., Tuskan G., Tschaplinski T., Martin F. 2016. Metagenomic study of plant-fungal interactions between *Populus trichocarpa* with its rhizosphere fungi. – In: Vilgalys R. (ed.), Highlights from the 13th European Conference on Fungal Genetics. Presentations by the Vilgalys lab at the 13th European Fungal Genetics Conference, Paris, April 3-6, 2016. Key. <http://sites.duke.edu/vilgalyslab/2016/04/11/highlights-from-the-13th-european-fungal-genetics-conference/> (12.05.2016.)
101. Varma A., Verma S, Sudha, Sahay N., Britta B., Franken P. 1999. *Piriformospora indica*, a Cultivable Plant-Growth-Promoting Root Endophyte. – Applied and Environmental Microbiology, 65:2741–2744.
102. Voigt K., Woestemeyer J. 2011. Phylogeny and origin of 82 zygomycetes from all 54 genera of the *Mucorales* and *Mortierellales* based on combined analysis of actin and translation elongation factor EF-1 α genes. – Gene, 270:113-120.
103. Watson P. 1955. *Calcarisporium arbuscula* living as an endophyte in apparently healthy sporophores of *Russula* and *Lactarius*. - Trans. Brit. mycol. Soc., 38: 409-414.
104. Watson P. 1965. Further observations on *Calcarisporium arbuscula*. - Trans. Brit. mycol. Soc., 48: 9-17.

105. Waqas M., Khan A. L., Kamran M., Hamayun M., Kang S., Kim Y., Lee I. 2012. Endophytic Fungi Produce Gibberellins and Indoleacetic Acid and Promotes Host-Plant Growth during Stress. – *Molecules*, 17: 10754-10773.
106. Wijayawardene D. N. N., McKenzie E. H. C., Hyde K. D. 2012. Towards incorporating anamorphic fungi in a natural classification – checklist and notes for 2011. - *Mycosphere* Doi 10.5943/mycosphere/3/2/5.
107. Wu W., Yan J., Ji X., Zhang X., Shang J., Sun L., Ren L., Huang H. 2015. Lipid characterization of an arachidonic acid-rich oil producing fungus *Mortierella alpina*. - *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 23: 1183–1187.
108. Yu N. J., Guo S. X., Lu H. Y. 2002. Cytotoxic macrocyclic trichothecenes from the mycelia of *Calcarisporium arbuscula* Preuss. - *Journal of Asian Natural Products Research*, 4: 179–183.
109. Zeilinger S., Gupta V. K., Dahms T. E., Silva R. N., Singh H. B., Upadhyay R. S., Gomes E. V., Tsui C. K., Nayak S C. 2015. Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions with plants. - *FEMS Microbiol Rev.*, 40:182-207.