



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Daržo augalų patogenų populiacijos įvairovė, rūšinė sudėtis ir biokontrolė

Baigiamasis magistro projektas

Vytautas Bunevičius

Projekto autorius

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

Vadovė

Vyr. m. d. dr. Neringa Rasiukevičiūtė

Konsultantė

Kaunas, 2023



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Daržo augalų patogenų populiacijos įvairovė, rūšinė sudėtis ir biokontrolė

Baigiamasis magistro projektas

Pramoninė biotechnologija (6211FX010)

Vytautas Bunevičius

Projekto autorius

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

Vadovė

Vyr. m. d. dr. Neringa Rasiukevičiūtė

Konsultantė

Lekt. dr. Birutė Grybaitė

Recenzentė

Kaunas, 2023



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Vytautas Bunevičius

Daržo augalų patogenų populiacijos įvairovė, rūšinė sudėtis ir biokontrolė

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad:

1. baigiamąjį projektą parengiau savarankiškai ir sąžiningai, nepažeisdama(s) kitų asmenų autoriaus ar kitų teisių, laikydamasi(s) Lietuvos Respublikos autorių teisių ir gretutinių teisių įstatymo nuostatų, Kauno technologijos universiteto (toliau – Universitetas) intelektinės nuosavybės valdymo ir perdavimo nuostatų bei Universiteto akademinės etikos kodekse nustatytų etikos reikalavimų;
2. baigiamajame projekte visi pateikti duomenys ir tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti teisėtai, nei viena šio projekto dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar elektroninių šaltinių, visos baigiamojo projekto tekste pateiktos citatos ir nuorodos yra nurodytos literatūros sąrašė;
3. įstatymų nenumatytų piniginių sumų už baigiamąjį projektą ar jo dalis niekam nesu mokėjęs (-usi);
4. suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo ar kitų asmenų teisių pažeidimo faktui, man bus taikomos akademinės nuobaudos pagal Universitete galiojančią tvarką ir būsiu pašalinta(s) iš Universiteto, o baigiamasis projektas gali būti pateiktas Akademinės etikos ir procedūrų kontrolieriaus tarnybai nagrinėjant galimą akademinės etikos pažeidimą.

Vytautas Bunevičius

Patvirtinta elektroniniu būdu

Bunevičius, Vytautas. Daržo augalų patogenų populiacijos įvairovė, rūšinė sudėtis ir biokontrolė. Magistro studijų baigiamasis projektas / vadovė doc. dr. Ilona Jonuškienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas. Konsultantė vyr. m. d. dr. Neringa Rasiukevičiūtė; Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centras, Sodininkystės ir daržininkystės institutas.

Studijų kryptis ir sritis (studijų kryptių grupė): Biotechnologijos, Technologijų mokslai.

Reikšminiai žodžiai: *Alternaria* spp., biokontrolė, eterinis aliejus, ekstraktas, patogenai.

Kaunas, 2023. 56 p.

Santrauka

Dėl didelių žemės ūkio derliaus nuostolių ir neigiamo cheminių pesticidų poveikio yra ieškoma alternatyvių bei efektyvių sodo ir daržo augalų patogenų biokontrolės metodų. Kaip viena iš alternatyvų yra biologinių augalų apsaugos produktų tokių kaip eterinių aliejų arba ekstraktų naudojimas. Tai biologiškai aktyvios medžiagos, kurias tinkamai pritaikius galima kontroliuoti daržo augalų patogenus. Šio darbo tikslas ištirti morkų patogenų populiacijos įvairovę, jų rūšinę sudėtį ir įvertinti biologiškai aktyviųjų medžiagų poveikį *Alternaria* genties patogenams. Morkų mikroorganizmų populiacijos įvairovė įvertinta agarizuotų terpių metodu pasirinkus skirtingus augalus šeimininkus: smulkiažiedę galinsogą, dirvinį asiūklį, bekvapį šunramunį, bei morkų šakniavaisius. Tirtuose augaluose šeimininkuose buvo aptikta bakterijų, mieliagrybių bei skirtingų genčių grybų: *Alternaria*, *Penicillium*, *Mucor*, *Botrytis*, *Fusarium* ir kt. Įvertinus užkrėstumą, išskirtos dominuojančios *Alternaria* genties grybų monokultūros, kurios identifikuotos molekuliniiais metodais. Efektyvumo ir reinokuliacijos tyrimų metu pasirinktos mikroskopinių grybų rūšys nuo skirtingų augalų šeimininkų: *Alternaria alternata* (ALT1 ir ALT2), *A. botrytis* (ALT3), *A. consortialis* (ALT4). Tyrimuose naudotas 100 µl/l koncentracijos vaistinio čiobrelio (lot. *Thymus vulgaris* L.) eterinis aliejus ir skirtingų koncentracijų gvazdikmedžio (lot. *Syzygium aromaticum* L.) ekstraktas. Nustatyta, kad 100 µl/l koncentracijos vaistinio čiobrelio eterinis aliejus pasižymi slopinamuoju poveikiu prieš skirtingus *Alternaria* ALT1, ALT2 ir ALT4 izoliatus. Gvazdikmedžio ekstraktas slopino tik ALT1 ir ALT4 izoliatus. Atlikti tyrimai parodė, kad biologiškai aktyvios medžiagos gali slopinti mikroskopinių grybų vystymąsi.

Bunevičius, Vytautas. Vegetable Pathogens Diversity, Species Composition and Biocontrol. Master's Final Degree Project / supervisor assoc. prof. dr. Ilona Jonuškienė; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology. Consultant senior researcher dr. Neringa Rasiukevičiūtė; Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, Institute of Horticulture.

Study field and area (study field group): Biotechnology, Technological Sciences.

Keywords: *Alternaria* spp., biocontrol, essential oil, extract, pathogens.

Kaunas, 2023. 56.

Summary

Because of the large agricultural harvest losses and the adverse effects of chemical pesticides, alternative and effective methods of biocontrol of pathogens are being sought. One alternative option is using biological plant protection products such as essential oils or extracts. These products contain biologically active substances that can control horticultural crop pathogens. This work aims to assess carrot pathogens population diversity and species composition and evaluate the effect of biologically active substances on the *Alternaria* spp. The diversity of microorganisms in the carrot crop was assessed by the agarized media method on different plant hosts: *Galinsoga parviflora*, *Equisetum arvense*, *Tripleurospermum perforatum*, and carrot roots. Bacteria, yeasts and fungi of different genera were found on the investigated plant hosts: *Alternaria*, *Penicillium*, *Mucor*, *Botrytis*, *Fusarium*, etc. After assessing the infection, selected monocultures of microscopic fungi isolated and identified by molecular methods. The following species of microscopic fungi from different plant-hosts evaluated in efficacy and reinoculation experiments: *Alternaria alternata* (ALT1 and ALT2), *A. botrytis* (ALT3), *A. consortialis* (ALT4). Thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil at a concentration of 100 µl/l and clove (*Syzygium aromaticum* L.) extract at different concentrations were used in the experiments. It was found that thyme essential oil at a concentration of 100 µl/l had an inhibitory effect against *Alternaria* spp. ALT1, ALT2, ALT4 isolates from different plant hosts. Clove extract inhibited only ALT1 and ALT4 isolates. Our research showed that biologically active substances can inhibit the development of microscopic fungi.

Turinys

Lentelių sąrašas	8
Paveikslų sąrašas	9
Santrumpų ir terminų sąrašas	11
Įvadas.....	12
1. Literatūros apžvalga	13
1.1. Biotiniai ir abiotiniai veiksniai	13
1.2. Grybai	14
1.2.1. Grybų mityba.....	14
1.2.2. Augalų ir grybų sąveika, ligų vystymosi ciklas.....	15
1.2.3. Augalų patogeniniai grybai	16
1.2.3.1. <i>Alternaria</i> spp.....	16
1.2.3.2. <i>Penicillium</i> spp.....	16
1.2.3.3. <i>Fusarium</i> spp.....	17
1.2.3.4. <i>Aspergillus</i> spp.	18
1.2.3.5. <i>Trichoderma</i> spp.	18
1.3. Biologinė grybų kontrolė.....	19
1.4. Eteriniai aliejai ir jų veikimo mechanizmai.....	19
1.5. Ekstrakcija	20
1.5.1. CO ₂ ekstrakcija	20
1.5.2. Ekstrakcija tirpikliais padidintame slėgyje.....	21
1.5.3. Ekstrakcija mikrobangomis	21
1.5.4. Ekstrakcija ultragarsu	22
1.5.5. Maceravimas.....	22
1.5.6. Hidrodistiliacija	22
1.6. Literatūros apžvalgos apibendrinimas	23
2. Medžiagos ir tyrimų metodai	24
2.1. Tyrimų vieta	24
2.2. Tyrimams naudojamos medžiagos	24
2.3. Tyrimams naudojama įranga	24
2.4. Tyrimų metodai	24
2.4.1. Mitybinės terpės ruošimas.....	25
2.4.2. Užkrėstumo mikromicetais tyrimas, naudojant agarizuotų terpių metodą.....	25
2.4.3. Grybų monokultūrų išskyrimas	27
2.4.4. Izoliatų DNR išskyrimas ir identifikavimas	29
2.4.5. Eterinių aliejų išskyrimas	30
2.4.6. Augalinių ekstraktų išskyrimas	30
2.4.7. Eterinio aliejaus ir ekstraktų efektyvumo tyrimai	31
2.4.8. Reinokuliacija.....	32
2.5. Tyrimo duomenų apdorojimas	33
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas.....	34
3.1. Morkų pasėlių užkrėstumas mikromicetais	34
3.1.1. Piktžolių užkrėstumas mikromicetais.....	34
3.1.2. Morkų šakniavaisių užkrėstumas mikromicetais.....	38
3.2. Biologiškai aktyviųjų medžiagų poveikis mikroskopiniams grybams.....	40

3.2.1. <i>Alternaria alternata</i> išskirta nuo dirvinio asiūklio.....	41
3.2.1.1. <i>Alternaria alternata</i> , išskirtos nuo dirvinio asiūklio, morfologija.....	42
3.2.2. <i>Alternaria alternata</i> išskirta nuo morkos šakniavaisio	43
3.2.2.1. <i>Alternaria alternata</i> , išskirtos nuo morkos šakniavaisio.....	45
3.2.3. <i>Alternaria botrytis</i> išskirta nuo morkos šakniavaisio.....	45
3.2.3.1. <i>Alternaria botrytis</i> , išskirtos nuo morkos šakniavaisio, morfologija.....	47
3.2.4. <i>Alternaria consortialis</i> išskirta nuo smulkiažiedės galinsogos	48
3.2.4.1. <i>Alternaria consortialis</i> , išskirtos nuo smilkiažiedės galinsogos, morfologija	49
4. Rekomendacijų dalis	50
Išvados	52
Literatūros sąrašas	53

Lentelių sąrašas

2.1 lentelė. Tyrimų metu naudotos morkos.....	26
2.2 lentelė. Tirtų piktžolių bendra informacija.....	26
2.3 lentelė. Eterinio aliejaus ir ekstrakto koncentracijos.....	31
2.4 lentelė. Tirtos <i>Alternaria</i> rūšys	31
4.1 lentelė. Subkritinės ekstrakcijos aparatūros žymėjimas.....	51

Paveikslų sąrašas

1.1 pav. Biotiniai ir abiotiniai veiksniai	13
1.2 pav. Ligos ciklas	15
1.3 pav. A – <i>Alternaria gossypina</i> , B – <i>Alternaria arborescens</i> konidijakotis ir konidijos [14].....	16
1.4 pav. <i>Penicillium sclerotiorum</i> konidijakočiai (A) ir konidijos (B) [15]	17
1.5 pav. <i>Fusarium</i> spp. konidijos [18]	17
1.6 pav. <i>Aspergillus</i> spp. konidijakotis ir konidijos [19]	18
1.7 pav. <i>Trichoderma</i> spp. konidijakočiai ir konidijos [20].....	18
1.8 pav. Eterinio aliejaus poveikio mechanizmai.....	20
1.9 pav. Maceravimo procesas	22
2.1 pav. Pagrindiniai tyrimų etapai	25
2.2 pav. A – Morkų fragmentai; B – Piktžolių fragmentai	27
2.3 pav. Paruošto tirpalo skiedimo pavyzdys.....	28
2.4 pav. Sudygosios mikroskopinių grybų sporos	28
2.5 pav. <i>Clevenger</i> tipo aparatūra	30
2.6 pav. Slopavimo efektyvumo matavimas	32
2.7 pav. Reinokuliacijos matavimas.....	33
3.1 pav. Dirvinio asiūklio dalyse vyravusių grybų, bakterijų ir mieliagrybių procentas po 7 parų..	35
3.2 pav. Mikromicetų paplitimas dirvinio asiūklio dalyse.....	35
3.3 pav. Smulkiažiedės galinsogos dalyse vyravusių grybų, bakterijų ir mieliagrybių procentas po 7 parų.....	36
3.4 pav. Mikromicetų paplitimas smulkiažiedės galinsogos dalyse	37
3.5 pav. Bekvapio šunramunio dalyse vyravusių grybų, bakterijų ir mieliagrybių procentas po 7 parų	37
3.6 pav. Mikromicetų paplitimas bekvapio šunramunio dalyse.....	38
3.7 pav. Morkų šakniavaisiuose vyravusių grybų, bakterijų ir mieliagrybių procentas po 7 parų ...	39
3.8 pav. Mikromicetų paplitimas morkų šakniavaisiuose.....	40
3.9 pav. Vaistinio čiobrelio eterinio aliejaus (A) ir gvazdikmedžio ekstrakto (B) poveikis prieš <i>Alternaria alternata</i> išskirtą nuo dirvinio asiūklio	41
3.10 pav. <i>Alternaria alternata</i> , išskirtos nuo dirvinio asiūklio, reinokuliacijos tyrimo rezultatai po vaistinio čiobrelio eterinio aliejaus (A) ir gvazdikmedžio ekstrakto (B) poveikio pašalinimo.....	42
3.11 pav. Morfolginiai ALT1 požymiai: kontrolė (K) ir gvazdikmedžio augalinis ekstraktas (AE)	43
3.12 pav. Vaistinio čiobrelio eterinio aliejaus (A) ir gvazdikmedžio ekstrakto (B) poveikis prieš <i>Alternaria alternata</i> išskirtą nuo morkos šakniavaisio	44

3.13 pav. <i>Alternaria alternata</i> , išskirtos nuo morkos šakniavaisio, reinokuliacijos tyrimo rezultatai po vaistinio čiobrelio eterinio aliejaus (A) ir gvazdikmedžio ekstrakto (B) poveikio pašalinimo....	44
3.14 pav. Morfologiniai ALT2 požymiai: kontrolė (K) ir gvazdikmedžio augalinis ekstraktas (AE)	45
3.15 pav. Vaistinio čiobrelio eterinio aliejaus (A) ir gvazdikmedžio ekstrakto (B) poveikis prieš <i>Alternaria botrytis</i> išskirtą nuo morkos šakniavaisio	46
3.16 pav. <i>Alternaria botrytis</i> , išskirtos nuo morkos šakniavaisio, reinokuliacijos tyrimo rezultatai po vaistinio čiobrelio eterinio aliejaus (A) ir gvazdikmedžio ekstrakto (B) poveikio pašalinimo.....	47
3.17 pav. Morfologiniai ALT3 požymiai: kontrolė (K) ir gvazdikmedžio augalinis ekstraktas (AE)	47
3.18 pav. Vaistinio čiobrelio eterinio aliejaus (A) ir gvazdikmedžio ekstrakto (B) poveikis prieš <i>Alternaria consortialis</i> išskirtą nuo smulkiažiedės galinsogos	48
3.19 pav. <i>Alternaria consortialis</i> , išskirtos nuo smulkiažiedės galinsogos, reinokuliacijos tyrimo rezultatai po vaistinio čiobrelio eterinio aliejaus (A) ir gvazdikmedžio ekstrakto (B) poveikio pašalinimo.....	49
3.20 pav. Morfologiniai ALT4 požymiai: kontrolė (K) ir gvazdikmedžio augalinis ekstraktas (AE)	49
4.1 pav. Aparatūrinė subkritinės ekstrakcijos schema	50

Santrumpų ir terminų sąrašas

Santrumpos:

AE – augalinis ekstraktas;

ALT – *Alternaria* spp.;

ALT1 – *Alternaria alternata* išskirta nuo dirvinio asiūklio;

ALT2 – *Alternaria alternata* išskirta nuo *Nerac* morkos šakniavaisio;

ALT3 – *Alternaria botrytis* išskirta nuo *Nerac* morkos šakniavaisio;

ALT4 – *Alternaria consortialis* išskirta nuo smulkiažiedės galinsogos;

DNR – deoksiribonukleorūgštis;

EA – eterinis aliejus;

LAMMC – Lietuvos agrarinių ir miškų mokslo centras;

SDI – Sodininkystės ir daržininkystės institutas;

Spp. – genčiai priklausančios rūšys.

Įvadas

Dėl didėjančios žmonių populiacijos kyla vis didesnis maisto išteklių poreikis, ypač saugių ir ekologiškų. Todėl šiuo metu labai svarbu atkreipti dėmesį į žemės ūkio produktyvumo didinimą. Augalų derliaus nuostoliai gali būti patiriami dėl biotinių ir abiotinių veiksnių. Kiekvienas augintojas turi stengtis užtikrinti tinkamas sąlygas, kad būtų pasiektas didžiausias produktų auginimo produktyvumas. Derliaus apsaugai nuo augalų ligas sukeliančių mikroorganizmų ūkininkai dažnai naudoja cheminius pesticidus, tačiau siekiant pereiti prie aplinkai ir žmonėms draugiškesnių metodų ieškoma alternatyvių metodų.

Didelė žemės ūkio derliaus dalis yra prarandama dėl patogeninių grybų poveikio. Patogeniniai grybai gali sukelti įvairias augalų ligas, kurios lemia augalų derliaus nuostolius. Kiekvienais metais mikroskopiniai grybai pasaulio žemės ūkiui sukelia apie 60 milijardų dolerių nuostolių [1]. Siekiant kontroliuoti patogeninius grybus gali būti naudojami įvairūs biokontrolės metodai, o vienas iš labiausiai besivystančių yra augalinės kilmės ekstraktų arba eterinių aliejų naudojimas. Šios medžiagos turi daug antrinių metabolitų, kurų daugelis gali būti saugiai ir efektyviai naudojami kontroliuojant mikroskopinių grybų sukeltą ligą. Siekiant išskirti eterinius aliejus ir ekstraktus gali būti pasirenkami skirtingi metodai. Tai yra metodai apimantys maceravimą, hidrodistiliaciją, ekstrakciją tirpikliais, subkrintinę ekstrakciją ir kita.

Darbo tikslas – ištirti morkų patogenų populiacijos įvairovę, jų rūšinę sudėtį ir įvertinti biologiškai aktyviųjų medžiagų poveikį *Alternaria* genties patogenams.

Darbo uždaviniai:

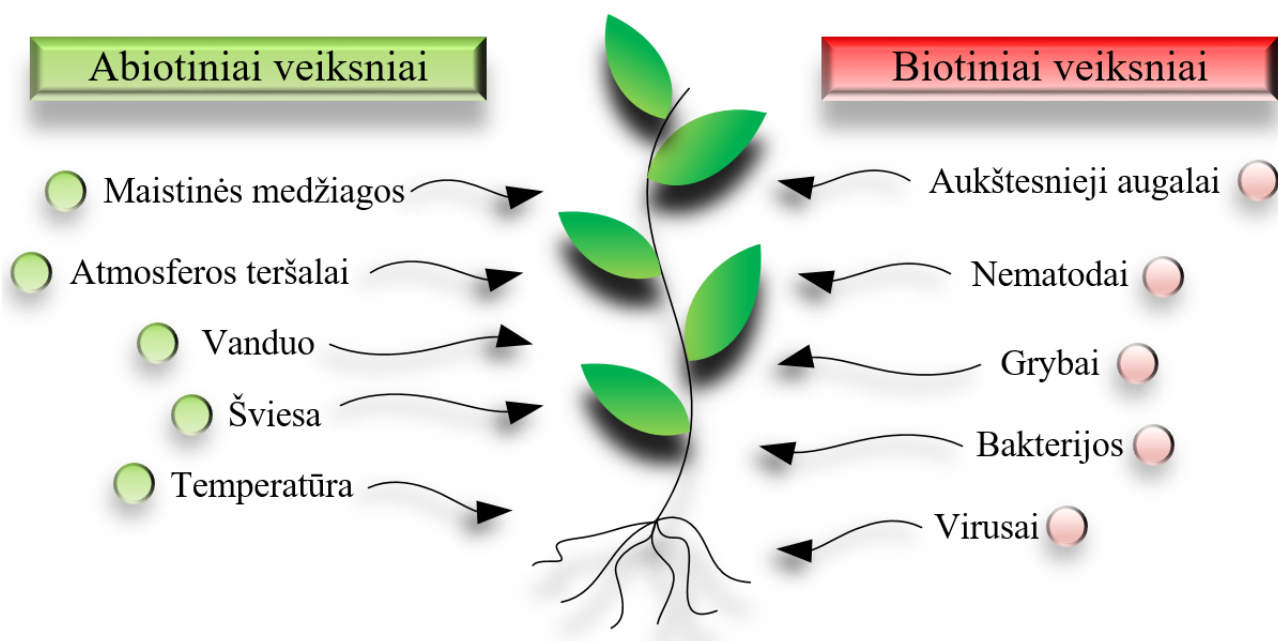
1. įvertinti vyraujančius mikroorganizmus morkų pasėlio piktžolėse;
2. įvertinti vyraujančius mikroorganizmus morkų šakniavaisiuose;
3. ištirti biologiškai aktyviųjų medžiagų poveikį *Alternaria* genties grybams nuo skirtingų augalų šeimininkų.

1. Literatūros apžvalga

Augalų ligos kontroliuojamos siekiant išlaikyti sodo, daržo augalų ir javų derlių bei kokybę. Ligų prevencijai ir kontrolei taikomi įvairūs metodai. Šiuo metu daug augintojų įprastai renkasi cheminius pesticidus. Tačiau jie prisideda prie aplinkos taršos, cheminiai pesticidai turi neigiamą poveikį žmonių sveikatai ir gali išlikti dirvožemyje daug metų, nes nėra biologiškai skaidūs. Yra žinoma, kad kai kurios jų veikliosios medžiagos sukelia vėžinius susirgimus žmogaus organizme, sutrikdo embriono vystymąsi. Dėl šių priežasčių mokslininkai stengiasi ieškoti alternatyvių biokontrolės metodų. Augalų ligos gali atsirasti dėl biotinių ir abiotinių veiksnių, kurios gali būti infekcinės ir neinfekcinės. Labai dažnai tenka kovoti su žalingais vabzdžiais, bakterijomis, virusais, o ypač su įvairiomis mikroskopinių grybų rūšimis [2-4].

1.1. Biotiniai ir abiotiniai veiksniai

Augalų ligos skirstomos į biotines (infekcinės) ir abiotines (neinfekcinės) ligas (žr. 1.1 pav.). Abiotinės ligos yra susijusios su nepalankiomis aplinkos sąlygomis, tokiomis kaip maisto medžiagų, drėgmės, šviesos trūkumu ar pertekliumi, toksiškomis medžiagomis aplinkoje ir dirvožemyje, žema arba aukšta temperatūra. Šie veiksniai negali plisti iš vieno augalo į kitą, tačiau yra labai dažni ir dėl sukkelto streso augalai tampa jautresni infekcinėms ligoms. Biotines augalų ligas sukelia gyvoji gamta. Tai apima tokius patogenus kaip virusai, grybai, bakterijos, aukštesnieji augalai, pirmuonys, nematodai. Patogenai gali plisti iš vieno augalo į kitą ir užkrėsti įvairias augalų dalis: lapus, stiebus, sėklas, šaknis, vaisius ir t. t. [4, 5].



1.1 pav. Biotiniai ir abiotiniai veiksniai

Tam tikros augalų ligos vystosi dėl kitų aukštesniųjų augalų prisitvirtinimo ir augimo jų paviršiuje. Jie savinasi reikalingas maisto medžiagas iš šeimininko ir neduoda jam jokios naudos. Yra augalų ligų, kurias sukelia virusai. Patekę į augalą jie dauginasi ir plinta visame augale. Atsiradusios bakterijos augalų audiniuose arba ant jų paviršiaus, taip pat lemia ligų atsiradimą bei augalo ligotumą. Be paminėtų sukėlėjų didelį poveikį turi mikroskopiniai grybai. Patogeniniai grybai gyvena augalų audiniuose arba ant jų ir gali sukelti rimtų fiziologinių funkcijų komplikacijų. Jie sukelia didžiąją dalį visų infekcinių augalų ligų. Tai apima baltąsias ir tikrąsias rūdis, miltligę, antraknozę ir daug kitų

ligų. Paprastai grybinė infekcija gali sukelti lokalią arba plačią ląstelių žūtį bei slopinti normalų augalo augimą. Su ląstelių žūtimi susiję simptomai yra: lapų dėmės, puviniai, augalo nykimas, vėžys [4, 6].

Augalai gali tapti lengviau pažeidžiami mikroorganizmų dėl netinkamų aplinkos sąlygų t. y. abiotinių veiksnių. Abiotiniai veiksniai turi didelį poveikį žemės ūkio augalams ir jų produktams. Vienas iš šių poveikių yra atmosferos teršalai. Aplinkoje esančios kietosios dalelės ir dulkės neigiamai veikia uždengdamos lapo paviršių, taip sumažindamos šviesos įsisavinimą ir blokuodamos tinkamą žiotelių veikimą. Dėl sieros rūgšties (H_2SO_4) ir sieros dioksido (SO_2) poveikio augalų lapai praranda spalvą, ant jų gali atsirasti įvairių dėmių, sulėtėti augimas. Rūgštys gali pašalinti iš lapų mineralines maisto medžiagas. Neinfekcines augalų ligas sukelia ir vandens perteklius arba trūkumas. Labai drėgnose dirvose pasireiškia deguonies trūkumas, todėl augalai blogai auga, silpsta, tampa lengviau paveikiami mikroorganizmų. Ilgesnį laiką trūkstant vandens dirvoje, augalai ima vysti, blogai augti, nesubrandina sėklų. Didelį poveikį augalo augimui turi šviesa. Mažas jos kiekis lemia lapo ploto padidėjimą, biomasės gamybos sumažėjimą, lapai tampa išblyškę, susilpnėja augalo imunitetas įvairiems mikroorganizmams. Dėl per didelio šviesos kiekio gali vykti augalo audinių destrukcija. Dar vienas labai dažnai sutinkamas abiotinis veiksnys yra temperatūra. Labai žemose temperatūrose (šalnos) gali būti negrįžtamai pažeidžiami augalo audiniai dėl jų struktūrose besiformuojančių vandens kristalų. Žemoje temperatūroje slopinamas fermentų veikimas. Negrįžtami pakitimai augale atsiranda ir dėl aukštos temperatūros, kuri sukelia nudegimus ant lapų [7-8].

1.2. Grybai

Gamtoje grybai yra labiausiai paplitę skaidytojai, kurie atlieka svarbų vaidmenį medžiagų perdirbime ir jų įsisavinime. Tačiau visame pasaulyje grybai, taip pat, turi ir daug nepageidaujamų poveikių augalų sveikatai ir sukelia daugybę augalų ligų. Yra manoma, kad dėl jų poveikio yra sunaikinama ne mažiau kaip 125 milijonai tonų įvairių augalų per metus. Šis poveikis apima kviečių, ryžių, kukurūzų, bulvių, morkų, pupelių ir įvairias kitas augalų kultūras [10].

1.2.1. Grybų mityba

Grybai yra mikroorganizmai, negalintys patys pasigaminti maistinių medžiagų, todėl jas gauna iš augalų arba gyvūnų. Pagal mitybos būdą grybai skirstomi į saprotrofinius, parazitinius ir mikorizinius. Grybai, kurie maistines medžiagas gauna iš negyvų organinių medžiagų yra vadinami saprotrofais. Tai gali būti lapų nuokritos, kelmai, nudžiūvę medžiai, negyva žolė, kankorėžiai. Šio tipo grybai skaido paminėtas medžiagas ir paverčia jas dirva. Saprotrofai dar gali būti skirstomi į obligatinius (tikruosius) ir fakultatyvinius (sąlyginius) saprotrofos. Tikrieji saprotrofai gyvena tiktais ant negyvos organinės medžiagos ir nepaveikia gyvų augalų ar gyvūnų. Fakultatyviniai saprotrofai yra grybai, kurie paprastai auga ant gyvos medžiagos, bet pakitus sąlygoms gali pradėti augti ir ant negyvos organinės medžiagos [9, 11].

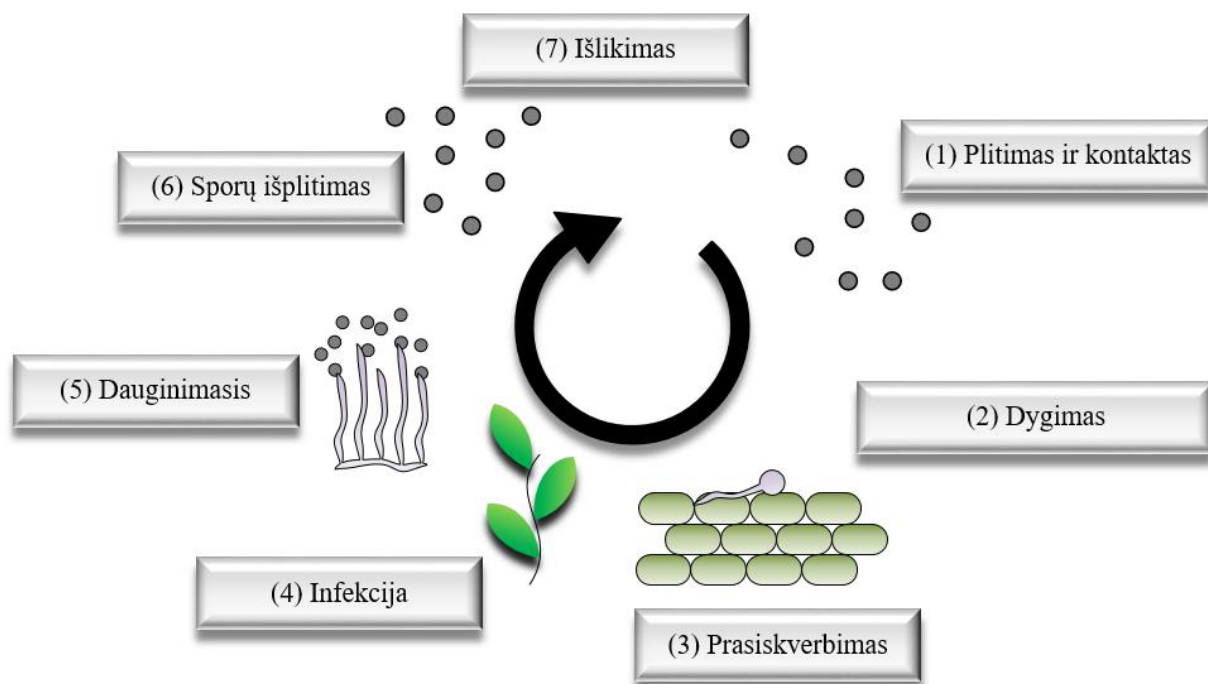
Kitas grybų mitybos būdas yra parazitinis. Grybai, kurie auga ant gyvos medžiagos ir minta jų sukauptomis medžiagomis yra vadinami parazitais. Šio tipo grybai sukelia įvairius augalų ir gyvūnų ligas bei audinių pažeidimus. Jie, kaip ir saprotrofiniai grybai, yra skirstomi į obligatinius ir fakultatyvinius. Obligatiniai parazitai gali misti tik gyva medžiaga ir negali išgyventi be šeimininko. Fakultatyviniai parazitai paprastai gyvena misdami negyva organine medžiaga, tačiau patekus ant gyvo šeimininko jie gali pradėti jį parazituoti [9, 11].

Dar vienai grupei priskiriami grybai, kurie sudaro simbiotines sąveikas su augalais ir yra vadinami mikroziniais. Labai dažnai ši sąveika pasireiškia augalų šaknyse. Simbiozės metu grybas ir jo šeimininkas gauna naudos. Iš augalo grybas pasisavina maistines medžiagas, o grybas augalą aprūpina mineralais ir jo veiklos metabolitais. Toks sugyvenimas vadinamas mikorize ir ji būna endotrofinė ir ektotrofinė. Endotrofinės mikorizės atveju grybas įsiskverbia į šaknų žievelės ląstelių vidų ir ten išsiraizgo. Ektotrofinės mikorizės atveju grybas įsiterpia į tarpląstelines ertmes, tačiau nepatenka į ląstelių vidų [9].

1.2.2. Augalų ir grybų sąveika, ligų vystymosi ciklas

Patogeno sąveika su šeimininku apibūdinama nuoseklių įvykių seka, kuri vadinama augalo ligos vystymosi ciklu. Dėl šios sąveikos išsivysto ir plinta ligos. Bendrą augalų ligų vystymosi ciklą sudaro septynios fazės: plitimas ir kontaktas, dygimas, prasiskverbimas, infekcija, dauginimasis, sporų plitimas, išlikimas (žr. 1.2 pav.):

1. Plitimo ir kontakto metu grybai plinta ir kontaktuoja su augalu šeimininku. Tai vyksta dėl įvairių aplinkos veiksnių, tokių kaip vėjas, vanduo, gyvūnai, vabzdžiai.
2. Dygimo etapas apima sporos dygimą ir patogeno prisitvirtinimą prie šeimininko.
3. Prasiskverbimo metu patogenas patenka į augalą per natūralias angas, žaizdas arba tiesioginiu įsiskverbimu dalyvaujant apresorijoms (grybų ląstelės skirtos užkrėsti augalus šeimininkus).
4. Infekcijos metu patogenas užmezga kontaktą su ląstelėmis ir gali plisti nuo vienos ląstelės prie kitos. Dėl šio poveikio atsiranda matomi infekcijos požymiai.
5. Dauginimosi metu grybai formuoja didelį kiekį sporų.
6. Sporų plitimo etapu patogenai plinta į kitus augalo šeimininko audinius arba naujus augalus.
7. Išlikimas, kai nėra palankių augimo sąlygų. Šiuo atveju iš grybienos gali formotis skleročiai, grybai laukia tinkamų sąlygų [12].



1.2 pav. Ligos ciklas

Ligų vystymosi ciklas yra būdingas įvairiems patogeniniams mikroorganizmams ir jie turi skirtingus patekimo į augalą šeiminingą mechanizmus. Daugelis grybų, tokių kaip *Alternaria alternata*, *Colletotrichum graminicola*, *Pyrenophora teres*, formuoja apresorijas, kuriomis tiesiogiai prasiskverbia per augalo audinius. Kad prasiskverbtų arba palengvinti prasiskverbimą, taip pat, gali būti naudojami fermentai. Po sėkmingo prasiskverbimo pradeda formuotis hifai, kurie šakojasi augalo šeiminingo audiniuose. Pabaigoje yra formuojamos ir specialios struktūros, padedančios grybui įsisavinti maistines medžiagas [13].

1.2.3. Augalų patogeniniai grybai

Augalų patogeniniai grybai gali sukelti įvairias augalų ligas, tokias kaip rūdys, kūlės, antraknozė, miltligė ir kt., kurios sukelia augalų derliaus nuostolius. Pasėlių nuostoliai ir grybų daroma žala pasaulio žemės ūkiui kasmet kainuoja apie 60 milijardų dolerių. Sukeliamos pasėlių augalų ligos kelia rimtą pavojų pasaulio maisto tiekimui, nes grybai yra dažniausia augalų ligų priežastis. Daugiau nei 10 000 grybų rūšių iš 100 000 žinomų rūšių gali sukelti augalų ligas. Dažnai sutinkami patogeniniai grybai priklauso šioms gentims: *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Curvularia* spp., *Alternaria* spp., *Penicillium* spp. [1, 10].

1.2.3.1. *Alternaria* spp.

Alternaria genties grybai yra fitopatogenai, kurių sporų galima rasti dirvožemyje, užkrėstose sėklose, pasėlių liekanose, patalpų ore. Paprastai šių mikroskopinių grybų augimui ir infekcijos formavimuisi reikalinga didelė santykinė oro drėgmė (92 %) bei 16–24 °C temperatūra. Genties nariai sudaro polimorfines konidijas, pasižyminčias ilgomis, įstrižomis pertvaromis, jos gali būti pavienės arba išsidėstę grandinėmis (žr. 1.3 pav.). *Alternaria* spp. mikromicetai sukelia pomidorų ir vaisių puvinį (sukėlėjas: *A. solani*), morkų alternariozę (sukėlėjas: *A. dauci*), paprikų alternariozę (sukėlėjas: *A. alternata*). Tačiau *A. alternata* yra labiausiai paplitęs ir naikinantis pasėlius mikroskopinis grybas. Jis yra žinomas kaip lapų dėmėtumo ir kitų ligų priežastis daugiau nei 100 augalų rūšių, taip pat kaip įvairių pasėlių ligų priežastis po derliaus nuėmimo [10, 14].

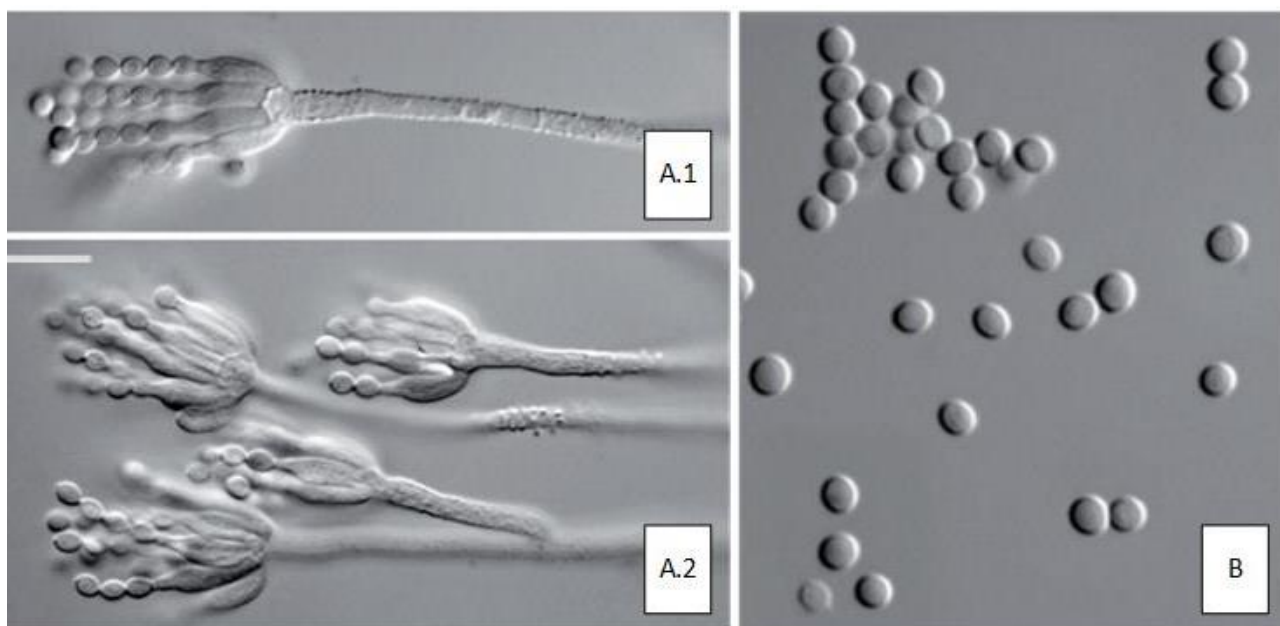


1.3 pav. A – *Alternaria gossypina*, B – *Alternaria arborescens* konidijakotis ir konidijos [14]

1.2.3.2. *Penicillium* spp.

Penicillium genties grybus sudaro labai didelė įvairovė rūšių, jų priskaičiuojama apie 225. Šie grybai yra plačiai paplitę ir gali būti randami maiste, dirvožemyje, yrančiose organinėse medžiagose, drėgnoje patalpose. Genties nariai pasižymi septuotu miceliu, mėlynai žaliomis sporų grandinėmis arba konidijomis, esančiomis ant šepečio formos konidiakočio (žr. 1.4 pav.). Šių grybų konidijos yra

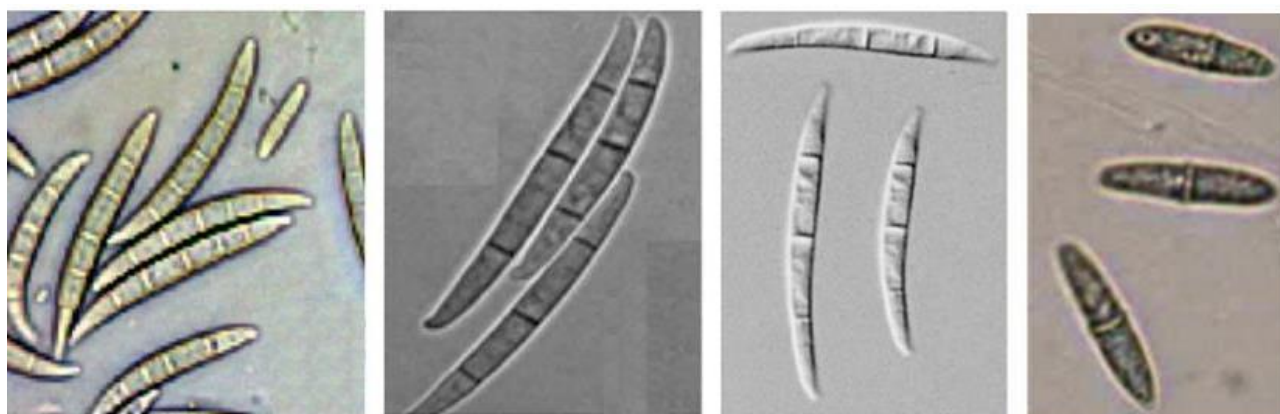
spalvotos: dažniausiai nuo pilkos iki mėlynos arba mėlynai žalios spalvos. Spalvos nėra išskirtinės įvairioms rūšims, todėl tai nepadeda identifikuojant rūšis. *Penicillium* genties grybai gamina įvairius antrinius metabolitus: chrizoginas (geltonas pigmentas), rokfortinas C, sekalono rūgštis, RR toksinas. Šios genties nariai sukelia puvinius įvairiuose augaluose [10, 15].



1.4 pav. *Penicillium sclerotiorum* konidijakočiai (A) ir konidijos (B) [15]

1.2.3.3. *Fusarium* spp.

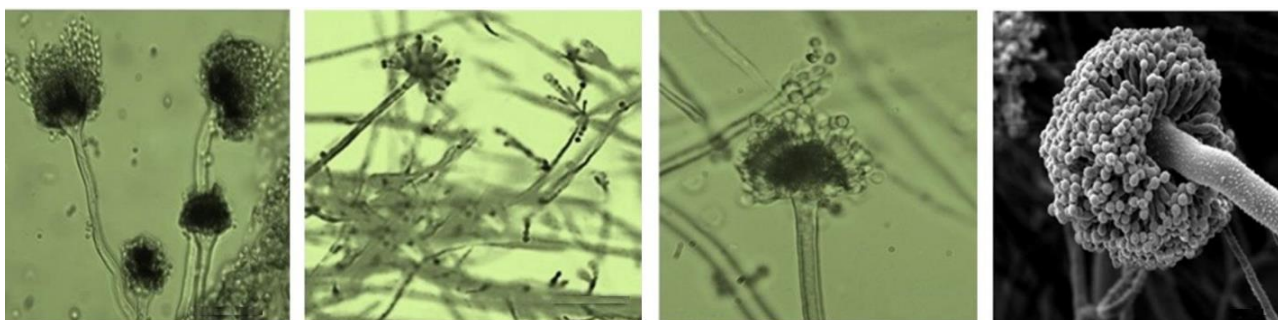
Fusarium genties grybai yra vieni iš labiausiai paplitusių žemės ūkio patogenų, kurie aptinkami dirvožemyje, augalų šeiminkų liekanose, organinėse medžiagose. Grybai gali vystytis ant sandėliuojamo maisto produktų ir juos supūdyti. Taip pat jie pažeidžia augalus ir javus, kurie labai svarbūs žmonių mitybai. Šios genties grybai gali išskirti įvairius pigmentus, kurie suteikia jiems spalvą. Tai gali būti rožinė, rausva, raudona, violetinė spalvos, taip pat pasitaiko ir rūšių, gaminančių rudus arba geltonus pigmentus. *Fusarium* genties grybai formuoja išlenktas pusmėnulio, pjautuvo, inksto arba kriaušės formos konidijas su pertvaromis (žr. 1.5 pav.). Tarp pagrindinių jų sukeliamų ligų yra priskiriama fuzariozė, šaknų puvinys bei fuzarinis puvinys [16-18].



1.5 pav. *Fusarium* spp. konidijos [18]

1.2.3.4. *Aspergillus* spp.

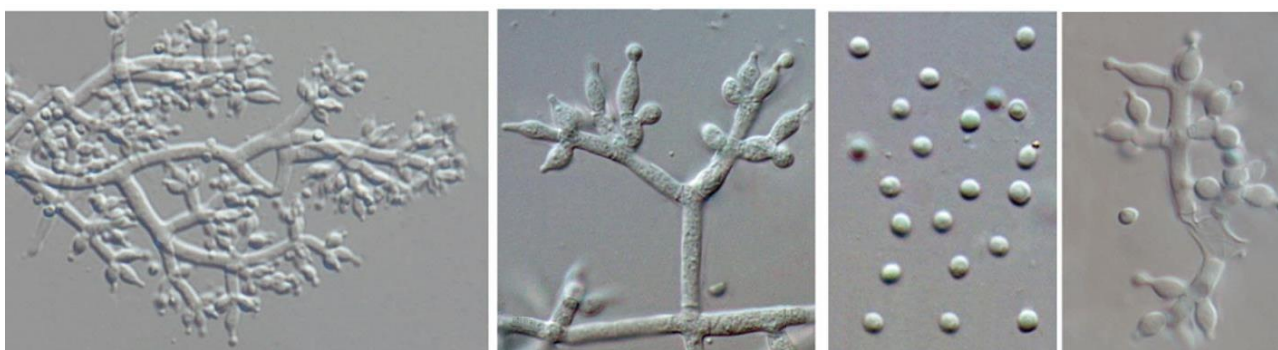
Aspergillus genties grybai yra paplitę visame pasaulyje ir jų rūšių suskaičiuojama apie 200. Šiems mikroorganizmams klestėti reikalingas didelis deguonies kiekis, turtingi anglimi substratai. Jie yra siejami su įvairių pasėlių bei puvinių formavimu ir produkcijos blogėjimu. Šie mikroskopiniai grybai dauginasi formuodami konidijas ant konidiakočio. Konidiakotis auga vertikaliai ir baigiasi rutuliuko, elipsės formos galvute. Ant šios galvutės formuojasi rutulio formos konidijos ir jų grandinė. Suformuotos konidijos gali būti skirtingos spalvos priklausomai nuo grybo rūšies. Tai apima įvairias spalvas: alyvuogių žalia, geltonai žalia, šviesiai juoda, rusvai juoda, šviesiai ruda, geltona. Daugelis *Aspergillus* rūšių, taip pat, gamina skleročius, kurie yra makroskopinės, kietos, tamsios, tankios hifų masės [10, 19].



1.6 pav. *Aspergillus* spp. konidijakotis ir konidijos [19]

1.2.3.5. *Trichoderma* spp.

Trichoderma genties mikroskopiniai grybai gali būti randami augalų paviršiuje ir šaknų rizosferoje. Jiems būdinga formuoti išsišakojusius konidijakočius panašius į spygliuočių šakas, kurių galuose formuojamos konidijos. Konidijos paprastai būna apvalios bei melsvai žalios spalvos. Daugelis *Trichoderma* rūšių yra geri skaidytojai, padeda skatinti augalų augimą bei apsaugo nuo augalų patogenų. Jų apsauginė funkcija pasireiškia dėl gaminamų antagonistinių chitinazių, endoglikanazių, celiulazių, proteazių ir antibiotikų. Neskaitant patrauklių *Trichoderma* rūšių yra išskiriamos ir kelios infekcinės ligas sukeliančios rūšys. *T. hazianum* ir *T. longibrachiatum* sukelia augalų ligas. Dėl sukeliama ligų prarandamas derlius bei prastėja sėklų kokybė [10].



1.7 pav. *Trichoderma* spp. konidijakočiai ir konidijos [20]

1.3. Biologinė grybų kontrolė

Biologinė augalų apsauga pastaruoju metu vis populiarėja, ne tik dėl žmonių neigiamo požiūrio į cheminius pesticidus, tačiau tyrimais nustatyta, kad kai kurios cheminių pesticidų veikliosios medžiagos neigiamai veikia žmonių sveikatą. Taip pat Europos žaliojo kurso strategijoje numatyta skatinti ekologinį žemės ūkį [21].

Kontroliuoti kenksmingus mikroskopinius grybus gali padėti antagonistinių mikroorganizmų naudojimas. Fitopatogeninius grybus galima kontroliuoti naudojant antagonistinius mikroorganizmus, kurie slopina patogenų vystymąsi. Tokiu atveju pradeda pasireikšti konkurencija tarp patogeninių ir nepatogeninių rūšių, kas lemia patogeno ir augalo ligų slopinimą. Taip pat gali būti naudojamos ir mikrobinių grybų ar bakterijų suspensijos, granulės arba milteliai, kurios dedamos į dirvą ar tiesiai ant augalo šaknų. Antagonistiniai mikroorganizmai gali veikti tiesiogiai arba netiesiogiai. Tiesioginis veikimas pasireiškia antibiotikų gamyba prieš tikslinius patogenus, konkurencija dėl maisto, vandens arba erdvės. Antruoju atveju yra netiesiogiai veikiami tiksliniai patogeniniai grybai, suaktyvinant augalų atsparumo tiems patogenams mechanizmus [21].

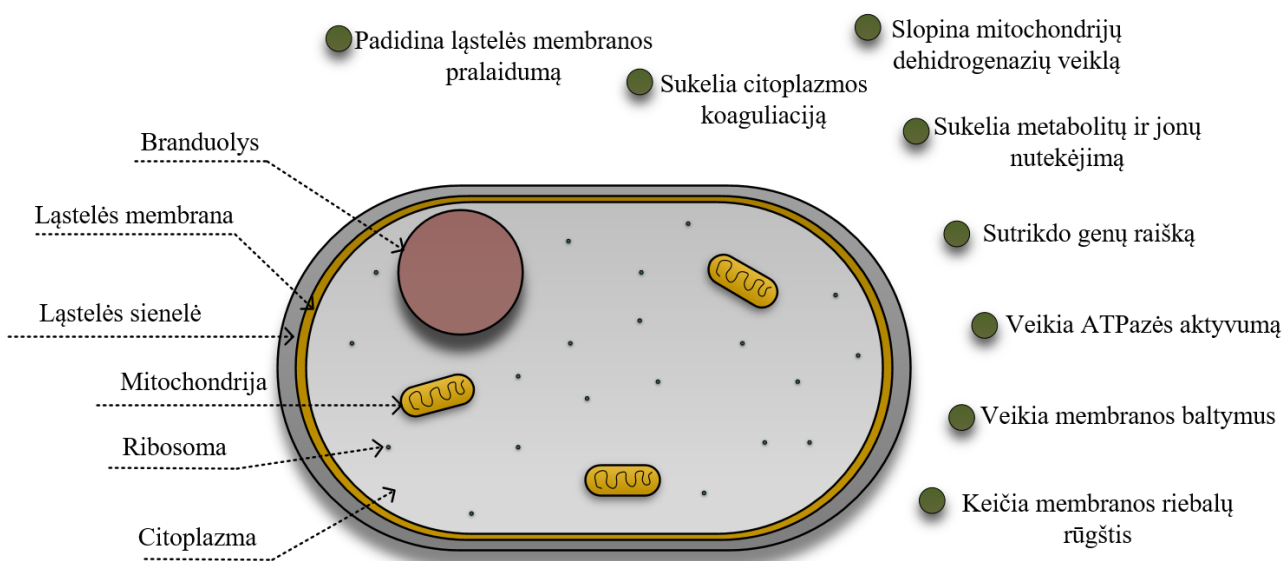
Vis labiau populiarėja biologiniai fungicidai: eteriniai aliejai ir ekstraktai. Kai kurie augalai gali gaminti įvairias antimikrobines medžiagas, kad apsisaugotų nuo patogenų. Augalų gaminami antriniai metabolitai, galintys padėti kovoje su patogenais, yra fenoliniai junginiai, riebalų rūgštys, flavonoidai, alkaloidai, glikozidai, terpenoidai, taninai. Išskirti eteriniai aliejai turi savybę slopinti grybines infekcijas ir taip mažinti patiriamus derliaus nuostolius bei pailginti vaisių bei daržovių galiojimo laiką. Jie taip pat gali slopinti kai kurių grybų rūšių mikotoksinų gamybą. Augalų ekstraktų naudojimo privalumas, lyginant su eteriniais aliejais, yra tas, kad juose yra didesnė įvairovė cheminių medžiagų, kurios tarpusavyje gali veikti sinergiškai [21].

Biologinė grybų kontrolė apima ir biofumigaciją (biologinė dirvožemio dezinfekcija). Biologinėje mikroskopinių grybų kontrolėje biofumigacija yra metodas pagrįstas šviežių organinių medžiagų įterpimu į dirvą ir jos paviršiaus padengimu plėvele. Dirvožemyje paskleistas organines medžiagas pradeda fermentuoti mikroorganizmai. Biofumigacijoje naudojamos įvairios augalų veislės, kurios anaerobinio skaidymo metu sudaro mikroskopiniams grybams toksiškas molekules. Pavyzdžiui česnako ir svogūno audinių skilimo metu išsiskiria lakiosios sieros medžiagos (cwiebelenai ir tiosulfinatai), kurios vėliau paverčiamos biocidiniais disulfidais, turinčiais fungicidinį poveikį. Kaip organinės medžiagos taip pat gali būti naudojamos garstyčios, kopūstai, rugiagėlės ir t. t. [21].

1.4. Eteriniai aliejai ir jų veikimo mechanizmai

Eteriniai aliejai (EA) yra natūralūs produktai, dažniausiai gaunami iš aromatinių augalų. Jie sudaryti iš didelės įvairovės cheminių junginių, o pagrindiniai iš jų yra terpenai ir terpenoidai. Taip pat gali būti randama azoto ir sieros turinčių junginių, kumarinų ir fenilpropanoidų homologų. Išgautų aliejų cheminė sudėtis labai skiriasi priklausomai nuo augalo rūšies, geografinės padėties, ekstrakcijos metodo ir t. t. [22]. Vienas iš dažnai naudojamų eterinių aliejų yra gaunamas iš vaistinio čiobrelio (lot. *Thymus vulgaris* L.). Kaip pagrindiniai komponentai, įeinantys į šio augalo eterinio aliejaus sudėtį, yra timolis, γ -terpinenas, p-cimenas, karvakrolis, linalolis, β -kariofilenas, geraniolis ir t. t. [23]. EA priešgrybinis veiksmingumas priklauso nuo skirtingų aktyviųjų sudedamųjų dalių, t. y. monoterpenų, seskviterpenų, fenolių, aldehydų ir ketonų, kurie tarpusavyje sudaro sinerginį ir papildantį poveikį. Toliau aptariami galimi eterinių aliejų ir jų pagrindinių komponentų veikimo būdai įvairiose grybelinių ląstelių vietose [24].

Dauguma teorijų dėl eterinio aliejaus priešgrybinio poveikio yra siejama su ergosterolio sintezės sutrikdymu grybų plazminėje membranoje. Šis junginys yra svarbus membranos lankstumui, vientisumui ir gyvybingumui palaikyti. Ergosterolio trūkumas siejamas su ląstelės sienelės sintezės trukdžiais. Plazminės membranos destabilizavimas dėl EA poveikio gali lemti gyvybiškai svarbių ląstelės jonų: K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} nutekėjimą. Dėl šių jonų netekimo sutrinka viduląsteliniai procesai, medžiagų apykaita, prasideda citoplazmos koaguliacija, kuri lemia ląstelės mirtį. Eteriniai aliejai gali pažeisti plazminės membranos baltymus. Jie sąveikauja su ląstelės organelėmis tokiais kaip ribosomos, mitochondrijos, endoplazminis tinklas bei lemia membranos potencialo sumažėjimą, protonų siurblio suirimą ir galiausiai gali būti slopinamas H^+ -ATPazės aktyvumas, kvėpavimo procesuose esančių sukcinato dehidrogenazės ir malato dehidrogenazės aktyvumas. Veikiant eteriniais aliejais, taip pat pažeidžiamas branduolinis turinys (DNR), o tai lemia genų transkripcijos, translacijos ir baltymų sintezės sutrikimus (žr. 1.8 pav.) [24, 25].



1.8 pav. Eterinio aliejaus poveikio mechanizmai

1.5. Ekstrakcija

Ekstrahavimas yra procesas, kurio metu yra siekiama išgauti tam tikrus augaluose esančius komponentus. Tai yra metodų įvairovė, kurie gali būti panaudoti siekiant išgauti dominančius junginius ir pritaikyti juos kovoje prieš patogeninius grybus. Ekstrahavimo metu vienas ar keli komponentai selektyviai atskiriami nuo kieto arba skysto mišinio naudojant tirpiklį. Skystas tirpiklis sąveikauja su mišiniu ir į jį patenka eteriniai aliejai taip gaunant ekstraktą, o netirpios jame struktūros lieka mišinyje. Vėliau tirpiklis gali būti pašalinamas gaunant gryną ekstraktą. Ekstraktams gauti dažnai naudojama ekstrakcija virškritiniais arba subkritiniais skysčiais, taip pat ekstrakcija mikrobangomis, ultragarsu, Soksleto ekstrakcija, maceravimas ir kiti metodai. Keletas iš metodų yra aptariami toliau [26].

1.5.1. CO₂ ekstrakcija

CO₂ ekstrakcija gali būti atliekama virškritinėmis arba subkritinėmis sąlygomis. Virškritinė būseną pasiekama, kai medžiaga būna virš jai įprastos kritinės temperatūros ir slėgio. Pavyzdžiui, CO₂ tampa virškritiniu skysčiu esant 31,1 °C temperatūrai ir 7,38 MPa slėgiui. Virškritinis skystis yra medžiaga, kuri kritiniame taške pasižymi tam tikromis dujoms ir skysčiams būdingomis savybėmis. Jų tankis

panašus į skysčio, o klampa į dujų. Dėl mažo klampumo ir didelio difuziškumo jie pasižymi geresnėmis ekstrahuojamų medžiagų transportavimo savybėmis negu skysčiai bei gali lengviau išsisklaidyti kietos medžiagos tūryje ir taip pasiekti didesnę ekstrakcijos greitį ir išeią. Keičiant slėgį arba temperatūrą, keičiasi ir virškritinio skysčio tankis. Tankis yra tiesiogiai susijęs su tirpumu, todėl keičiant paminėtus parametrus gali būti reguliuojamas ir tirpiklio stiprumas. Virškritinėje ekstrakcijoje taip pat gali būti naudojami kiti tirpikliai: vanduo, etanolis, metanolis, etanas, tačiau dažniausiai naudojamas anglies dioksidas. Didelį jo patrauklumą ekstrakcijoje lėmė jo nedidelė kritinė temperatūra ir slėgis, pigumas, lengvas prieinamumas ir mažas toksiškumas. Po virš / subkritinės ekstrakcijos, aplinkos sąlygose, CO₂ pereina į dujinę fazę ir yra gaunamas ekstraktas be tirpiklio liekanų. Anglies dioksidas pasižymi mažu poliškumu, todėl yra tinkamas nepolinių medžiagų ekstrakcijai. Paminėtina, kad siekiant ekstrahuoti polines medžiagas gali būti pridedami nedideli kiekiai modifikatorių: poliniai junginiai [26, 27].

Panaši ekstrakcija į virškritinę yra subkritinė CO₂ ekstrakcija. Šio tipo ekstrakcijoje naudojamas subkritinis (skystas) CO₂. Šios būsenos anglies dioksidui gauti, ekstrakcijos metu palaikoma 10 °C temperatūra ir 3–8 MPa slėgis. Dėl žemesnės temperatūros ir slėgio ši ekstrakcija trunka ilgiau, gaunama mažesnė išeią. Pagrindinis privalumas yra siejamas su tuo, kad ekstrakcijos metu nėra prarandami jautrūs temperatūrai junginiai, tokie kaip eteriniai aliejai [28].

1.5.2. Ekstrakcija tirpikliais padidintame slėgyje

Ekstrakcija tirpikliais esant didesniai slėgiui yra laikoma pažangia ekstrahavimo technika, kuri turi privalumų palyginant su tradiciniais ekstrakcijos metodais (ekstrakcija tirpikliais, maceravimas, hidrodistiliacija). Šios ekstrakcijos metu palaikoma aukštesnė temperatūra ir slėgis, kuris užtikrina, kad tirpiklis išliktų skystos būsenos viso proceso metu. Naudojant šias sąlygas pasikeičia tirpiklio fizikinės ir cheminės savybės: sumažėja tirpiklio klampa, padidėja masės perdavimo greitis bei analičių tirpumas. Dėl šių savybių gaunamos didesnės produkto išeiagos. Dėl galimybės pasirinkti platų tirpiklių asortimentą ekstrakcija tirpikliais yra universali technika. Tirpiklis turi būti parenkamas atsižvelgiant į ekstrahuojamų junginių pobūdį [29].

1.5.3. Ekstrakcija mikrobangomis

Šiame ekstrahavimo metode yra naudojamos mikrobangos, kad palengvintų analičių patekimą iš mėginio matricos į tirpiklį. Mikrobangų spinduliuotė sąveikauja su polinių (nuolat turi dipolio momentą) ir poliarizuojamų (elektriniame lauke įgauna dipolio momentą) medžiagų, tokių kaip tirpiklis, dipoliais. Dėl savo elektromagnetinės kilmės mikrobangos turi elektrinius ir magnetinius laukus. Elektrinis laukas sukelia kaitinimą per du vienu metu veikiančius mechanizmus: dipolinių sukimasi ir joninį laidumą. Dipolinis sukimasis atsiranda tiek tirpiklyje, tiek kietajame bandinyje dėl molekulių, turinčių dipolius. Tai sukelia susidūrimus su aplinkinėmis molekulėmis ir tokiu būdu šiluminė energija išsiskiria į terpę. Kaitinimas optimalus, kai yra didesnė tirpiklio dielektrinė konstanta. Todėl, skirtingai nuo laidaus šildymo metodų, mikrobangos šildo visą mėginį vienu metu. Molekulinių dipolių sukimasis taip pat skatina silpnų vandenilinių ryšių nutraukimą, kas palengvina tirpiklio patekimą į matricą [26, 30]. Jonų laidumo procesas yra srovės mechanizmas, kai energija perduodama iš vienos vietos į kitą. Mikrobangų poveikis labai priklauso nuo tirpiklio. Dažnai yra pasirenkamas tirpiklis, turintis didelę dielektrinę konstantą, gebantis gerai sugerti mikrobangų energiją. Gali būti naudojami ir mažą dielektrinę konstantą turintys tirpikliai, tokiu atveju kaista tik matrica, o tirpiklis išlieka vėsus. Pastaroji situacija yra patraukli termiškai jautrių junginių

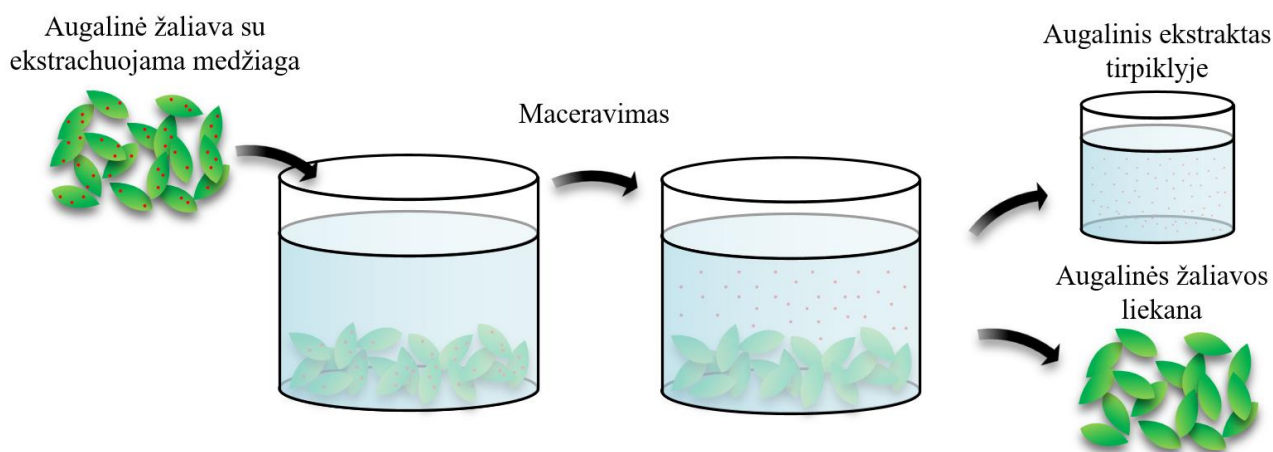
ekstrakcijoje ir buvo pritaikyta eteriniams aliejams ekstrahuoti. Mikrobangos selektyviai sąveikauja su polinėmis molekulėmis, esančiomis liaukose, trichomose, kraujagyslių audiniuose. Kaitinimas sukelia ląstelių išsiplėtimą ir plyšimą, o po to į tirpiklį išsiskiria ekstrahuojamos medžiagos [31].

1.5.4. Ekstrakcija ultragarsu

Šiame metode yra naudojamos ultragarso bangos, kurių diapazonas yra nuo 20 iki 2000 kHz. Jos pasižymi mechaniniu poveikiu ir taip gali pagerinti ekstrahavimo efektyvumą. Ekstrahavimas ultragarsu yra nebrangus ir efektyvus didelio masto komerciniams tikslams. Juo lengva naudotis, pasižymi trumpesne ekstrahavimo trukme, didesne išeiga. Dėl šio poveikio pagerėja tirpiklio įsiskverbimas į ląstelines medžiagas. Dėl ultragarso yra pažeidžiamos ląstelių sienelės, todėl gali išsiskirti jų turinys į tirpiklio aplinką. Šių bangų sklidimas sukelia mikroskopinių tuštumų arba burbuliukų susidarymą. Šios tuštumos gali būti užpildytos vandens garais ir periodiškai susitraukinėti ir augti kol galiausiai suyra sukeldamos kavitaciją. Išsiplėtimo ciklo metu burbuliukų paviršiaus plotas ir jų tūris didėja. Suspaudimo ciklo metu vyksta garų kondensacija ir išsiskiria dideli energijos kiekiai. Burbuliukų suirimas sukelia mechanines šlyties jėgas [26, 32].

1.5.5. Maceravimas

Maceravimas yra paprastas ekstrakcijos metodas, kurį galima atlikti be jokio papildomo šilumos šaltinio. Augalo mėginys paprastai yra sumalamas, kad padidėtų tirpiklio ir biologiškai aktyviųjų medžiagų sąveika. Tirpiklio ir tiriamos medžiagos mišinys paliekamas ekstrahavimo inde ir retkarčiais pamaišomas. Pasibaigus procesui, skystis nuo kietos medžiagos atskiriamas presuojant, centrifuguojant arba naudojant kitus metodus. Kadangi šis procesas atliekamas kambario temperatūroje, jam reikia ilgo ekstrahavimo laiko. Taip pat, siekiant išgauti kuo didesnę dominančių medžiagų kiekį, reikalingas didelis tirpiklio kiekis [32].



1.9 pav. Maceravimo procesas

1.5.6. Hidrodistiliacija

Hidrodistiliacija yra vienas iš tradicinių ekstrakcijos metodų, kuris jau seniai naudojamas eteriniams aliejams ir biologiškai aktyviems junginiams iš augalinių žaliavų išgauti. Šioje ekstrakcijos technikoje kaip tirpiklis naudojamas vanduo. Hidrodistiliavimas gali būti atliekamas trimis skirtingais būdais: vandens distiliacija (hidrodistiliacija), distiliacija vandeniu ir garais bei tiesioginė distiliacija garais. Šių procesų metu gali vykti terminis junginių skilimas ir hidrolizė, dėl naudojamos aukštos

temperatūros ir vandens. Vandens distiliacija ir tiesioginė distiliacija garais aprašyta toliau. Distiliacija vandeniu ir garais yra tarpinis variantas tarp anksčiau paminėtų metodų [32].

Vandens hidrodistiliacijos metu mėginys ir tirpiklis sumaišomas bendrame inde, t. y. tiriamoji medžiaga yra apsemta vandeniu ir kaitinama. Susidaro vandens garai, kurie sukelia ląstelių plyšimą ir eterinių medžiagų išsilaisvinimą iš augalinės medžiagos. Toliau lakūs junginiai garų fazėje transportuojami į kondensatorių, kur garai kondensuojami į skystį. Skysčių mišinys patenka į separatorių, kur vanduo ir eterinis aliejus atskiriami. Šio metodo privalumas yra tas, kad jis yra paprastas, taip pat gali būti naudojamas pigus tirpiklis. Hidrodistiliacijos metu labai svarbu palaikyti tinkamą temperatūrą, kad būtų išvengta terminio junginių skilimo. Taip pat ši ekstrakcija trunka ilgai ir jai reikia daug tirpiklio [26, 33].

Tiesioginė distiliacija garais apima garų generavimo aparatą. Jis užpildomas vandeniu. Vanduo ir tiriamoji medžiaga šiuo atveju yra atskirose talpose bei sąveikauja tik su vandens garais. Atliekant šį procesą pradžioje šviežia arba džiovinta medžiaga dedama į plieninį indą. Kita talpa su vandeniu yra kaitinama ir formuojasi garas. Garui veikiant augalinę medžiagą ląstelės suminkštinamos ir vyksta eterinių aliejų garavimas. Išsiskiriantis aliejus formuoja mažus eterinio aliejaus lašelius, kurie susimaišo su garais (nešikliu). Kartu jie patenka į aušinimo sistemą, kurioje kondensuojasi į skystį ir yra surenkami. Surinkimo inde susidaro du skirtingi sluoksniai. Dažniausiai aliejus yra ne toks tankus kaip vanduo, todėl jis sudaro viršutinį sluoksnį [34]. Distiliavimas garais yra speciali ekstrahavimo technika, kurią taikant yra išvengiama organinių junginių skilimo aukštoje temperatūroje [33].

1.6. Literatūros apžvalgos apibendrinimas

Žemės ūkio derlius gali būti prarandamas dėl įvairių biotinių ir abiotinių veiksnių. Prie derliaus sumažėjimo ir augalų ligų plitimo gali prisidėti abiotiniai veiksniai, tokie kaip atmosferos teršalai, žema arba aukšta temperatūra, mažas arba didelis šviesos kiekis. Biotiniai veiksniai sukelia infekcines ligas ir tai apima gyvuosius organizmus: aukštesnieji augalai, bakterijos, virusai, mikroskopiniai grybai ir t. t. Dideli derliaus nuostoliai netenkami dėl mikroskopinių grybų sukeltų augalų ligų. Dėl jų poveikio gali išsivystyti puvinys, alternariozė, obelių vėžys, atsiranda lapų dėmės vystosi kitos ligos ir simptomai mažinantys gaunamo derliaus kiekį. Siekiant kontroliuoti patogeninius ligų sukėlėjus gali būti naudojami alternatyvūs biokontrolės metodai: biofumigacija, antagonistiniai mikroorganizmai, eteriniai aliejai ir ekstraktai. Populiarėjantis yra augalinių fungicidų naudojimas. Tai yra biologiškai aktyvios medžiagos išskirtos iš augalinės kilmės žaliavos. Jų išskyrimui gali būti naudojami įvairūs ekstrakcijos metodai: maceravimas, virškritinė ir subkritinė ekstrakcijos, ekstrakcija mikrobangomis, ultragarsu, Soksleto ekstrakcija, hidrodistiliacija. Ištyrus biologiškai aktyvias medžiagas jas būtų galima pritaikyti įvairių patogeninių mikroorganizmų biokontrolėi.

2. Medžiagos ir tyrimų metodai

2.1. Tyrimų vieta

Tyrimai atlikti 2021–2022 metais birželio–rugsėjo mėnesiais Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro Sodininkystės ir daržininkystės instituto Augalų apsaugos laboratorijoje (LAMMC SDI).

2.2. Tyrimams naudojamos medžiagos

Tiriamajame darbe naudojami įvairūs, chemiškai grynai reagentai: bulvių dekstrozės agaras (PDA) mitybinė terpė (Liofilchem, Italija); 96 % etanolis – C₂H₅OH (MV GROUP Production, Lietuva); dejonizuotas vanduo; genominės DNR išskyrimo rinkinys (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva). DNR fragmentai dydžiams įvertinti „GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva)“. NDR dažas „MIDORI^{Green} (MG06)“. Skystas azotas, agarozė (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva), chloroformas (Sigma-Aldrich). Vaistinio čiobrelis (lot. *Thymus vulgaris* L.) eterinis aliejus, gvazdikmedžio (lot. *Syzygium aromaticum* L.) ekstraktas.

2.3. Tyrimams naudojama įranga

Laminaras *Esco Airstream® Class II* – naudojama siekiant išvengti užteršimo dalelėmis.

Aukšto slėgio laboratorinis autoklavas *CertoClav CV-EL 12 LGS* – atliekamas mitybinės terpės sterilizavimas.

Termostatas *MMM Friocell* – palaikoma pastovi temperatūra, drėgmė ir apšvietimas.

Mini purtyklė *Vortex V-1 plus* – naudojamas bandinių išmaišymui.

Elektrinis mikroskopas *Nicon Eclipse 80i* – atliekamas mikroskopinių grybų identifikavimas, vizualinis vertinimas.

Analitinės svarstyklės *Toledo MS-S* – naudojamos reagentų svėrimui.

Purtyklė *Biosan ES-20* – palaikomas pastovus mišinio plakimas.

Vandens distiliavimo įranga *Milipore* – paruošiamas distiliuotas vanduo.

Termocikleris *UNO96 Gradient (VWR)* – naudojamas patogenams identifikuoti.

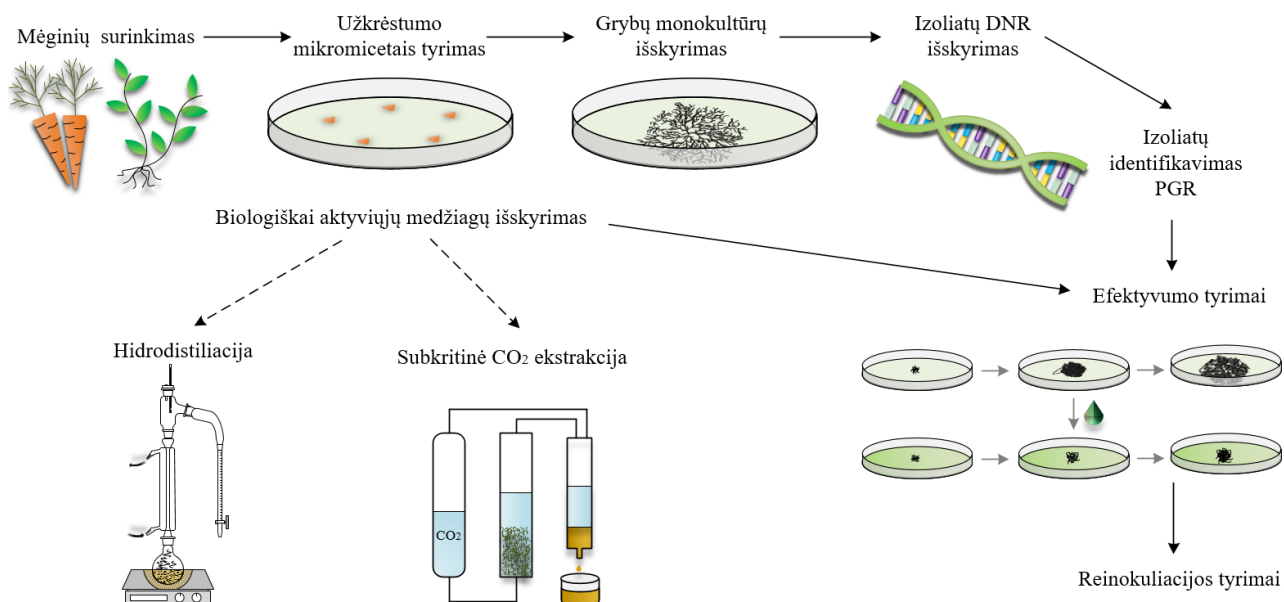
Transliuminatorius *Safe VIEW MINI2 (Cleaver Scientific)* – atliekama gelių analizė.

Clevenger tipo aparatūra – vykdoma distiliacija.

Subkritis CO₂ ekstraktorius – vykdoma ekstrakcija.

2.4. Tyrimų metodai

Tyrimų tikslui pasiekti ir uždaviniams įvykdyti naudojama metodika apimanti mitybinės terpės ruošimą, užkrėstumo mikromicetais tyrimą, grybų monokultūrų išskyrimą ir identifikavimą. Atliekamas augalinės kilmės, biologiškai aktyviųjų medžiagų išskyrimas bei mikroskopinio grybo augimo efektyvumo ir reinokuliacijos tyrimai. Trumpa tyrimų schema pateikta 2.1 paveiksle.



2.1 pav. Pagrindiniai tyrimų etapai

2.4.1. Mitybinės terpės ruošimas

Atliekant tyrimus buvo naudojama PDA (bulvių dekstrozės agaras) mitybinė terpė, kuri yra tinkama mielėms ir grybams auginti. Ji skatina sporuliaciją ir pigmentų gamybą [35]. Mitybinė terpė ruošta naudojantis gamintojo nurodyta metodika. Į 1 litrą autoklavuoto distiliuoto vandens dedama 42 g pasvertos mitybinės terpės mitelių. Turinys brkinamas ir gerai sumaišomas. Toliau vykdomas autoklavavimas 121 °C temperatūroje 15 min. Po autoklavavimo tirpalas aušinamas aplinkos temperatūroje iki ~45 °C ir pilstomas į *Petri* lėkšteles. Laukiama, kol įpiltas turinys pilnai sustingsta. Terpės pilstymas atliekamas laminare, siekiant išvengti terpės užkrėtimo pašaliniais mikroorganizmais.

2.4.2. Užkrėstumo mikromicetais tyrimas, naudojant agarizuotų terpių metodą

Tyrimo metu buvo taikomas agarizuotų terpių metodas [36]. Šis metodas skirtas nustatyti mikromicetų kolonijas sudarančių vienetų kiekiui. Tyrimams surinkti morkų šakniavaisių ir morkų pasėlyje vyraujančių piktžolių mėginiai.

Morkų šakniavaisių derlius nuimtas 2021 m. rugpjūčio mėnesio pabaigoje. Morkų mėginiai surinkti išilgai lauko, atsitiktine tvarka, tyrimui pasirinkti vizualiai sveiki šakniavaisiai. Tyrimuose naudojami morkų variantai (tyrimo objektas) ir bendra informacija nurodyta 2.1 lentelėje. Nuimtas morkų derlius yra nuplaunamas po tekančiu vandeniu. Morka supjaustoma griežinėliais (~2 mm pločio). Griežinėliai padalijami į smulkesnius fragmentus, o tolimesniems tyrimams pasirenkami maždaug vienodų parametrų fragmentai. Supjaustyti fragmentai sterilinami 3 min, 70 % etanolio tirpale (sunaikinama paviršinė mikroflora) ir plaunami 3–5 kartus steriliu vandeniu. Jie sudedami ant sterilaus filtrinio popieriaus ir džiovinami laminare. Toliau paruošti fragmentai steriliu pincetu dedami ant *Petri* lėkštelių su PDA mitybine terpe (žr. 2.2 pav. A). Ant vienos lėkštelės yra dedami 5 fragmentai ir taip užsėjamos 6 lėkštelės. Daromi 4 pakartojimai. Paruošti bandiniai inkubuojami termostate 22 °C temperatūroje. Po 2, 4, 7 parų vertinami išaugę grybai ir priskiriami atitinkamoms gentims. Grybų vertinimas atliekamas pagal būdingus grybams morfologinius požymius ir apibūdintojus [37]. Dominuojantys grybai persėjami ant naujų *Petri* lėkštelių.

Vertinimas: Morkų šakniavaisių užkrėstumo tyrime buvo vertinamas morkų dalių užkrėstumas grybais, bakterijomis ir mieliagrybiais, buvo skaičiuojamas jų skaičius ir iš visų pakartojimų vedamas vidurkis.

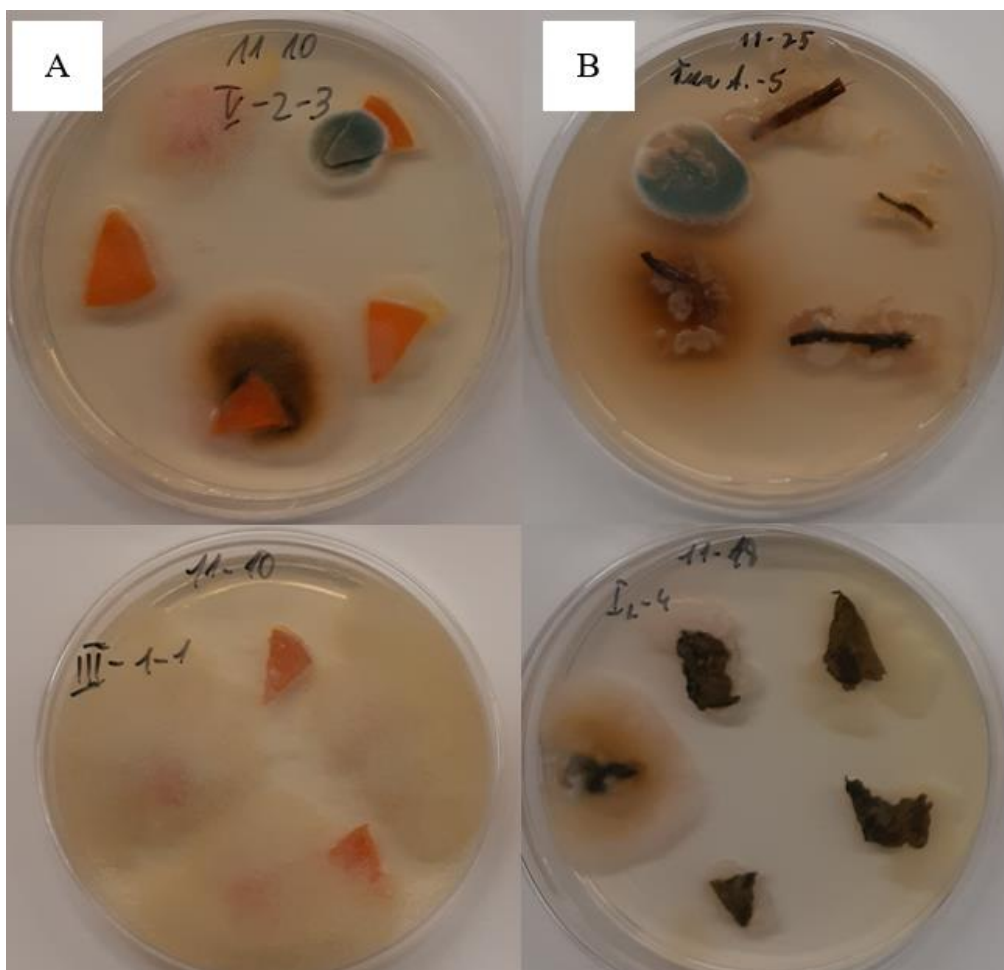
2.1 lentelė. Tyrimų metu naudotos morkos

Žymėjimas	Veislė	Surinkimo vieta ir metai
M1	NERAC	2021 m, Sodiniškystės ir daržiniškystės institutas, Babtai
M2	NERAC	2021 m, Sodiniškystės ir daržiniškystės institutas, Babtai
M3	NERAC	2021 m, Sodiniškystės ir daržiniškystės institutas, Babtai
M4	NERAC	2021 m, Sodiniškystės ir daržiniškystės institutas, Babtai

Piktžolių tyrimai atliekami identišškai pagal tyrimus su morkų fragmentais. Piktžolių fragmentai surinkti 2020 m morkų vegetacijos metu. Mėginiai surinkti išilgai lauko, atsitiktine tvarka surinkta 15–20 piktžolių augalų (vizualiai sveikų). Surinktos piktžolės sugrupuojamos pagal piktžolių rūšis, nukratomas dirvos perteklius nuo šaknų. Mėginiai sunumeruoti ir sudėti į popierinius maišelius išdžiovinami sausoje patalpoje. Mėginiai iki analizės laikyti kambario temperatūroje, sausoje patalpoje. Tyrimuose naudotos piktžolės ir bendra informacija pateikta 2.2 lentelėje. Prieš tyrimus piktžolės yra sukarpomos 1 cm ilgio fragmentais atskiriant augalo dalis. Buvo tirtos skirtingos augalo dalys: šaknys, stiebai, lapai, žiedynai priklausomai nuo naudojamo augalo. Piktžolių fragmentai paruošiami kaip ir morkų griežinėliai bei sudedami ant mitybinės terpės (žr. 2.2 pav. B), ir inkubuojama 22 °C temperatūroje termostate. Grybų, bakterijų ir mieliagrybių kolonijos identifikuotos pagal kultūrinius ir morfologinius požymius, įvertinamas grybų, mieliagrybių ir bakterijų skaičius [37].

2.2 lentelė. Tirtų piktžolių bendra informacija

Žymėjimas	Piktžolė	Surinkimo vieta ir metai
DA	Dirvinis asiūklis (lot. <i>Equisetum arvense</i>)	2020 m, Sodiniškystės ir daržiniškystės institutas, Babtai
GA	Smulkiažiedė galinsoga (lot. <i>Galinsoga parviflora</i>)	2020 m, Sodiniškystės ir daržiniškystės institutas, Babtai
ŠU	Bekvapis šunramunis (lot. <i>Tripleurospermum perforatum</i>)	2020 m, Sodiniškystės ir daržiniškystės institutas, Babtai

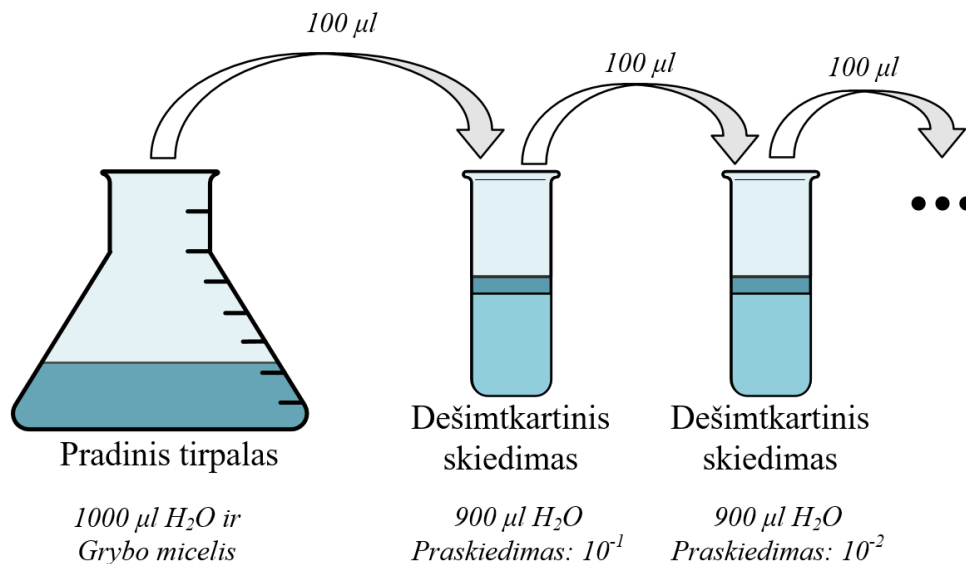


2.2 pav. A – Morkų fragmentai; B – Piktžolių fragmentai

2.4.3. Grybų monokultūrų išskyrimas

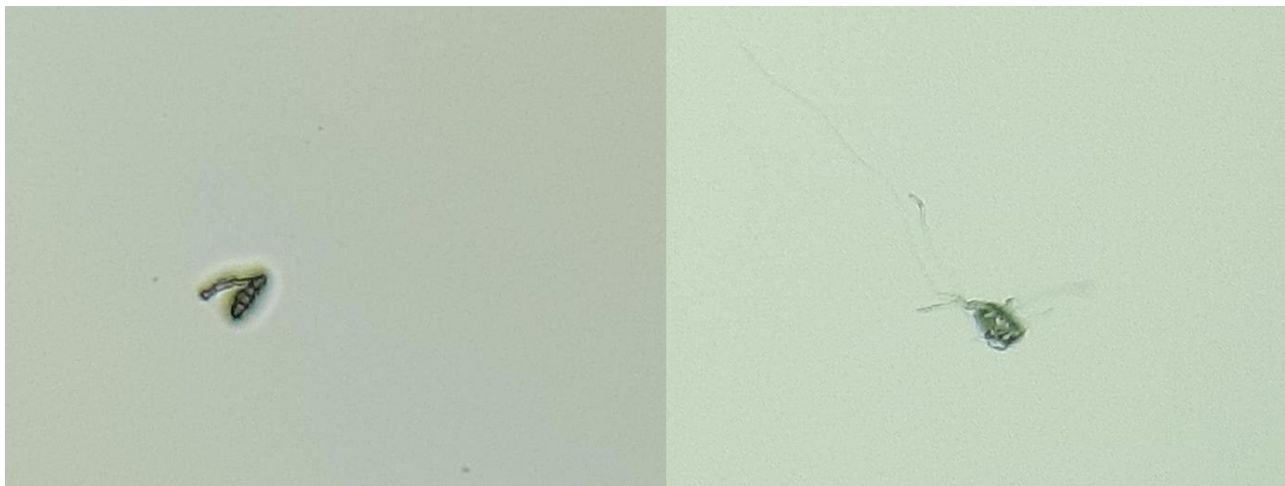
Iš piktžolių ir morkų fragmentų išskirti mėginiai persėjami į naujas *Petri* lėkšteles. Į kiekvieną *Petri* lėkštelę persėjama po vieną vizualiai į *Alternaria* gentį panašią grybo koloniją. Užaugę mikroskopiniai grybai identifikuojami mikroskopu (įvertinamos sporos) ir atrenkami *Alternaria* genties grybams (ALT) būdingi izoliatai tolimesniems tyrimams. Iš surinktų izoliatų išskiriamos monokultūros, kurios vėliau bus identifikuojamos molekuliniiais tyrimo metodais ir naudojamos efektyvumo bei reinokuliacijos tyrimuose.

Į *Eppendorf* tipo mėgintuvėlį su kintamo tūrio mechanine pipete įpilama 1000 μ l sterilaus distiliuoto vandens. Adatėle, pakaitinta virš liepsnos, paimamas nedidelis kiekis grybo micelio iš *Petri* lėkštelės ir dedama į mėgintuvėlį su vandeniu. Bandinys gerai sumaišomas naudojant mini purtyklę. Vykdomi dešimtkartiniai skiedimai (žr. 2.3 pav.): 100 μ l gautos suspensijos (reikia stengtis nepaimti micelio gabalėlių) perpilama į naują mėgintuvėlį su 900 μ l sterilaus distiliuoto vandens. Bandinys vėl gerai išmaišomas. Pasirenkami tokie skiedimai, kad lėkštelėje paskleistos sporos būtų pavienės ir nutolusios vienos nuo kitų. Iš gautos galutinės suspensijos imama 20 μ l, o iš pradinio tirpalo suspensijos 10 μ l tirpalo ir išpilama ant atskirų *Petri* lėkštelių su PDA terpe. Išpiltas turinys paskleidžiamas visame paviršiuje su Drigalskio sklaidytuvu. Daroma po tris pakartojimus su abejomis suspensijomis. Lėkštelės sudedamos į termostatą ir laikomos 12 valandų, 25 ± 2 °C temperatūroje.



2.3 pav. Paruošto tirpalo skiedimo pavyzdys

Po 12 valandų stebimas sporų augimas. Lėkštelės mikroskopuojamos sterilioje aplinkoje ir ieškomos sudygusios sporos (žr. 2.4 pav.). Surastos sporos pasižymimos žymekliu ir perkeliamos į naują *Petri* lėkštelę su PDA terpe. Ieškoma 10 sporų ir kiekviena jų perkeliama ant naujos *Petri* lėkštelės su terpe. Labai svarbu perkėlimo metu nepaimti papildomų sporų. Izoliatai iki tyrimų auginami tamsoje 25 ± 2 °C temperatūroje, kol grybas padengia visą *Petri* lėkštelės paviršių. Įvertinama ar tikrai perkelta viena monokultūra, jei ne procesas kartojamas. Monokultūros iki tolimesnių eksperimentų perkeliama ant naujų *Petri* ir saugomos šaldytuve ± 4 °C temperatūroje.



2.4 pav. Sudygusios mikroskopinių grybų sporos

2.4.4. Izoliatų DNR išskyrimas ir identifikavimas

Izoliatų DNR išskyrimas. Iš *Alternaria* spp. surinktų izoliatų monokultūrų išskirta DNR naudojant komercinį rinkinį „Genomic DNA Purification Kit“ pagal gamintojo nurodytą metodiką. DNR išskirti izoliatai nugramdomi steriliu metaliniu špateliu nuo PDA terpės ir perkeliamas micelis į grustūvėlę su skystu azotu. Mėginys sutrinamas, svarbu, kad mėginys neatšiltų.

DNR išskyrimo eiga:

1. 200 µl mėginio sumaišoma su 400 µl lizavimo tirpalo (angl. *Lysis Solution*), 2 µl Rnazės (RNase 10 mg/ml) ir inkubuojama 10 min 65 °C temperatūroje.
2. Įpilama 600 µl chloroformo (Sigma-Aldrich), pavartomi mėgintuvėliai 3–5 kartus ir centrifuguojama 2 min.
3. Naudojant pipetę viršutinis suspensijos sluoksnis perkeliamas į svarų mėgintuvėlį, įpilama po 800 µl nusodinimo tirpalo (angl. *Precipitation Solution*). 1–2 min maišoma apverčiant mėgintuvėlius kambario temperatūroje. Centrifuguojama 2 min ir skystis nupilamas.
4. Likusios nuosėdos ištirpinamos 100 µl NaCl tirpalo. Užpilama 300 µl šalto etanolio (98 %) ir 10 min laikoma šaldiklyje (-20 °C), centrifuguojama 5 min ir etanolis nupilamas.
5. Nuosėdos vieną kartą plaunamos 70 % šaltu etanoliumi. Etanolis nupilamas ir paliekama trumpam, kad pradžiūtų ir pilnai išsigaruotų etanolis. DNR ištirpinama 100 µl TE buferyje (100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0).
6. Iki PGR atlikimo DNR laikoma šaldiklyje (-20 °C).

Agarozės gelio paruošimas. DNR elektroforezei atlikti gaminamas 1,5 % agarozės gelis (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva), dažytas „RedSafe Nucleic Acid Staining Solution (20,000x) (iNtRON Biotechnology)“ dažu. Gelis ruošiamas į 100 ml 1x TAE buferio įberiant 1,5 g agarozės. Tuomet tirpalas, kaitinamas mikrobangų krosnelėje 2–3 min, kad agarozė visiškai ištirtų. Atvėsintas iki 60 °C temperatūros agarozės tirpalas supilamas į specialų rėmelį, įstatomos šukutės, skirtos šuliniams padaryti ir gelis paliekamas sustingti. Sustingus agarozės geliui, atsargiai išimamos šukutės, gelis įstatomas į elektroforezės rezervuarą ir užpilamas 1x TAE buferiu iki nurodytos žymės.

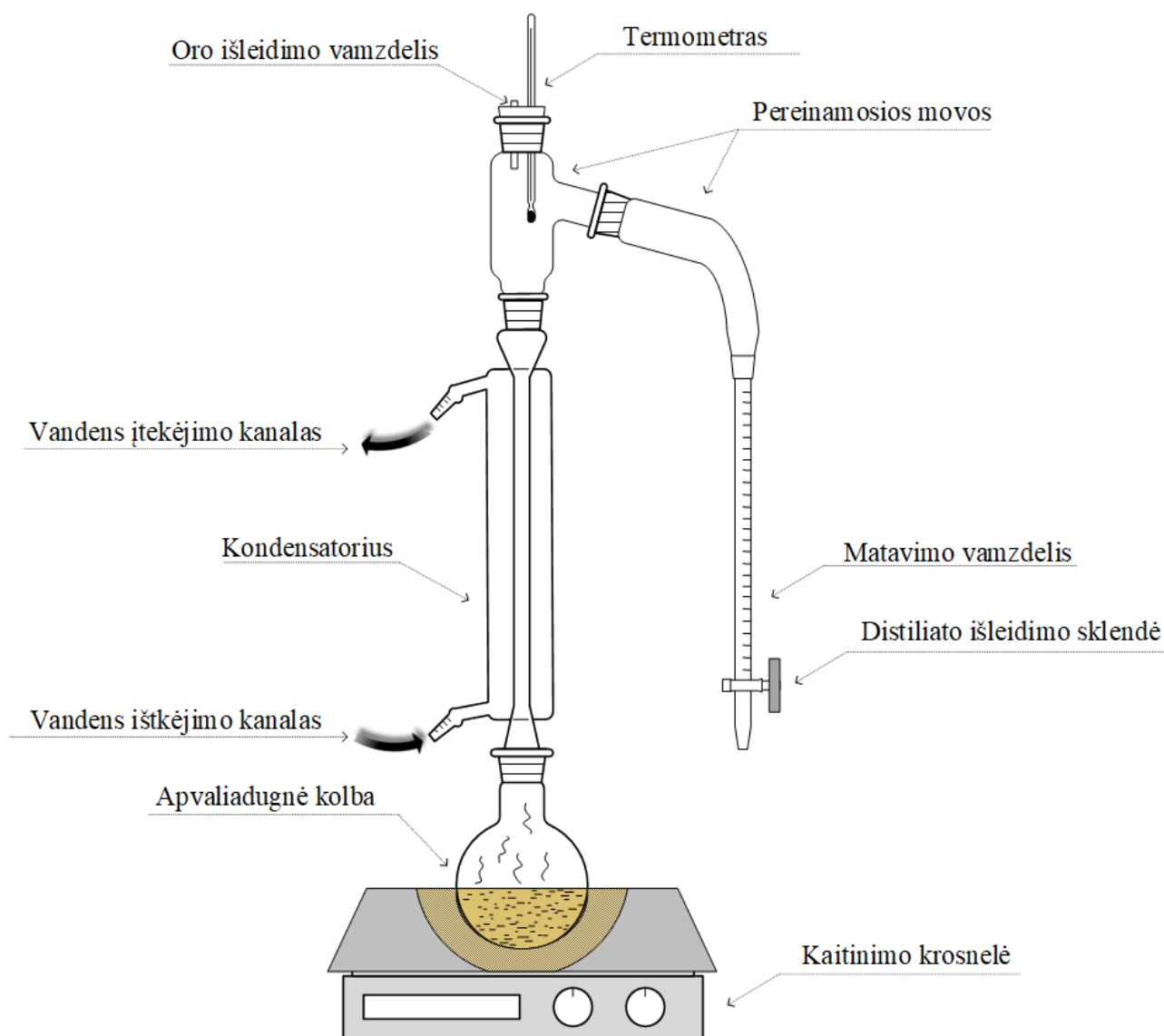
Tiriamąjo mėginio paruošimas. 5 µl DNR mėginio maišomi su 1 µl „MIDORI^{Green} DIRECT (MG06)“ dažu. Sumaišyti mėginiai atsargiai pilami į kiekvieną šulinį pradendant nuo antrojo. Į pirmąjį šulinį pilama 5 µl DNR fragmentų dydžiams įvertinti, naudojamas „GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder“.

Elektroforezė. Užpildžius visus šulinėlius elektroforezės rezervuaras yra uždengiamas specialiu dangteliu, sujungiami elektrodai ir įjungiamas maitino blokas. Elektroforezė vykdoma apie 60 min, esant srovės stiprumui – 90 V. Elektroforezės metu neigiamą krūvį turinčios DNR molekulės elektriniame lauke juda nuo katodo (neigiamo srovės šaltinio elektrodo) link anodo (teigiamo elektrodo). Procesui pasibaigus gelis išimamas iš elektroforezės rezervuaro. Geliai tiriami UV šviesoje transiliumatoriuje.

PGR identifikavimas. PGR reakcijos atliekamos naudojant reakcijos mišinį, kuriame yra *Alternaria* spp. rūšiai būdingi pradmenys. PGR reakcijos atliktos termocikleryje.

2.4.5. Eterinių aliejų išskyrimas

Vaistinio čiobrelio eterinis aliejus išgaunamas hidrodistiliacijos metodu, panaudojant *Clevenger* tipo aparatą (žr. 2.5 pav.). Tyrimams atsveriama 100 g išdžiovintos čiobrelių žaliavos, supilama į 2 litrų talpos apvaliadugnę kolbą, užpilama 600 ml distiliuoto vandens. Kolba dedama į kaitinimo mantiją ir kaitinama iki virimo. Surinkus aparatūrą pradedamas kaitinimas iki 100 °C temperatūros ir renkamas kondensatas, susidarantis kondensatoriuje. Hidrodistiliacijos proceso trukmė 2 valandos, slėgis – atmosferinis. Sklende atskiriamos fazės: išleidžiamas susidaręs vandens distiliatas ir į svarų mėgintuvėlį surenkamas eterinis aliejus. Po distiliacijos distiliatorius plaunamas 80 % acetono tirpalu. Eterinis aliejus iki tyrimų laikomas -20 °C temperatūroje. Pagal šią metodiką yra išgaunamas eterinis aliejus iš vaistinio čiobrelio (lot. *Tymus vulgaris*) (EA).



2.5 pav. *Clevenger* tipo aparatūra

2.4.6. Augalinių ekstraktų išskyrimas

Augaliniams ekstraktams išskirti taikoma subkritinė CO₂ ekstrakcija. Šio proceso metu į ekstraktorių dedama biomasė. Pradėjus procesą, dujų būsenos CO₂, paverčiamas skysčiu. Skystas CO₂, leidžiant per biomasę, veikia kaip tirpiklis ir vyksta įvairių nepolinių junginių ekstrakcija. Proceso parametrai:

ekstrakcijos trukmė 6 h, palaikoma 10 °C temperatūra ir 42 bar slėgis. Pasibaigus procesui CO₂ pašalinamas iš mišinio išgarinant. Galutinis produktas naudojamas tolimesniuose tyrimuose. Pagal šią metodiką yra išgaunamas ekstraktas iš gvazdikmedžio (lot. *Syzygium aromaticum* L.) (AE).

2.4.7. Eterinio aliejaus ir ekstraktų efektyvumo tyrimai

Tyrimuose naudojama PDA terpė į kurią įpilama atitinkamas kiekis eterinio aliejaus arba skirtinga augalinio ekstrakto koncentracija. Mitybinė terpė ruošama kaip ir 2.4.1 dalyje, tačiau šiuo atveju prieš supilstymą į lėkšteles į ją dar pilama eterinio aliejaus arba augalinio ekstrakto. Koncentracijos pateiktos 2.3 lentelėje. Viskas atliekama traukos spintoje, siekiant išvengti užkrėtimo pašaliniais mikroorganizmais. Ekstraktą ar aliejų įpylus į mitybinę terpę, ji gerai išmaišoma ir išpilstoma į naujas *Petri* lėkšteles.

2.3 lentelė. Eterinio aliejaus ir ekstrakto koncentracijos

Variantas			Koncentracija, µl/l	Išgavimo būdas
1	Kontrolė	-	-	-
2	EA	Vaistinio čiobreljo eterinis aliejus	100	Hidrodistiliacija
3-1	AE	Gvazdikmedžio ekstraktas	75	Subkritinė CO ₂ ekstrakcija
3-2			150	
3-3			225	
3-4			300	

Efektyvumo tyrimai atliekami prieš skirtingus *Alternaria* izoliatus. Jie yra pateikti 2.4 lentelėje.

2.4 lentelė. Tirtos *Alternaria* rūšys

Žymėjimas	Rūšis	Augalas šeimininkas
ALT1	<i>Alternaria alternata</i>	2020 m, SDI, dirvinis asiūklis
ALT2	<i>Alternaria alternata</i>	2020 m, SDI, morka
ALT3	<i>Alternaria botrytis</i>	2021 m, SDI, morka
ALT4	<i>Alternaria consortialis</i>	2020 m, SDI, smulkiažiedė galinsoga

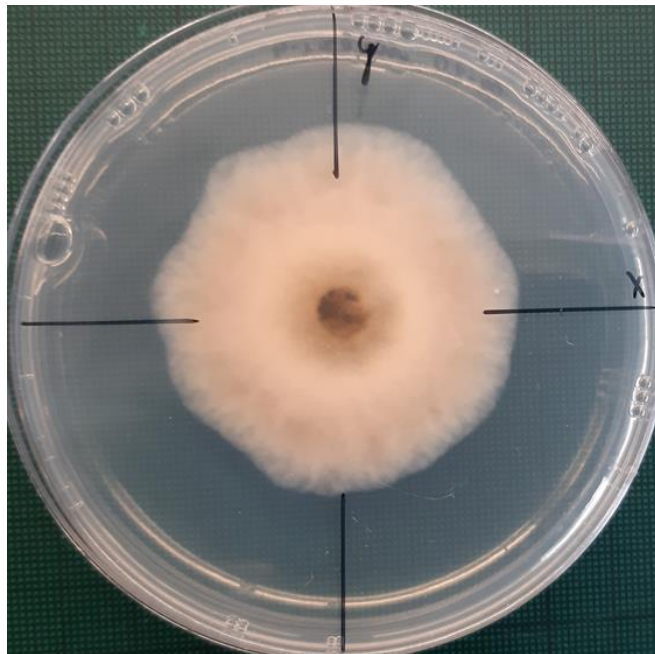
Paruošus terpę su eteriniu aliejumi ar ekstraktu ir jai sustingus *Alternaria* skirtingi grybai pasėjami ant *Petri* lėkštelių. Užaugusio grybo lėkštelėje nudegintu ir pilnai atvėsusiu korkaboru (diskų pjovimo įrankis) yra išpjunami 7 mm skersmens grybo diskeliai. Iškiristas diskelis, adatėle yra perkeliamas ant sustingusios mitybinės terpės centro, miceliu į apačią. Vienam variantui paruošiamos 6 lėkštelės, kiekvienu kartu keičiant arba nudeginant ėmimo adatą. Paruoštos *Petri* lėkštelės su skirtingais tiriamais izoliatais ir augaliniais ekstraktais perkeliama į 25 °C temperatūros termostatą. Vertinimai ir matavimai atliekami po 2, 5 ir 7 parų. Vertinimo metu matuojamas grybo skersmuo (x) ir ilgis (y) (žr. 2.6 paveikslas) bei aprašomi morfologiniai požymiai: micelio spalva, aukštis, tankumas, raštas, kita micelio pusė. Įvertinamas vidutinis grybo micelio skersmuo (mm) (žr. 2.1 formulė). Pagal gautus duomenis, taip pat, apskaičiuojama inhibicija (*I*) (slopinimas) pagal 2.2 formulę.

$$A = \frac{(x - d) + (y - d)}{2}; \quad (2.1)$$

čia A – vidutinis micelio skersmuo, mm;
 x – mikroskopinio grybo kolonijos skersmuo, mm;
 d – diskelio skersmuo, mm;
 y – mikroskopinio grybo kolonijos ilgis, mm.

$$I = \frac{A_{vid.K} - A_{vid.T}}{A_{vid.K}} \cdot 100\%; \quad (2.2)$$

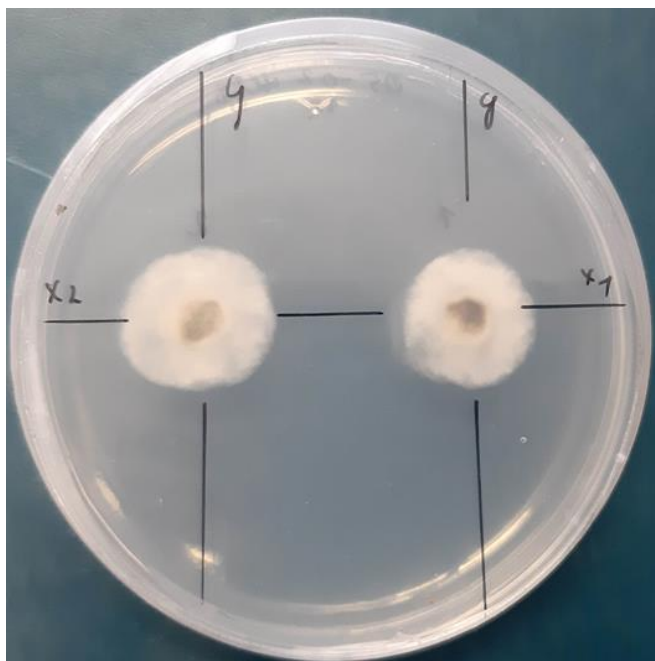
čia I – inhibicija, %;
 $A_{vid.K}$ – vidutinis kontrolės mikroskopinio grybo kolonijos skersmuo, mm;
 $A_{vid.T}$ – vidutinis tiriamojo mikroskopinio grybo kolonijos skersmuo, mm.



2.6 pav. Slopavimo efektyvumo matavimas

2.4.8. Reinokuliacija

Reinokuliacijos tyrimai atliekami siekiant įvertinti grybo atsistatymą po eterinio aliejaus ir augalinio ekstrakto poveikio. Reinokuliacija atliekama perkeliant tiriamo mikroskopinio grybo micelio iš kiekvieno efektyvumo tyrimo varianto ant naujos mitybinės terpės. Šiuo atveju nėra papildomai pridėtų biologiškai aktyviųjų medžiagų. Vienam variantui ruošama po dvi lėkšteles su PDA terpe. Iš kiekvieno varianto atrenkamos keturios *Petri* lėkštelės ir iš jų, specialiu įrankiu, iškertami 7 mm diskai. Po du išpjautus to paties varianto diskelius, miceliu į apačią, dedama ant paruoštų *Petri* lėkštelių su mitybine terpe. Paruošti bandiniai perkeliama į 25 °C temperatūros termostatą. Vertinimas ir matavimas atliekamas po 2 ir 4 parų. Vertinimo metu matuojamas grybo skersmuo (x) ir ilgis (y) (mm) (žr. 2.7 paveikslas) bei aprašomi morfologiniai požymiai: micelio spalva, aukštis, tankumas, raštas, kita micelio pusė. Įvertinamas vidutinis micelio skersmuo ir inhibicija (slopinimas) pagal 2.1 bei 2.2 formules.



2.7 pav. Reinokuliacijos matavimas

2.5. Tyrimo duomenų apdorojimas

Tyrimo duomenų analizė atlikta su *Microsoft Excel* programa. Apskaičiuojamos paklaidos, bakterijų, mieliagrybių ir grybų kolonijų vidutinis skaičius.

3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

Tyrimų metu buvo vertinama morkų šakniavaisiuose ir morkų pasėlio piktžolėse vyraujantys mikroskopiniai grybai. Buvo siekiama išskirti iš piktžolių ir morkų dalių *Alternaria* genties grybų monokultūras, jas identifikuoti molekuliniiais metodais bei įvertinti biologiškai aktyviųjų medžiagų poveikį jų augimo slopinimui. Efektyvumo tyrimo metu buvo vertinami mikroskopinio grybo morfologiniai požymiai. Šiems tikslams pasiekti pasitelkta aukščiau pateikta metodika.

Iš piktžolių ir morkų dalių mikroskopinių grybų monokultūrų (50 vnt.) išskirta 15 izoliatų, kurie identifikuoti molekuliniiais metodais su *Alternaria* spp. rūšiai būdingais pradmenimis. Iš jų pasirinkti 4 izoliatai įvertinti biologiškai aktyviųjų medžiagų poveikį jų augimo slopinimui (žr. 3.2. dalis).

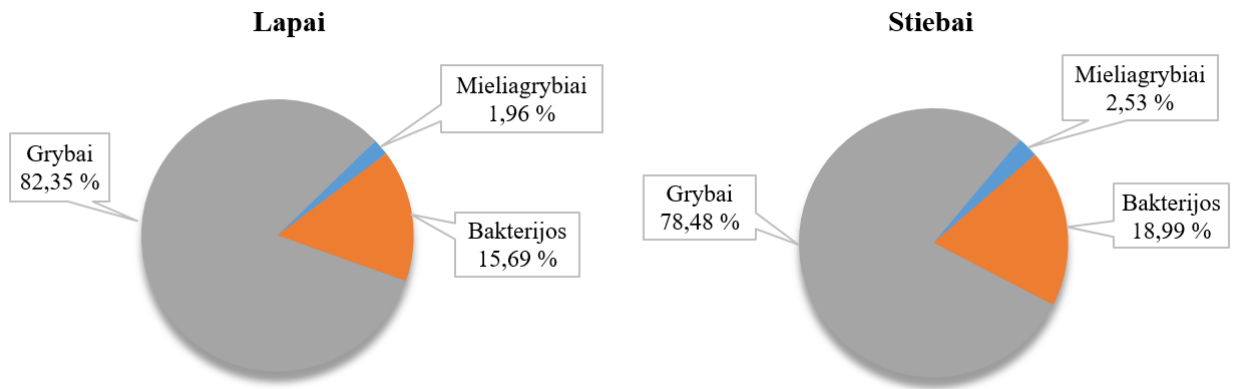
3.1. Morkų pasėlių užkrėstumas mikromicetais

Siekiant įvertinti morkų pasėlyje vyraujančių piktžolių ir morkų šakniavaisių užkrėstumą mikromicetais buvo vertinamas mikroskopinių grybų ir bakterijų paplitimas. Mikroskopiniai grybai, atsižvelgus į jiems būdingus požymius, priskiriami atitinkamoms gentims. Įvertinamas būdingų mikroorganizmų vidurkis tirtose lėkštelėse ir procentiškai išreiškiama bakterijų, mieliagrybių ir grybų genčių dalis.

3.1.1. Piktžolių užkrėstumas mikromicetais

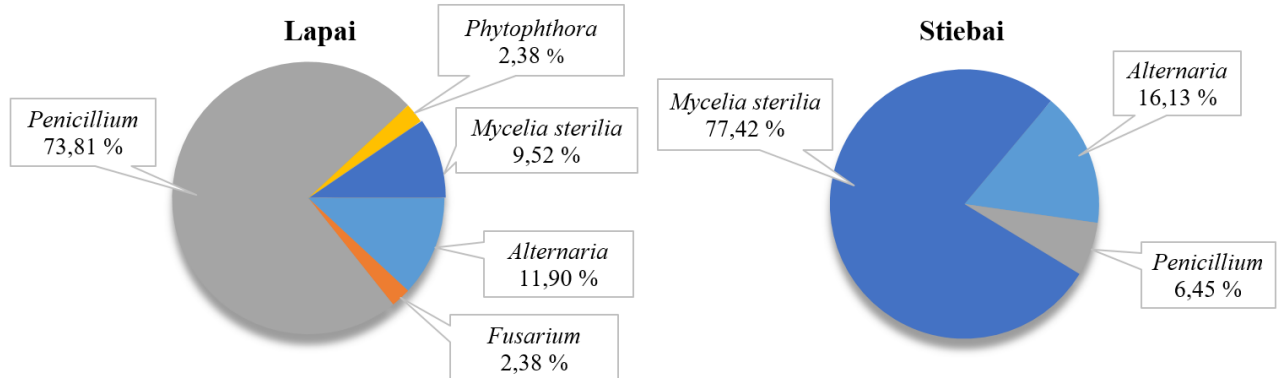
Mikroorganizmai plinta visoje daržo augalų sėjomainoje nuo vieno augalo šeimininko ant kito. Dėl šio plitimo gali būti užkrėsti sveiki augalai. Taip pat dalis piktžolių pažeidžiama tų pačių mikromicetų, todėl piktžolės tarnauja kaip grybinių ligų tarpiniai augalai šeimininkai. Užkrėstumo mikromicetais tyrimas leidžia įvertinti vyraujančias grybų rūšis ir mikroorganizmų įvairovę. Tyrimų metu buvo tirtos skirtingos, tuo metu vyravusios piktžolės: dirvinis asiūklis, smulkiažiedė galinsoga ir bekvapis šunramunis.

Surinkto **dirvinio asiūklio** dalys buvo karpomos į smulkesnius fragmentus ir taikant agarizuotų terpių metodą tiriamas jo užkrėstumas. Vertinamas bendras mikroorganizmų skaičius ir tiriama kokie mikroskopiniai grybai vyrauja pariktuose bandiniuose. Gauti rezultatai pateikti 3.1 ir 3.2 paveiksluose. Pagal 3.1 paveiksle pateiktus duomenis yra matoma, kad dirvinio asiūklio lapuose ir stiebuose didžiąją dalį mikroorganizmų sudaro grybai: 82,35 % lapuose, 78,48 % stiebuose. Bakterijų ir mieliagrybių buvo aptikta žymiai mažiau ir jie atitinkamai sudarė apie 17,34 % ir 2,25 % lapuose ir stiebuose.



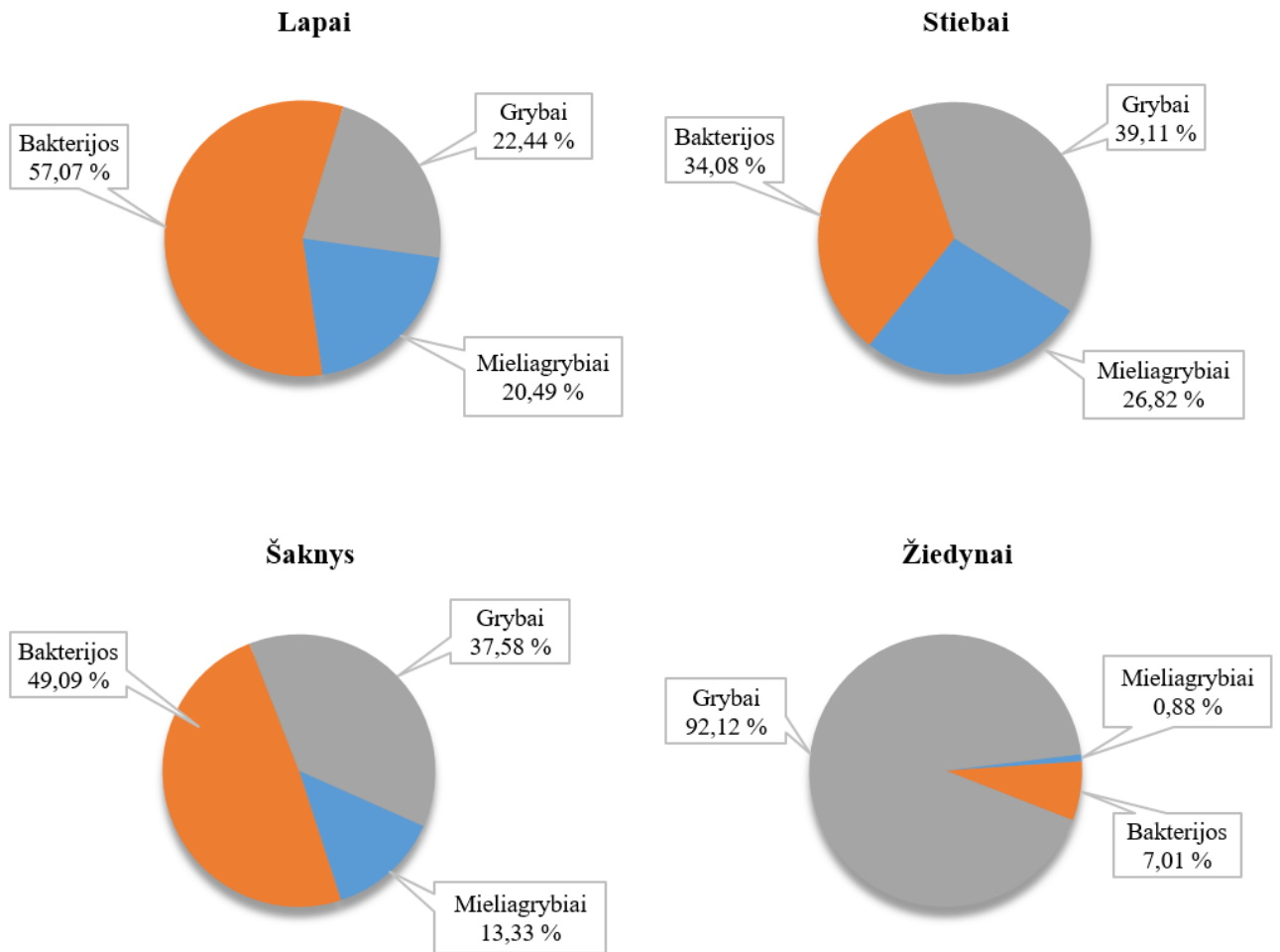
3.1 pav. Dirvinio asiūklio dalyse vyravusių grybų, bakterijų ir mieliagrybių procentas po 7 parų

Mikroskopiniai grybai buvo vertinami pagal kultūrinius ir morfologinius požymius. Tai leido kiekvieną koloniją priskirti atitinkamai grybų genčiai. Gauti rezultatai pateikti 3.2 paveiksle. Remiantis tyrimo duomenimis yra matoma, kad dirvinio asiūklio lapuose labiausiai paplitę *Penicillium* genties grybai, kurie sudaro 73,81 % visų mikroskopinių grybų. Taip pat lapuose buvo aptikta *Alternaria* spp., *Fusarium* spp. ir *Phytophthora* spp. grybų, kurie atitinkamai sudarė 11,90 %, 2,38 % ir 2,38 %. Likę mikroskopiniai grybai nebuvo priskirti jokiai būdingai genčiai. Stiebuose *Mycelia sterilia* grybai sudarė 77,42 %. Stiebuose vyravo dvi gentys: *Alternaria* ir *Penicillium*. Pastarosios atitinkamai sudarė 16,13 % ir 6,45 % visų aptiktų mikroskopinių grybų.



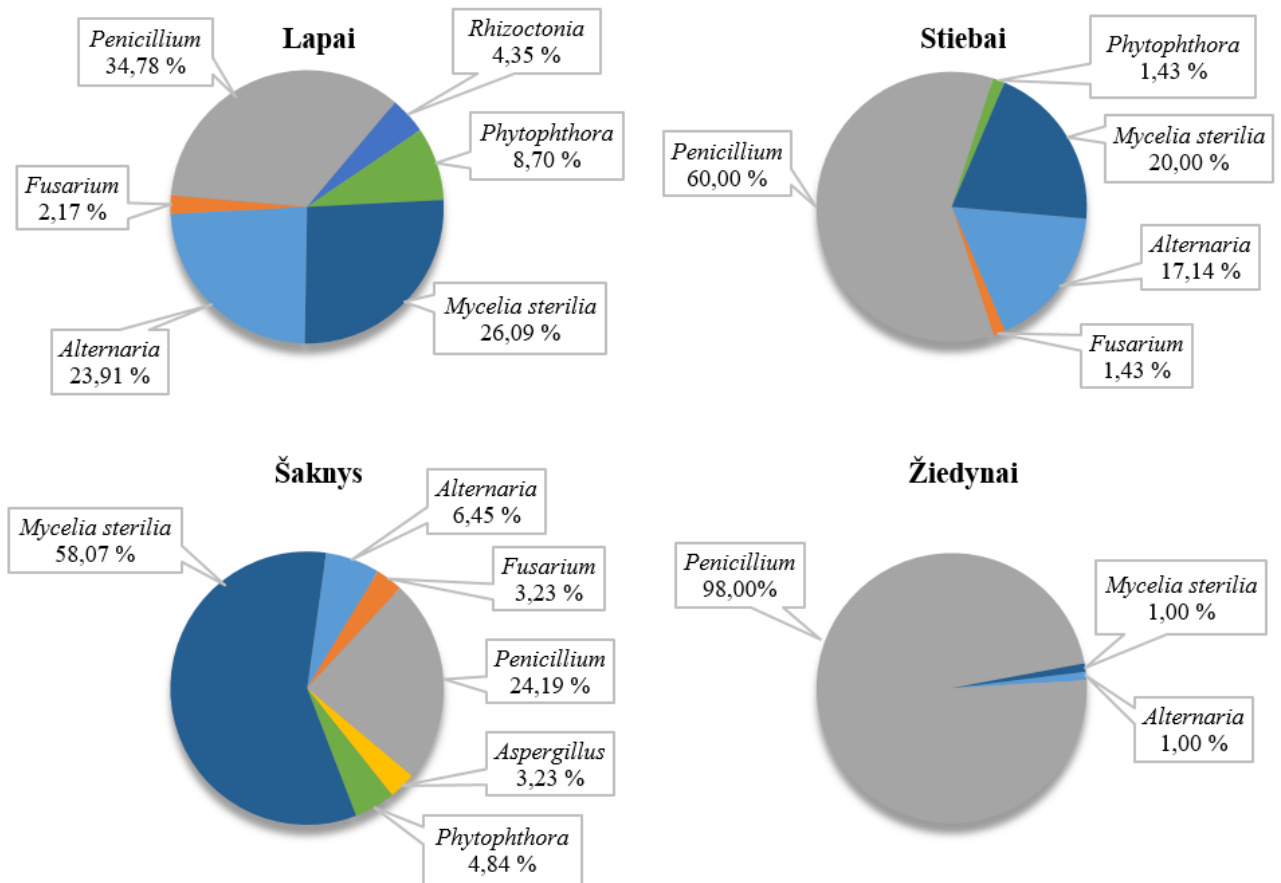
3.2 pav. Mikromicetų paplitimas dirvinio asiūklio dalyse

Bendra **smulkiažiedės galinslogos** mikroorganizmų procentinė dalis skirtingose augalo dalyse pateikta 3.3 paveiksle. Visose augalo dalyse buvo aptikta bakterijų, mieliagrybių ir mikroskopinių grybų. Pateiktuose rezultatuose galima matyti, kad pagrindinę mikroorganizmų dalį smulkiažiedės galinslogos lapuose ir šaknyse sudarė bakterijos. Lapuose jų dalis buvo 57,07 %, o šaknyse 49,09 %. Grybai šiose dalyse atitinkamai sudarė 22,44 % bei 37,58 %. Šaknyse ir stiebuose pagrindinę mikroorganizmų dalį sudarė mikroskopiniai grybai. Jų procentinė dalis stiebuose buvo 39,11 %, o žiedynuose 92,11 %.



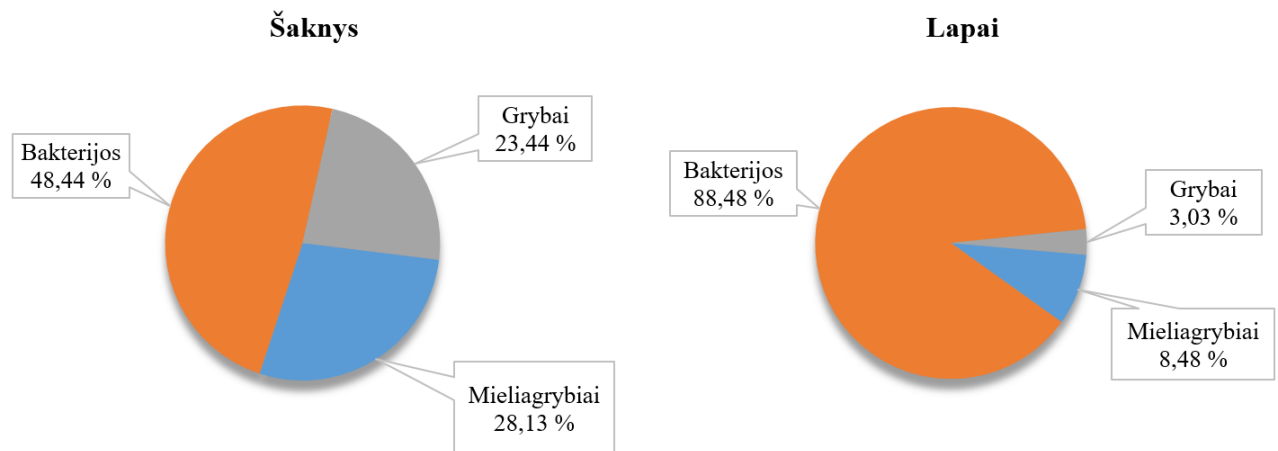
3.3 pav. Smulkiažiedės galinsogos dalyse vyravusių grybų, bakterijų ir mieliagrybių procentas po 7 parų

Atsižvelgiant į mikroskopinių grybų morfologiją jie buvo priskirti atitinkamos gentims pagal rūšiai būdingus apibūdintojus. Gauti rezultatai pateikti 3.4 paveiksle. Remiantis šiais duomenimis nustatyta, kad lapuose, stiebuose, šaknyse ir žiedynuose pagrindinę mikroskopinių grybų dalį sudaro *Penicillium* genties grybai. Paminėtose augalo dalyse jų procentinė dalis atitinkamai buvo 34,78 %, 60,00 %, 24,19 % ir 99,52 %. Visose augalo dalyse buvo aptikta *Alternaria* genties grybų. Ši gentis lapuose sudarė 23,91 %, stiebuose 17,14 %, šaknyse 6,45 %, žiedynuose 0,32 %. Taip pat buvo aptiktos ir kitos mikroskopinių grybų gentys: *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Phytophthora*, *Aspergillus*.



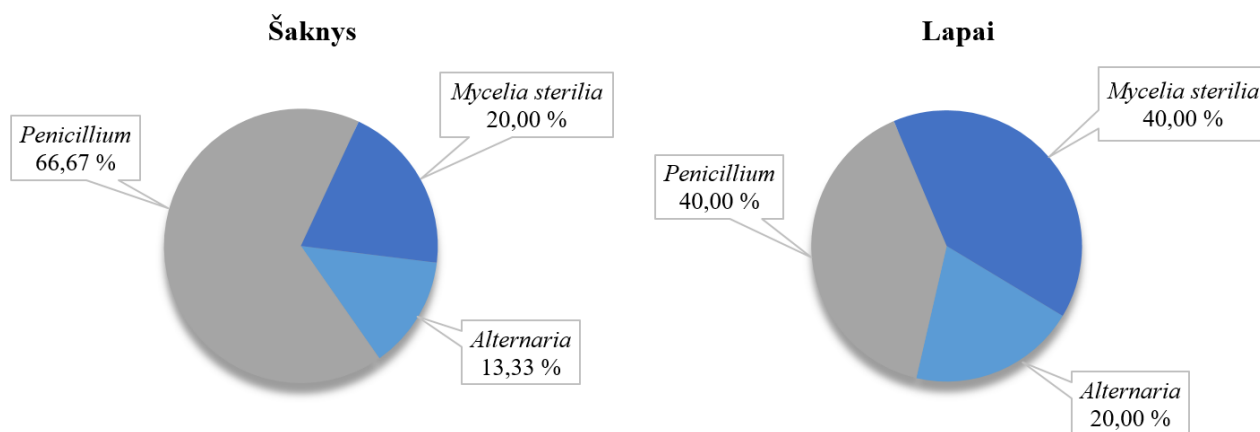
3.4 pav. Mikromicetų paplitimas smulkiažiedės galinsogos dalyse

Vykdam tyrimus, taip pat buvo tirta ir **bekvapio šunramunio** mikroorganizmų įvairovė. Remiantis gautais rezultatais (žr. 3.5 pav.) nustatyta, kad šaknyse ir lapuose vyrauja bakterijos. Šaknyse jų procentinė dalis sudaro 48,44 %, o antžeminėje dalyje 88,48 % visų aptiktų mikroorganizmų. Mikroskopiniai grybai šaknyse sudaro 23,44 %, o lapuose 3,03 %. Mieliagrybių buvo aptikta nežymiai daugiau: 28,13 % šaknyse ir 8,48 % lapuose.



3.5 pav. Bekvapio šunramunio dalyse vyravusių grybų, bakterijų ir mieliagrybių procentas po 7 parų

Įvertinus aptiktus mikroskopinius grybus, nustatytos būdingos gentys (žr. 3.6 pav.). Tyrimo metu buvo nustatytos dvi mikroskopinių grybų gentys: *Alternaria* ir *Penicillium*. Remiantis rezultatais yra matoma, kad lapuose ir stiebuose vyraavo *Penicillium* genties grybai, kurie atitinkamai sudarė 66,67 % ir 40,00 %. Mažesnę visų aptiktų grybų dalį sudarė *Alternaria* spp. Lapuose jų dalis buvo 20,00 %, o šaknyse 13,33 %. Likę mikroskopiniai grybai nebuvo atpažinti pagal būdingus morfologinius požymius (*Mycelia sterilia*).

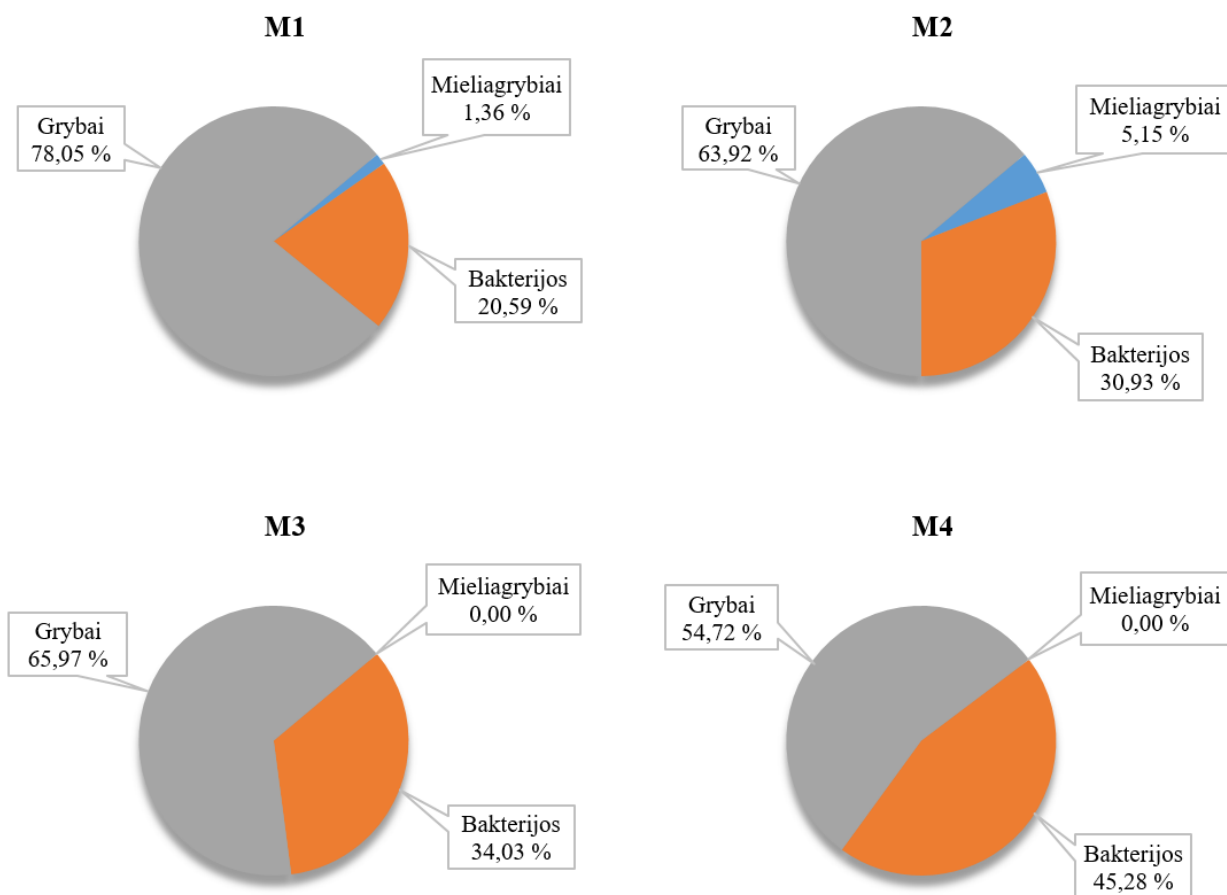


3.6 pav. Mikromicetų paplitimas bekvapio šunramunio dalyse

3.1.2. Morkų šakniavaisių užkrėstumas mikromicetais

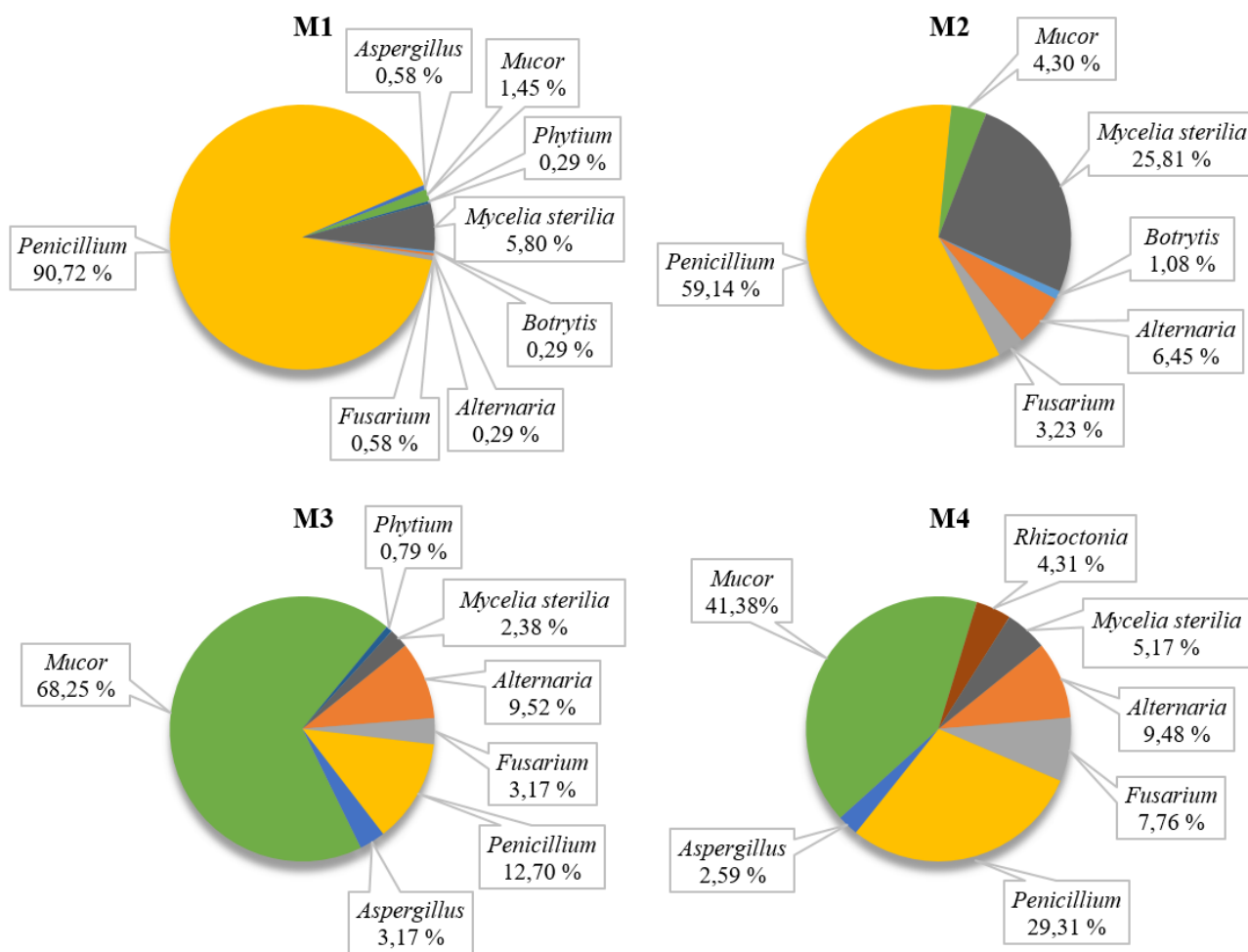
Įvertinus morkų aplinkoje augančių piktžolių užkrėstumą mikroorganizmais toliau atliekami tyrimai su morkų šakniavaisiais. Tiriamos morkos, kurių lapai augimo metu buvo purkšti biologiškai aktyviomis medžiagomis. Tyrimų metu tiriami sandėliuoti morkų šakniavaisiai bei vertinama jų mikroorganizmų įvairovė. Tiriamos kontrolinės nepurkštos morkos (M1), purkštos čiobrelių eteriniu aliejumi (M2), purkštos vaistinio čiobrelio ir vaistinio isopo ekstraktų mišiniu (M3) ir purkštos gvazdikmedžio ekstraktu (M4).

Surinktų morkų šakniavaisiai supjaustomi griežinėliais ir susmulkinami į mažesnius fragmentus. Atsitiktinai parinkti, panašių matmenų fragmentai analizuojami agarizuotų terpių metodu. Vertinamas bendras mikroorganizmų skaičius ir tiriama, kokie mikroskopiniai grybai vyrauja. 3.7 paveiksle pateikti rezultatai rodo vyraujančius mikroorganizmus tirtuose bandiniuose. Remiantis šiais duomenimis nustatyta, kad visuose tirtuose morkų šakniavaisiuose pagrindiniai vyraujantys mikroorganizmai yra mikroskopiniai grybai. Jų procentinė dalis M1, M2, M3 ir M4 morkose atitinkamai yra 78,05 %, 63,92 %, 65,97 % ir 54,71 %. Tirtuose šakniavaisiuose mažiausią dalį aptiktų mikroorganizmų sudaro mieliagrybiai. Aptiktų bakterijų procentinė dalis M1, M2, M3 ir M4 morkų šakniavaisiuose atitinkamai sudarė 20,59 %, 30,93 %, 34,03 % ir 45,28 %.



3.7 pav. Morkų šakniavaisiuose vyravusių grybų, bakterijų ir mieliagrybių procentas po 7 parų

Aptikti mikroskopiniai grybai buvo vertinami pagal jų morfologinius požymius. Gauti rezultatai pateikti 3.8 paveiksle. Pagal šiuos rezultatus galima matyti, kad tirtose M1 ir M2 morkose vyrauja *Penicillium* genties grybai bei jų procentinė dalis atitinkamai yra 90,72 % ir 59,14 %. Vyraujanti grybų gentis M3 ir M4 šakniavaisiuose yra *Mucor*, kuri atitinkamai sudaro 68,25 % ir 41,38 % visų aptiktų mikroskopinių grybų. Visuose morkų šakniavaisiuose buvo aptikta didelė įvairovė mikroskopinių grybų. *Botrytis* spp. buvo aptiktas kontrolinėse ir čiobrelių eteriniu aliejumi paveiktose morkose bei atitinkamai sudarė 0,29 % ir 1,08 %. *Alternaria* genties grybai buvo nustatyti visose morkų šakniavaisiuose. Jų procentinė dalis M1, M2, M3 ir M4 tirtose morkose atitinkamai siekė 0,29 %, 6,45 %, 9,52 %, 9,48 % visų aptiktų grybų. Taip pat visuose šakniavaisiuose buvo aptikta ir *Fusarium* spp. mikroskopiniai grybai bei jau anksčiau paminėti: *Penicillium* spp., *Mucor* spp., *Phytium* spp. nebuvo aptikta M2 ir M4 šakniavaisiuose, o *Aspergillus* spp. tik M2 šakniavaisiuose. *Rhizoctonia* genties mikroskopiniai grybai buvo aptikti tik ant morkų šakniavaisio, kurio lapai augimo metu buvo purkšti gvazdikmedžio ekstraktu. Hussin [38] tyrė mikroskopinių grybų paplitimą atvežtiniuose morkų šakniavaisiuose ir nustatė, kad morkų šakniavaisiuose galima aptikti įvairių grybų genčių: *Alternaria*, *Sclerotinia*, *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Rhizoctonia*, *Rhizopus*. Šie tyrimai atskleidė, kad patogeniškiausi buvo *Aspergillus* ir *Alternaria* genties grybai [38].



3.8 pav. Mikromicetų paplitimas morkų šakniavaisiuose

3.2. Biologiškai aktyviųjų medžiagų poveikis mikroskopiniams grybams

Įvertinus mikroskopinių grybų paplitimą morkų sėjomainoje (piktžolėse ir morkų šakniavaisiuose) tolimesniems tyrimams pasirinkti 4 izoliatai nuo skirtingų augalų šeimininkų. Biologiškai aktyviųjų medžiagų poveikis mikroskopiniams grybams vertinamas juos perkeliant ant mitybinės terpės su vaistinio čiobrelio eteriniu aliejumi (EA), ar skirtingomis gvazdikmedžio ekstrakto (AE) koncentracijomis. Rana [39] nustatė, kad gvazdikmedžio ekstraktas pasižymi aktyvumu prieš daug mikroskopinių grybų rūšių. Klaric ir kt. nustatė priešgrybinį vaistinio čiobrelio eterinio aliejaus poveikį skirtingoms mikroskopinių grybų gentims: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* ir t. t. [40].

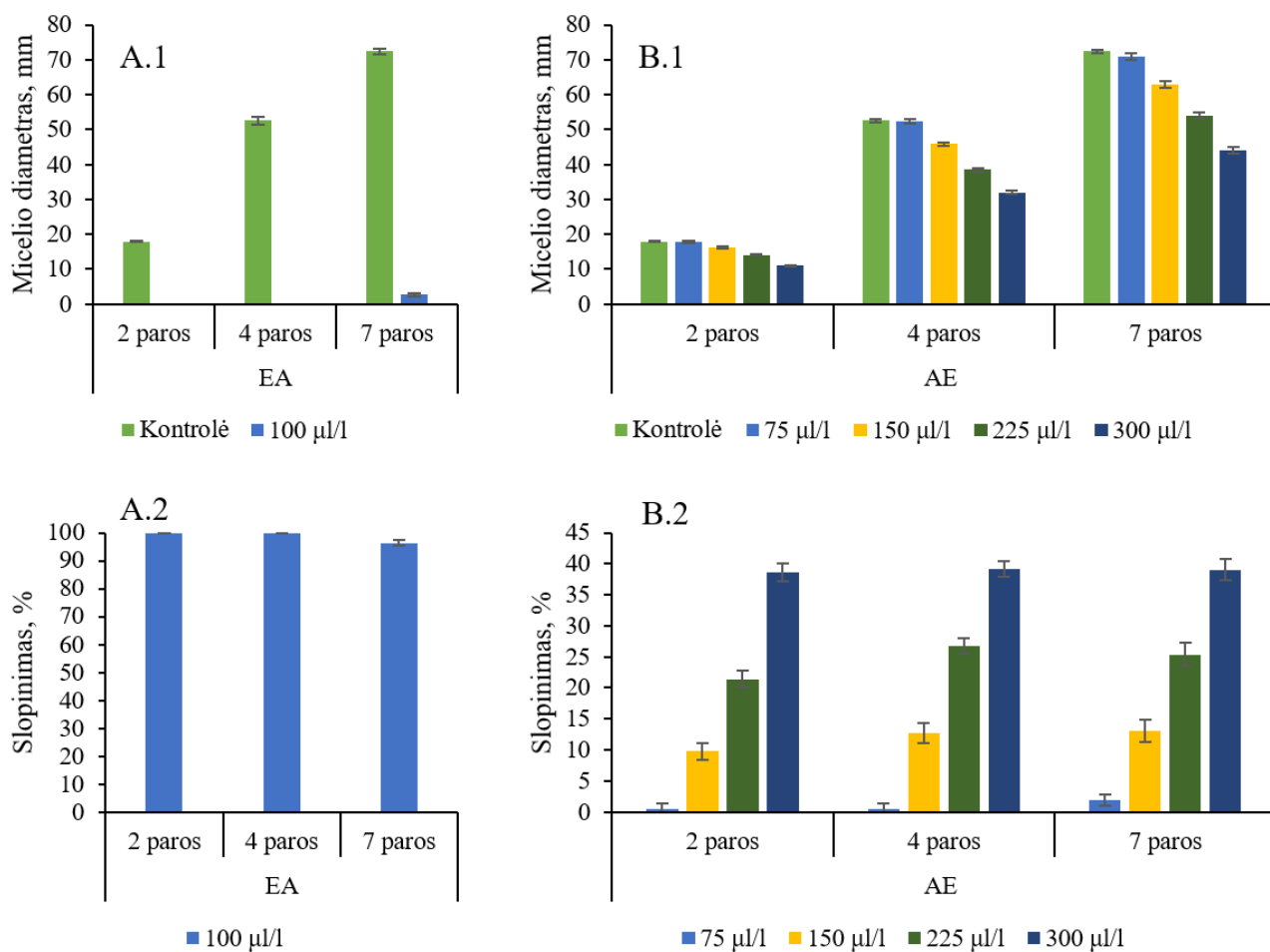
Tyrimų metu buvo matuotas mikroskopinių grybų micelio augimas bei apskaičiuojamas slopinimas. Po efektyvumo tyrimo atliekama reinokuliacija, kurios metu micelis perkeliamas ant naujos *Petri* lėkštelės, kurios mitybinėje terpėje nėra nei eterinio aliejaus, nei ekstrakto ir stebimas grybo atsistatymas po eterinio aliejaus ar ekstrakto poveikio. Šių tyrimų metu vertinamas biologiškai aktyviųjų medžiagų poveikis skirtingoms mikroskopinių grybų rūšims.

Išskirtų mikroskopinių grybų morfologiniai požymiai aprašomi juos vertinant vizualiai. Šis vertinimas buvo atliekamas biologiškai aktyviųjų medžiagų efektyvumo prieš mikroskopinius grybus

tyrimo metu. Įvertinama grybiena kontrolinėje lėkštelėje bei stebimi kitimai tiriamuosiuose bandiniuose.

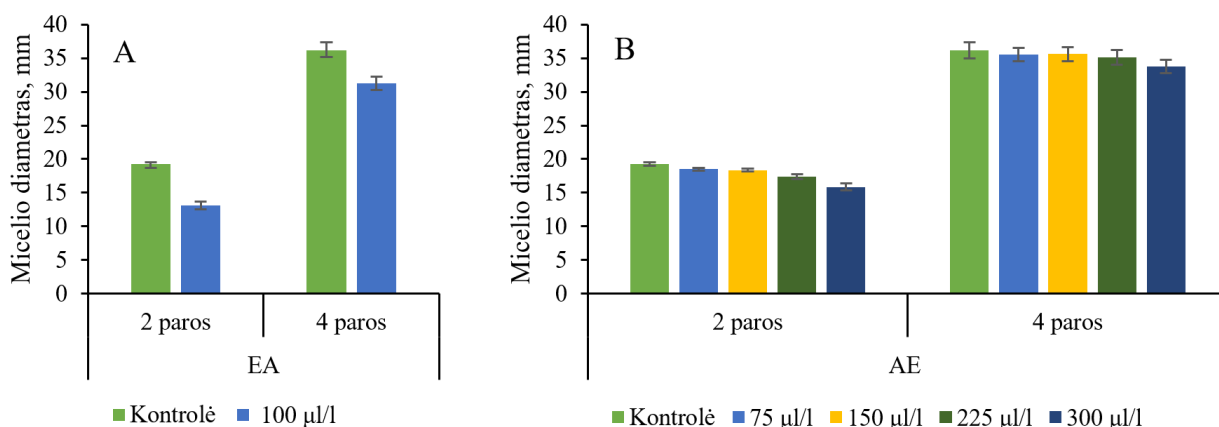
3.2.1. *Alternaria alternata* išskirta nuo dirvinio asiūklio

Alternaria alternata (ALT1) buvo išskirtas nuo dirvinio asiūklio ir toliau buvo vertinamas jo augimas paveikus EA ir AE. Tyrimo rezultatai, naudojant vaistinio čiobrelio eterinį aliejų ir gvazdikmedžio ekstraktą, pateikti 3.9 paveiksle. Remiantis šiais duomenimis yra matoma, kad 100 $\mu\text{l/l}$ koncentracijos vaistinio čiobrelio eterinis aliejus per pirmąsias keturias paras visiškai slopino ALT1 augimą (žr. 3.9 pav. A.1 ir A.2). Silpnėsi slopinimas pastebimas po 7 parų, kuris siekia 96,31 %, lyginant su kontrole. Šie duomenys leidžia teigti, kad slopinamasis eterinio aliejaus poveikis ilginiui silpsta. Aslam ir kt. nustatė slopinamąjį čiobrelio eterinio aliejaus poveikį *Alternaria alternata* micelio augimui naudojant 0,2, 0,4 ir 6 mg/ml koncentracijų eterinį aliejų. Jie teigė, kad didėjant eterinio aliejaus koncentracijai stiprėja ir slopinamasis poveikis [41]. B.1 ir B.2 grafikuose yra pateiktas gvazdikmedžio ekstrakto slopinamasis poveikis prieš tiriamąjį objektą. Pagal šiuos duomenis galima teigti, kad naudojant didesnę ekstrakto koncentraciją pasiekiamas efektyvesnis mikroskopinio grybo augimo slopinimas. Naudojant 75 $\mu\text{l/l}$ koncentracijos ekstraktą po 7 parų grybo slopinimas siekė 1,96 %, o naudojant 300 $\mu\text{l/l}$ jis padidėjo iki 39,06 %. Nepriklausomai nuo naudojamos ekstrakto koncentracijos slopinamasis poveikis išlieka pastovus po 7 parų vertinimo.



3.9 pav. Vaistinio čiobrelio eterinio aliejaus (A) ir gvazdikmedžio ekstrakto (B) poveikis prieš *Alternaria alternata* išskirtą nuo dirvinio asiūklio

Po efektyvumo tyrimų buvo atliktas reinokuliacijos tyrimas. Gauti rezultatai pateikti 3.10 paveiksle ir juose matoma, kaip po biologiškai aktyviųjų medžiagų poveikio pašalinimo mikroskopinis grybas vystosi. Tai leidžia teigti, kad ALT1 gali augti pašalinus EA ir AE poveikį, t. y. jis nėra sunaikinamas. 3.10 pav. A grafike matoma, kad mikroskopinio grybo micelio augimas yra mažesnis, lyginant su kontrole: kontroliniame variante micelio diametras po 4 parų buvo 36,13 mm, o tiriamajame 31,25 mm. Augimo skirtumas po 7 parų siekia 4,88 mm ir matomas slopinimas. Vertinant 3.10 pav. B grafiko duomenis, micelio augimas, po skirtingų koncentracijų ekstrakto pašalinimo, yra artimas kontrolei. Tai rodo kad tiriamo EA ir AE poveikis yra trumpalaikis, t. y. jis slopina ATL1, tačiau jo nesunaikina.



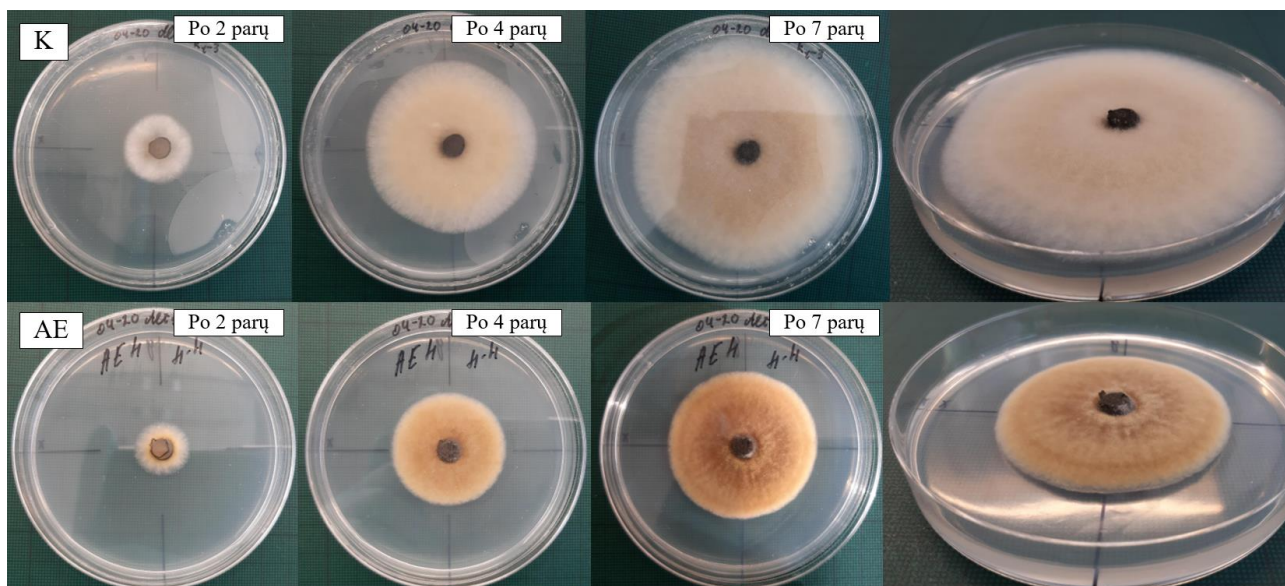
3.10 pav. *Alternaria alternata*, išskirtos nuo dirvinio asiūklio, reinokuliacijos tyrimo rezultatai po vaistinio čiobrelio eterinio aliejaus (A) ir gvazdikmedžio ekstrakto (B) poveikio pašalinimo

3.2.1.1. *Alternaria alternata*, išskirtos nuo dirvinio asiūklio, morfologija

Alternaria alternata (ALT1), auginta 7 paros be jokio biologiškai aktyviųjų medžiagų poveikio, formuoja žemą, šviesios spalvos grybieną (žr. 3.11 pav. K). Grybienos kraštai balti arba gelsvi, o vidinė dalis tamsesnė: šviesiai ruda, oranžinė spalvos. Tarp micelio krašto ir vidinės dalies matosi neryškus, šviesesnis žiedas. Apatinė grybienos dalis yra šviesi. Nuo krašto link centrinės grybo dalies proporcingai kinta grybienos spalva: nuo baltos, gelsvos iki šviesiai rudos. Grybienos apačia yra silpnai rausva. Taip pat matomas neryškus šviesus žiedas. Grybui pradėjus augti (grybiena po 2 parų) formuojamas šviesus micelis, kuris vėliau patamsėja.

ALT1, auganti ant mitybinės terpės, kuri turi augalinio ekstrakto, formuoja tamsesnę micelį, lyginant su kontrolės variantu (žr. 3.11 pav. AE). Grybienos kraštai yra balti arba gelsvi, tačiau šių spalvų plotas yra labai mažas. Centrinėje grybo dalyje vyrauja oranžinė ir ruda spalvos. Netoli krašto matomas oranžinis žiedas. Grybienos apačia šviesiai ruda su rausvu atspalviu, kraštai balti, gelsvi. Matomas neryškus šviesios spalvos žiedas. Kai mitybinėje terpėje naudojamas ekstraktas jau pirmojo vertinimo metu matomas tamsesnis micelis. Toks morfologinis apibūdinimas galioja visoms naudotoms ekstrakto koncentracijomis su kuriomis pastebimas grybienos augimo slopinimas.

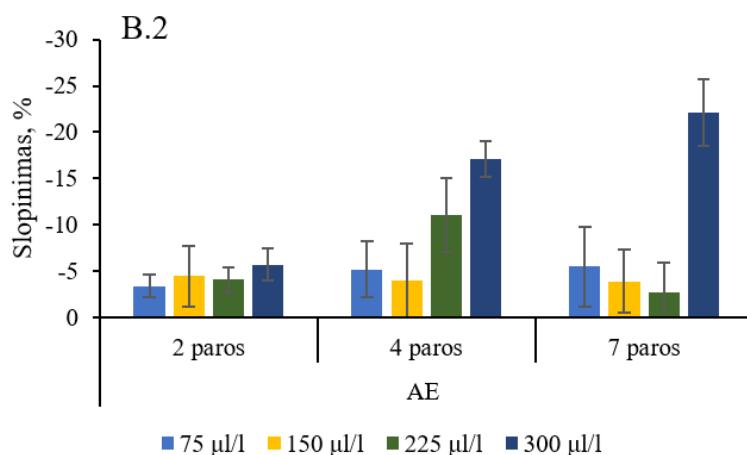
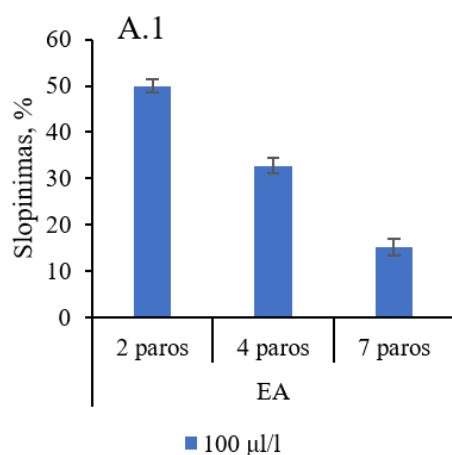
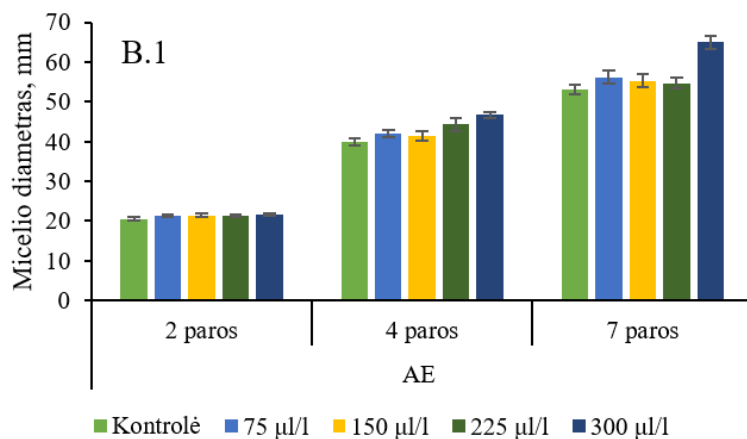
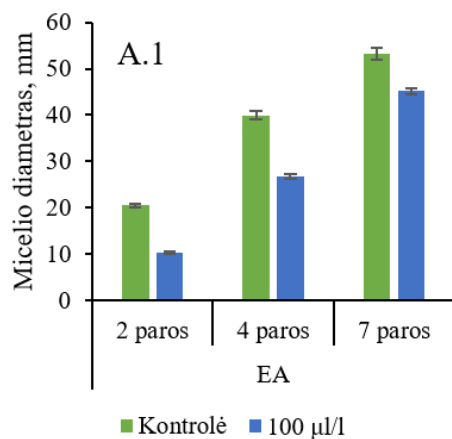
Veikiant eteriniu aliejumi, po 7 parų buvo matomas smulkus, baltas micelis. Eterinis aliejus slopino grybienos augimą ir daugiau būdingų morfologinių požymių nebuvo matoma.



3.11 pav. Morfolginiai ALT1 požymiai: kontrolė (K) ir gvazdikmedžio augalinis ekstraktas (AE)

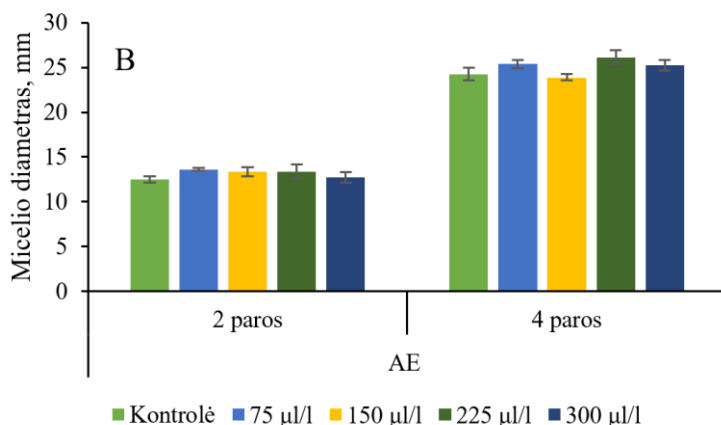
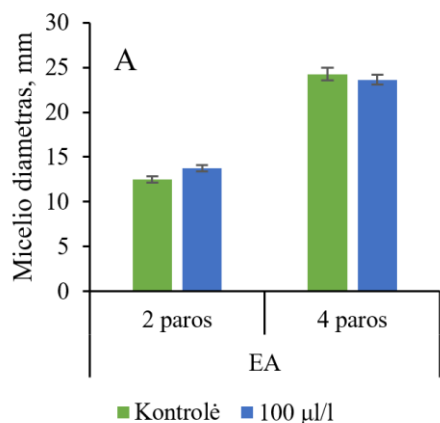
3.2.2. *Alternaria alternata* išskirta nuo morkos šakniavaisio

Efektyvumo tyrimo rezultatai prieš *Alternaria alternata* (ALT2) pateikti 3.12 paveiksle. Šis mikroskopinis grybas buvo išskirtas nuo *NERAC* morkos šakniavaisio ir toliau buvo vertintas biologiškai aktyviųjų medžiagų poveikis jo augimui. Remiantis gautais duomenimis galima matyti, kad 100 $\mu\text{l/l}$ koncentracijos eterinis aliejus slopina ALT2 vystymąsi (žr. 3.12 pav. A.1 ir A.2). Po 2, 4 ir 7 parų šis slopinimas, lyginant su kontrole, atitinkamai siekia 50,00 %, 32,78 % ir 15,18 %. Matomas laike silpstantis slopinamasis poveikis. Toliau buvo vertintas gvazdikmedžio ekstrakto poveikis *Alternaria alternata* mikroskopiniam grybui, o rezultatai pateikti 3.12 pav. B.1 ir B.2 grafikuose. Juose matomas intensyvesnis arba artimas kontrolei mikroskopinio grybo augimas. Pagrindinis micelio augimo skirtumas pastebimas po 7 parų kai yra naudojamas 300 $\mu\text{l/l}$ koncentracijos ekstraktas. Šuo atveju matomas augimo skatinimas, kuris siekia 22,07 %.



3.12 pav. Vaistinio čiobrelio eterinio aliejaus (A) ir gvazdikmedžio ekstrakto (B) poveikis prieš *Alternaria alternata* išskirtą nuo morkos šakniavaisio

Toliau buvo atliktas reinokuliacijos tyrimas, o gauti rezultatai pateikti 3.13 paveiksle. Remiantis gautais duomenimis galima matyti, kad ir po vaistinio čiobrelio eterinio aliejaus, ir po gvazdikmedžio ekstrakto poveikių pašalinimo mikroskopinis grybas ima augti įprastai. Rezultatai gaunami artimi kontrolės variantui ir nepastebima didelių skirtumų tarp vertinimų, o tai rodo, kad tirtų biologiškai aktyviųjų medžiagų poveikis yra trumpalaikis.



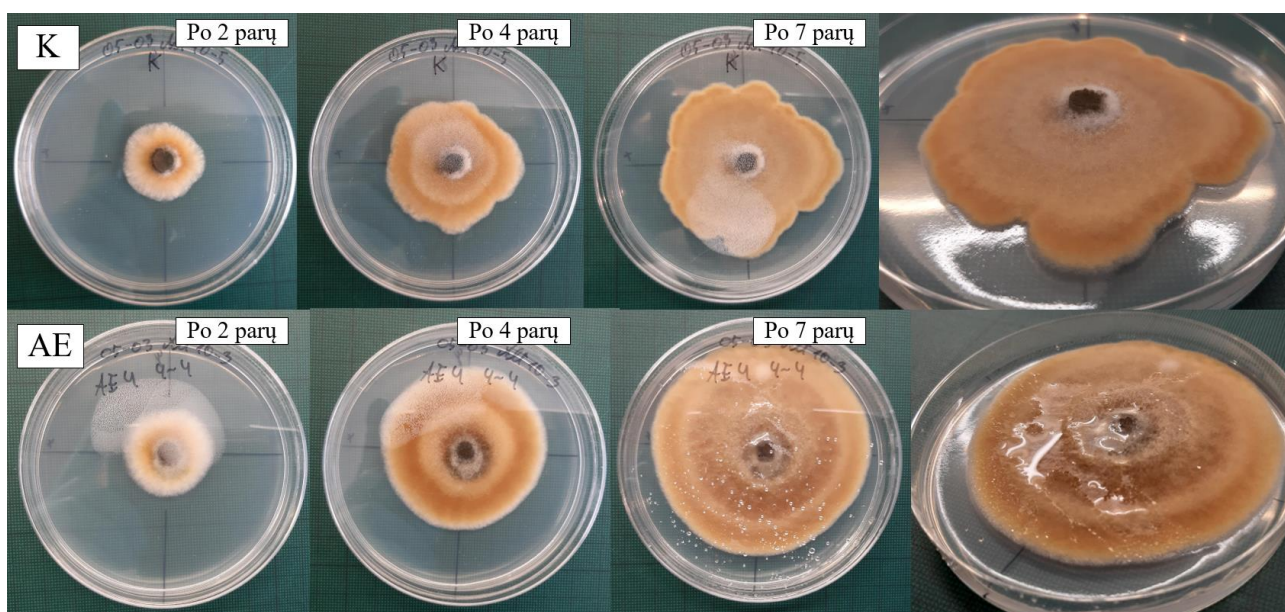
3.13 pav. *Alternaria alternata*, išskirtos nuo morkos šakniavaisio, reinokuliacijos tyrimo rezultatai po vaistinio čiobrelio eterinio aliejaus (A) ir gvazdikmedžio ekstrakto (B) poveikio pašalinimo

3.2.2.1. *Alternaria alternata*, išskirtos nuo morkos šakniavaisio, morfologija

Po 7 parų augimo įvertinus *Alternaria alternata* (ALT2) požymius kontrolinėse lėkštelėse yra matoma, kad grybas formuoja žemą, oranžinės ir rudos spalvos su nelygiais kraštais grybieną (žr. 3.14 pav. K). Grybienos kraštai turi nedidelį balto micelio kiekį, o visas kitas plotas yra oranžinis ir rudas su šviesesnių žiedų plotais. Grybienos apačioje vyrauja ruda spalva. Matomi pasikartojantys žiedai, kurie išorinėje dalyje šviesiai rudi, o vidinėje dalyje rudi ir tamsiai rudi. Nagrale ir kt. savo tyrimuose aprašė, kad *Aternaria alternata* genčiai būdingos rudos, tamsiai rudos spalvos struktūros [42].

Mikroskopinio grybo ALT2 augimas skatinamas veikiant jį augaliniu ekstraktu. Tai lemia ir jo morfologinių savybių pakitimą (žr. 3.14 pav. AE). Remiantis gautais rezultatais buvo pastebėta, kad ekstraktu paveiktas grybas formuoja grybieną lygiais kraštais. Formuojamas micelis po 7 parų yra aukštesnis, kraštuose vyrauja šviesesnės spalvos grybiena, o centrinėje dalyje tamsesnė. Būdingi skirtingų atspalvių žiedai. Grybienos apačia šviesiai ruda, o žiedai yra neryškūs.

Eteriniu aliejumi papildytoje mitybinėje terpėje mikroskopinio grybo micelis panašus į AE papildytą. Šiuo atveju, taip pat matoma, kad grybiena formuoja lygius kraštus, formuojami žiedai. Šiuo atveju formuojamas micelis yra šviesesnis, o micelio apačioje matomi žiedai yra ryškesni.

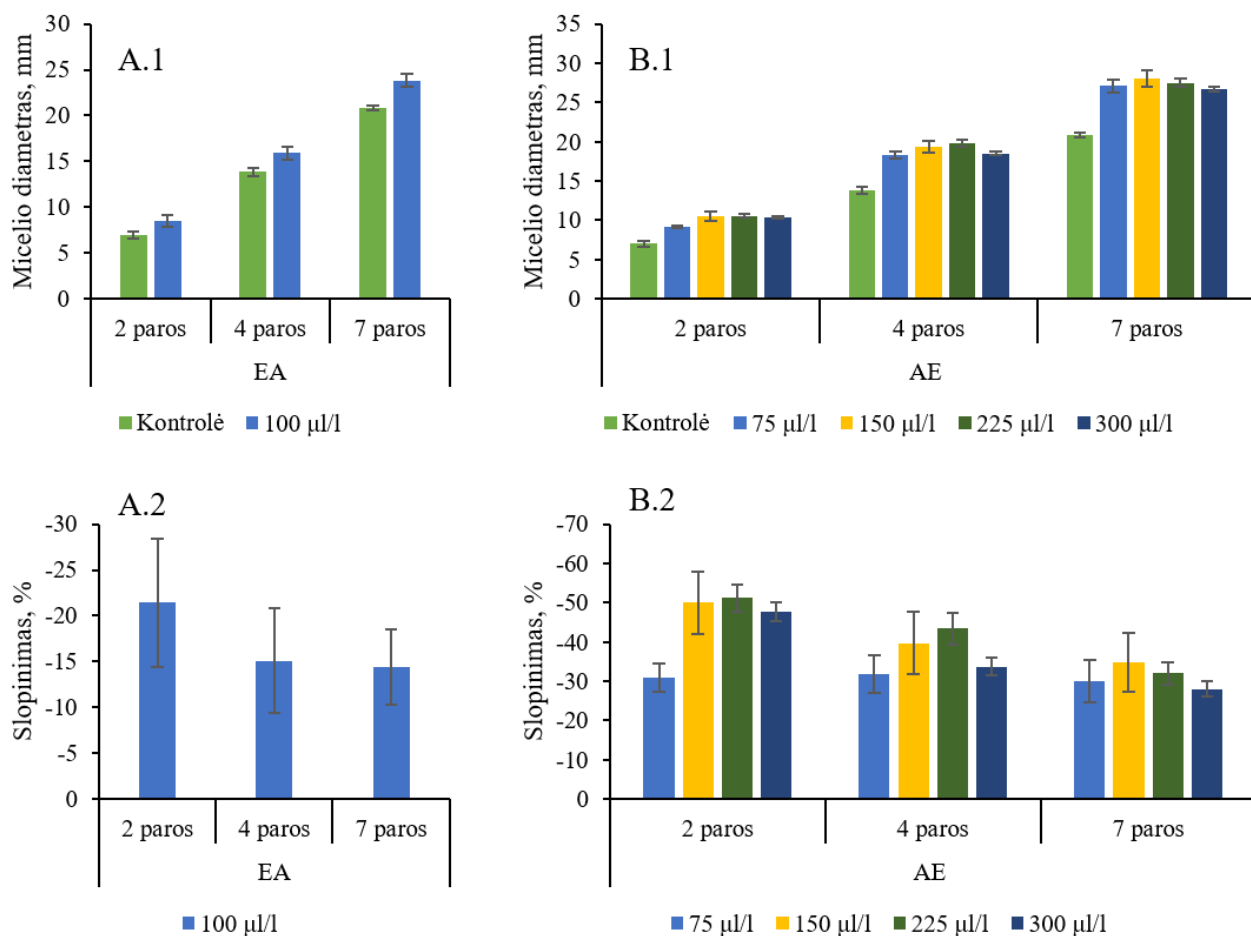


3.14 pav. Morfologiniai ALT2 požymiai: kontrolė (K) ir gvazdikmedžio augalinis ekstraktas (AE)

3.2.3. *Alternaria botrytis* išskirta nuo morkos šakniavaisio

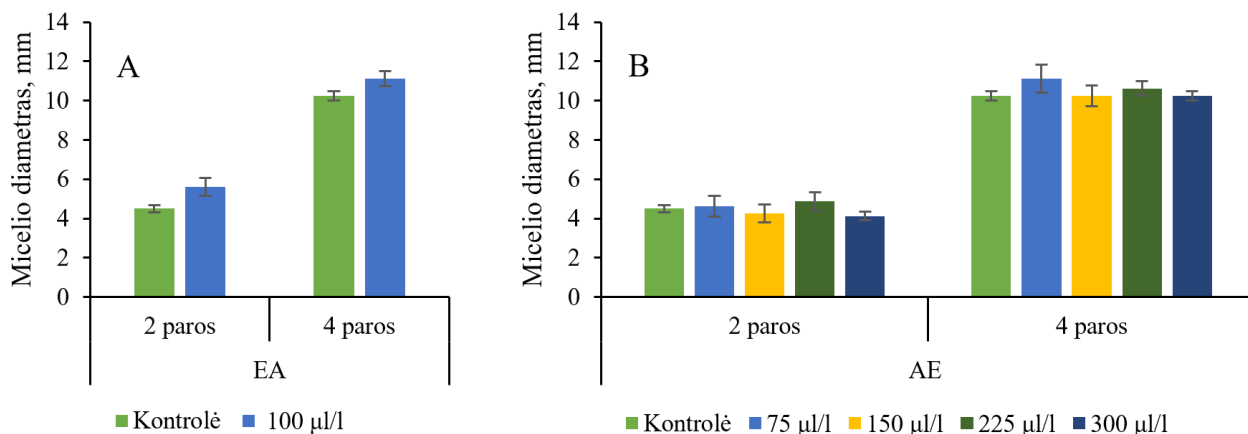
Efektyvumo tyrimo metu naudota *Alternaria botrytis* (ALT3) buvo išskirta nuo *NERAC* morkos šakniavaisio. Gauti rezultatai pateikti 3.15 paveiksle. Pagal šiuos duomenis galima matyti, kad tirtu mikroskopinio grybo augimas buvo skatinamas abejais atvejais: veikiant eteriniu aliejumi arba augaliniu ekstraktu. Veikiant 100 μ l/l koncentracijos EA augimo skatinimas po 2, 4 ir 7 parų atitinkamai siekė 21,43 %, 15,06 % ir 14,40 % (žr. 3.15 pav. A.2). Šiuo atveju yra matoma, kad laikui bėgant šis poveikis silpnėja. Morkeliūnė ir kt. nustatė, kad eteriniai aliejai gali paskatinti micelio augimą. Nustatytė, kad 400 μ l/l koncentracijos vaistinio šalavijo EA skatino *Colletotrichum acutatum* micelio augimą po 4 ir 7 parų augimo. Naudojant didesnės koncentracijos eterinį aliejų (1000 μ l/l) yra pradedamas matyti statistiškai reikšmingas micelio augimo slopinimas [43]. Mikroskopiniam

grybui augant mitybinėje terpėje, kurioje yra augalinio ekstrakto (žr. 3.15 pav. B.1 ir B.2 grafikai), matomas panašus augimo skatinimas tarp skirtingų AE koncentracijų. Šis poveikis vidutiniškai siekia ~31,20 % tarp skirtingų ekstraktų koncentracijų bei nežymiai mažėja po 2, 4 ir 7 parų.



3.15 pav. Vaistinio čiobrelio eterinio aliejaus (A) ir gvazdikmedžio ekstrakto (B) poveikis prieš *Alternaria botrytis* išskirtą nuo morkos šakniavaisio

Atlikus reinokuliacijos tyrimą, buvo gauti rezultatai, kurie pateikti 3.16 paveiksle. Juose galima matyti, kad pašalinus eterinio aliejaus poveikį mikroskopinis grybas vėl vystosi ir auga. Taip pat matomas ir nežymus micelio augimo padidėjimas pašalinus iš mitybinės terpės eterinį aliejų (žr. 3.16 pav. A). Pašalinus augalinio ekstrakto poveikį ALT3 gali augti (žr. 3.16 pav. B). Jos micelio augimas po skirtingų koncentracijų ekstrakto pašalinimo yra artimas kontrolei.

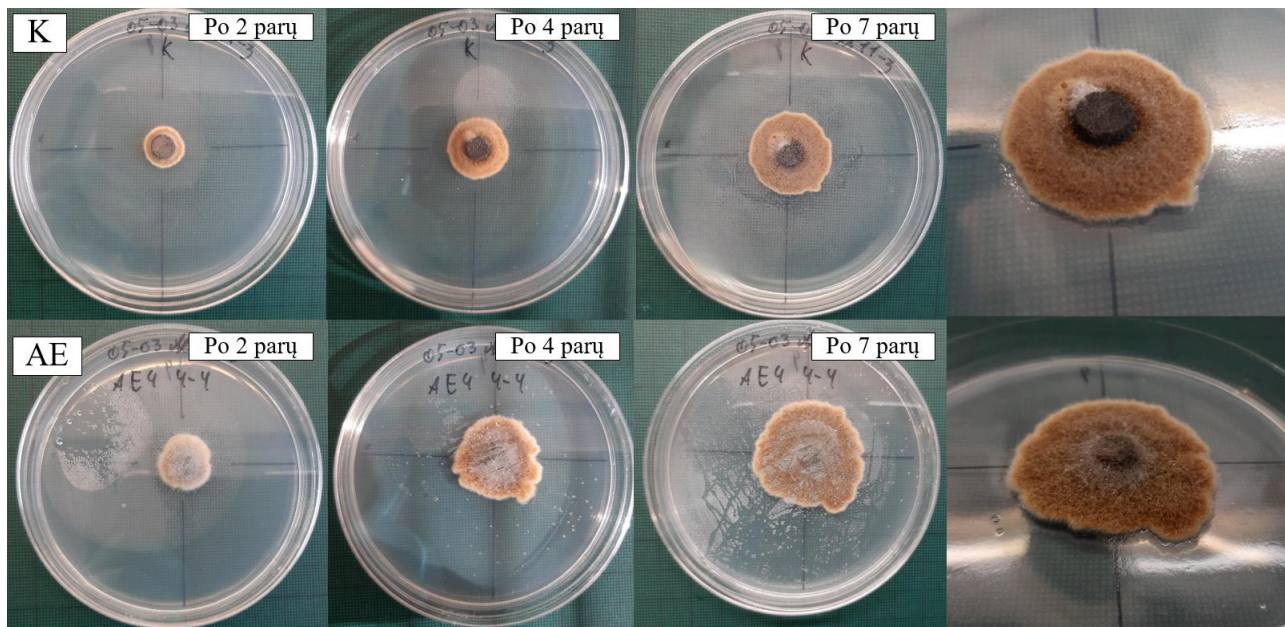


3.16 pav. *Alternaria botrytis*, išskirtos nuo morkos šakniavaisio, reinokuliacijos tyrimo rezultatai po vaistinio čiobrelė eterinio aliejaus (A) ir gvazdikmedžio ekstrakto (B) poveikio pašalinimo

3.2.3.1. *Alternaria botrytis*, išskirtos nuo morkos šakniavaisio, morfologija

Alternaria botrytis (ALT3) kontrolinėse lėkštelėse formuoja žemą, tankų micelį su nelygiais kraštais (žr. 3.17 pav. K). Vyraujanti spalva yra tamsiai ruda, o patys grybienos kraštai – balti arba gelsvi. Grybienos apačioje matomi skirtingo atspalvio žiedai: vidinėje dalyje tamsiai pilka, toliau ruda ir oranžinė, o kraštai balti ir gelsvi.

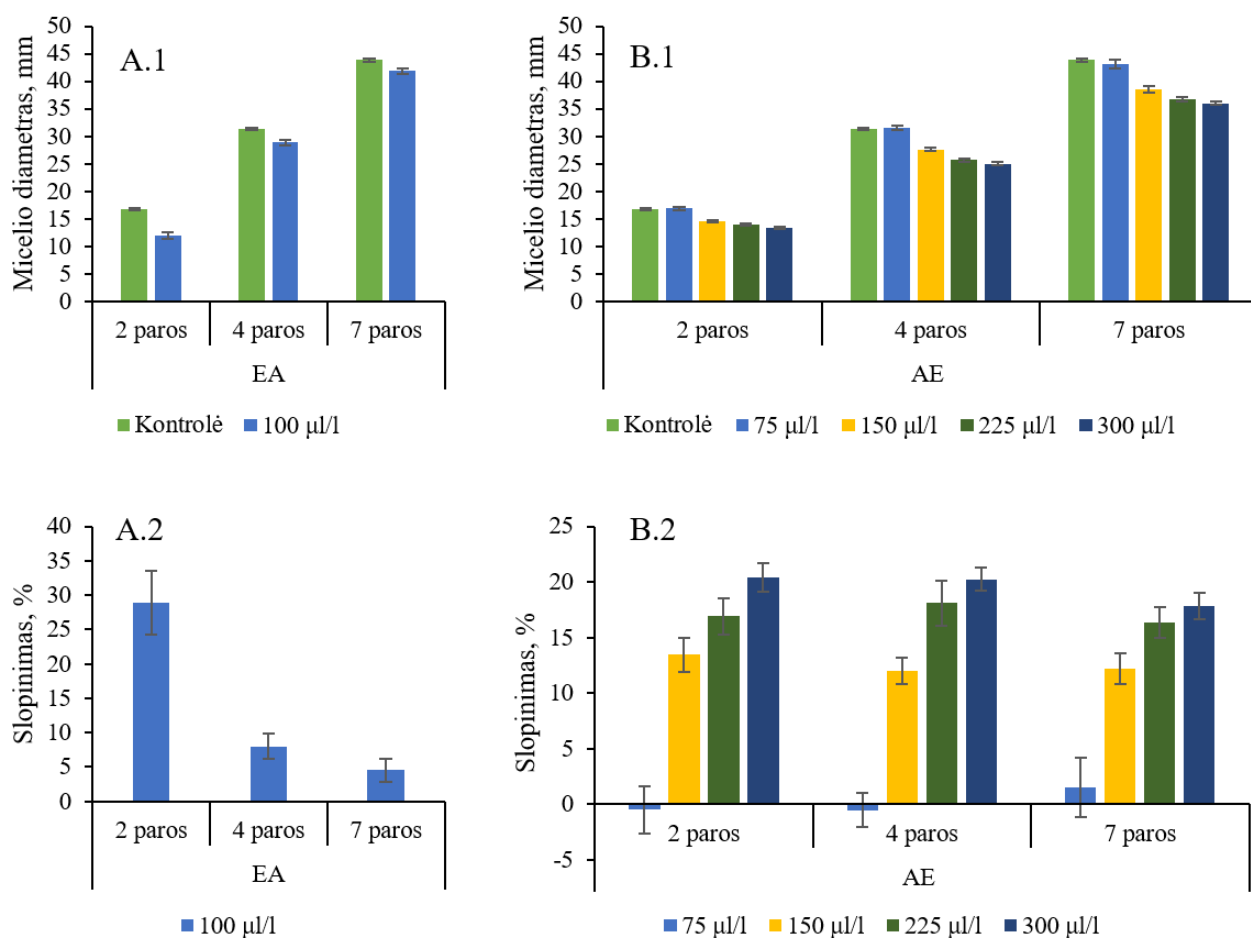
Eterinio aliejaus ir ekstrakto turinčiose mitybinėse terpėse mikroskopinio grybo morfologijos buvo panašios (žr. 3.17 pav. AE). Grybiena žema, kraštai nelygūs ir šviesios baltos arba gelsvos spalvos, centrinėje dalyje vyrauja tamsiai ruda micelio spalva. Grybienos apačia turi plačių žiedų, kurių spalvos: tamsiai pilka, šviesiai pilka.



3.17 pav. Morfologiniai ALT3 požymiai: kontrolė (K) ir gvazdikmedžio augalinis ekstraktas (AE)

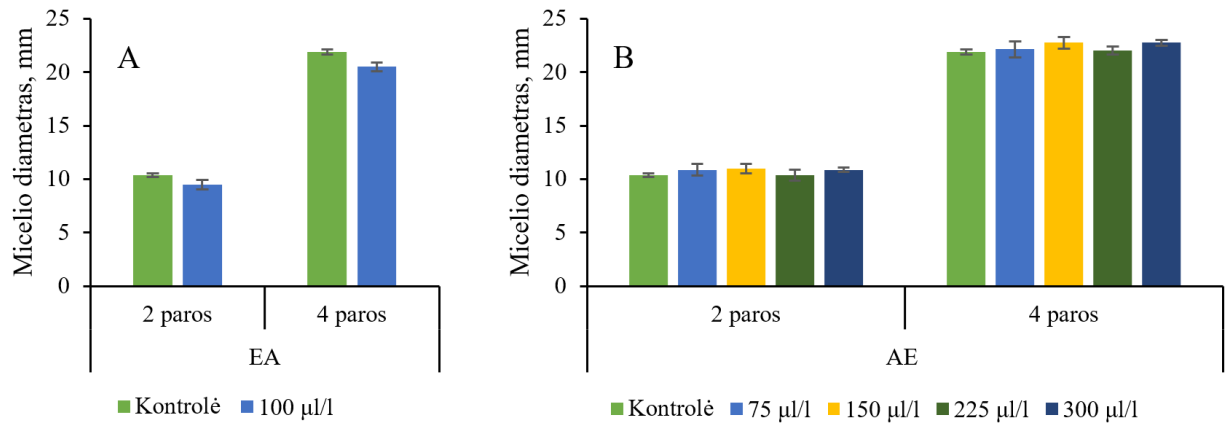
3.2.4. *Alternaria consortialis* išskirta nuo smulkiažiedės galinsogos

Alternaria consortialis (ALT4) buvo išskirta nuo smulkiažiedės galinsogos. Jos micelio augimas, veikiant vaistinio čiobrelio eteriniu aliejumi ir gvazdikmedžio ekstraktu pateiktas 3.18 paveiksle. Remiantis gautais duomenimis yra matoma, kad abi biologiškai aktyvios medžiagos pasižymėjo slopinamuoju poveikiu prieš tirtą *Alternaria* rūšį. 100 µl/l eterinio aliejaus slopinamasis poveikis po 2, 4 ir 7 parų atitinkamai siekė 28,86 %, 7,98 % ir 4,57 % (žr. 3.18 pav. A.2). Matoma, kad laikui bėgant šis poveikis silpnėja. Vertinant gvazdikmedžio ekstrakto efektyvumą (žr. 3.18 pav. B) yra matoma, kad 75 µl/l koncentracijos ekstraktas neturėjo ryškaus slopinamojo poveikio. Ryškesnis slopinimas pastebimas naudojant didesnės koncentracijos ekstraktą: po 7 parų micelio slopinimas, naudojant 300 µl/l koncentracijos ekstraktą, siekia 17,86 %.



3.18 pav. Vaistinio čiobrelio eterinio aliejaus (A) ir gvazdikmedžio ekstrakto (B) poveikis prieš *Alternaria consortialis* išskirtą nuo smulkiažiedės galinsogos

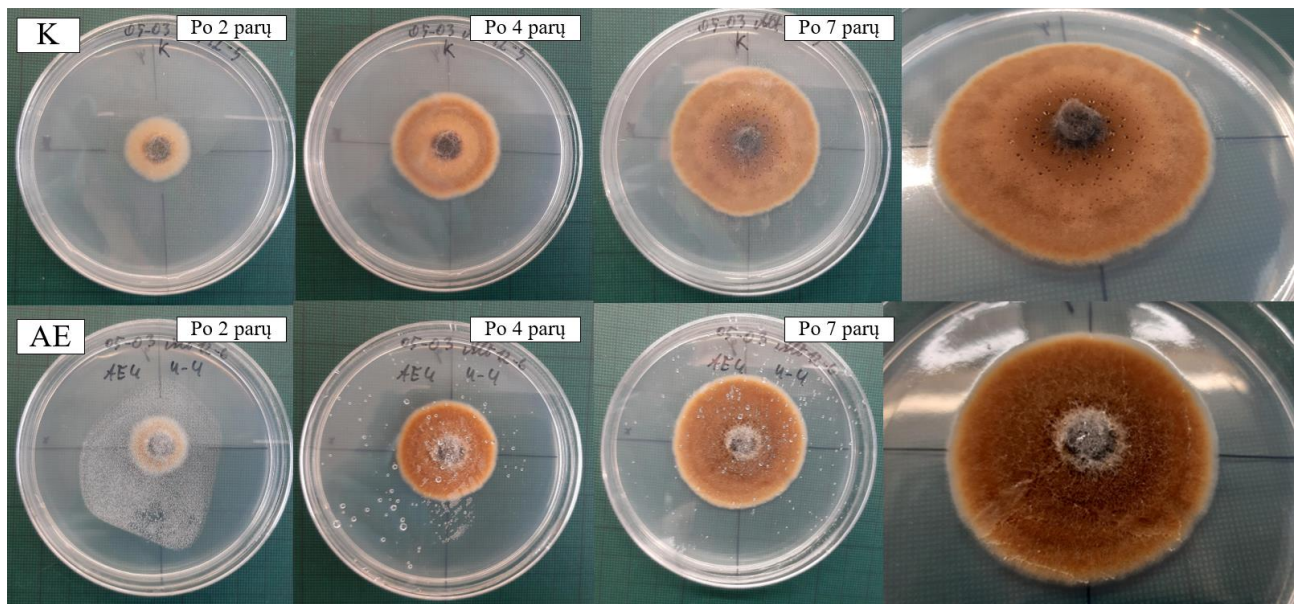
Po efektyvumo tyrimo, taip pat buvo atliktas reinokuliacijos tyrimas. Gauti rezultatai pateikti 3.19 paveiksle. Pagal šiuos duomenis yra matoma, kad 100 µl/l koncentracijos vaistinio čiobrelio eterinis aliejus nežymiai slopino micelio augimą, lyginant su kontrole. Vertinant gvazdikmedžio ekstrakto skirtingas koncentracijas galima teigti, kad šis ekstraktas neturėjo poveikio micelio augimui po jo pašalinimo iš grybo augimo aplinkos.



3.19 pav. *Alternaria consortialis*, išskirtos nuo smulkiažiedės galinsogos, reinokuliacijos tyrimo rezultatai po vaistinio čiobrelė eterinio aliejaus (A) ir gvazdikmedžio ekstrakto (B) poveikio pašalinimo

3.2.4.1. *Alternaria consortialis*, išskirtos nuo smilkiažiedės galinsogos, morfologija

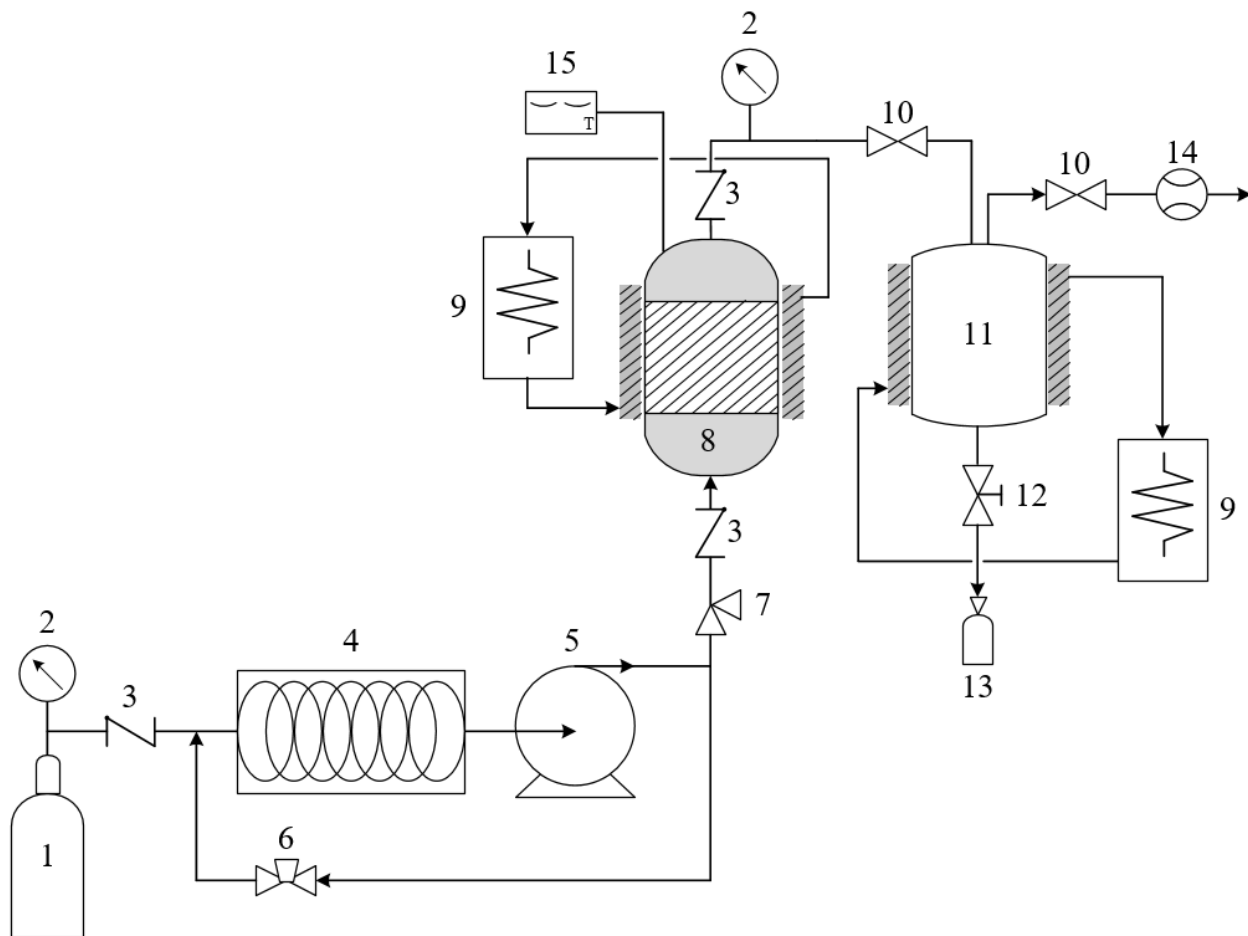
Alternaria consortialis (ALT4), auginta be jokio biologiškai aktyviųjų medžiagų poveikio, po 7 parų turi šiuos morfologinius požymius: tanki, žema, rudos spalvos grybiena, balti arba gelsvi ir lygūs kraštai, centrinė dalis tamsesnė (žr. 3.20 pav. K). Pusė grybienos apačios nuo centro yra ruda, kita pusė, link kraštų, yra šviesiai ruda. Variantuose, kuriuose buvo gvazdikmedžio ekstrakto, matomi nedideli mikroskopinio grybo pakitimai (žr. 3.20 pav. AE). Šiuo atveju formuojama grybiena yra tamsesnė ir vyrauja tamsiai ruda spalva. Kai mitybinėje terpėje buvo eterinio aliejaus matoma ta pati tendencija, tačiau šiuo atveju formuojama grybiena yra žemesnė.



3.20 pav. Morfologiniai ALT4 požymiai: kontrolė (K) ir gvazdikmedžio augalinis ekstraktas (AE)

4. Rekomendacijų dalis

Dėl mikroskopinių grybų sukeltų augalų ligų kasmet yra netenkama didelė dalis derliaus. Siekiant tai suvaldyti dažnai naudojami cheminiai pesticidai, tačiau vis stengiamasi pereiti prie aplinkai ir sveikatai draugiškesnių priemonių. Vis labiau populiarėjanti sritis yra biologiškai aktyviųjų medžiagų naudojimas daržo patogenų biokontrolėi. Šioje srityje iš augalinės žaliavos išgaunami eteriniai aliejai ir ekstraktai bei pritaikomi kovoje prieš patogenus. Šio tyrimo metu vaistinio čiobrelės eterinis aliejus buvo išgautas taikant hidrodistiliaciją bei *Clevenger* tipo aparatūrą. Gvazdikmedžio ekstraktas buvo gautas taikant subkritinę skysčių ekstrakciją. Šio proceso aparatūrinė schema pateikta 4.1 paveiksle, įranga išvardyta 4.1 lentelėje.



4.1 pav. Aparatūrinė subkritinės ekstrakcijos schema

Pradedant vykdyti subkritinę ekstrakciją tiriamoji medžiaga dedama į ekstraktorių (8). Ekstraktorius uždaromas ir pradedama ekstrakcija. Dujų būsenos CO₂ saugomas rezervuare (1) ir iš jo tiekiamas į aušintuvą (4), kuriame atšaldomas, kad būtų užtikrinta skysta fazė. Siurblys (5) tiekia skystos būsenos CO₂ į ekstraktorių, kuriame palaikoma 10 °C temperatūra ir 42 bar slėgis. Temperatūra matuojama elektriniu termometru, o sistemos slėgiui palaikyti naudojamas atgalinio slėgio reguliatoriumi (6). Tirpiklis kartu su ekstraktu iš ekstraktoriaus patenka į separatorių (11), kuriame atskiriamos skirtingos fazės. Netirpios medžiagos nusėda separatoriaus apačioje, dujos atmosferiniame slėgyje išsugaruoja, o ekstraktas per adatinę vožtuvą (12) surenkamas į surinkimo indą (13). Iš separatoriaus išeinantis dujų srautas matuojamas srauto matuokliu (14). Aparatūroje naudojami dozavimo vožtuvai (10) užtikrina srauto greičio tikslumą ir stabilumą. Kiti sistemoje svarbūs elementai yra šilumokaičiai (9), atbulinis vožtuvas (3), manometras (2), apsauginis vožtuvas (7). Norima sistemos dalių temperatūra

palaikoma šilumokaičiais. Atbulinis vožtuvas užtikrina srauto tekėjimą viena kryptimi. Slėgis matuojamas manometru. Apsauginis vožtuvas atsidaro kai sistemoje yra viršijamas nustatytas slėgis ir vėl užsidaro jam grįžus į nustatytas ribas [44, 45].

4.1 lentelė. Subkritinės ekstrakcijos aparatūros žymėjimas

Žymėjimas	Pavadinimas
1	CO ₂ rezervuaras
2	Manometras
3	Atbulinis vožtuvas
4	Aušintuvas
5	Aukšto slėgio siurblys
6	Atgalinio slėgio reguliatorius
7	Apsauginis vožtuvas
8	Ekstraktorius
9	Šilumokaitis
10	Dozavimo vožtuvas
11	Separatorius
12	Adatinis vožtuvas
13	Mėginio surinkimo indas
14	Srauto matuoklis
15	Skaitmeninis termometras

Šio darbo metu vykdyti tyrimai gali būti tęsiami ir plečiami. Tyrimai leistų efektyviau rasti tinkamas medžiagas patogenų biokontrolėi bei geriau suprasti galimą jiems poveikį. Vykdamas tolimesnius tyrimus rekomenduojama:

- ištirti vaistinio čiobrelio eterinio aliejaus ir gvazdikmedžio ekstrakto poveikį prieš kitas aptiktas mikroskopinių grybų rūšis;
- išbandyti kitų augalų eterinių aliejų arba ekstraktų poveikį prieš tirtas *Alternaria* rūšis;
- atliekant efektyvumo tyrimus ištirti skirtingų augalų ekstraktų arba eterinių aliejų mišinių poveikį prieš skirtingus mikroskopinius grybus;
- tyrimų metu panaudoti didesnes eterinio aliejaus arba ekstrakto koncentracijas;
- išbandyti eterinių aliejų ir ekstraktų mišinių poveikį prieš tirtas *Alternaria* rūšis.

Išvados

1. Įvertinus vyraujančius mikroorganizmus piktžolėse buvo nustatyta, kad jose vyrauja bakterijos, mieliagrybių ir skirtingų genčių mikroskopiniai grybai: *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Aspergillus*. Didžiausia mikroskopinių grybų įvairovė pastebėta smulkiažiedės galinsogos lapuose ir stiebuose. Mažiausia mikroskopinių grybų įvairovė buvo aptikta bekvapiame šunramunyje bei dirvinio asiūklio stiebuose ir smulkiažiedės galinsogos žiedynuose.
2. Įvertinus vyraujančius mikroorganizmus morkų šakniavaisiuose buvo nustatyta, kad juose vyrauja bakterijos, mieliagrybiai ir skirtingų genčių mikroskopiniai grybai: *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Phytium*, *Botrytis*. Visuose bandiniuose buvo aptikta didelė įvairovė mikroskopinių grybų.
3. Ištyrus vaistinio čiobrelio eterinio aliejaus poveikį skirtingiems *Alternaria* izoliatams buvo nustatyta, kad 100 µl/l koncentracijos eterinis aliejus pasižymi slopinamuoju poveikiu prieš ALT1, ALT2, ALT4. Tačiau ALT3 izoliato augimas buvo skatinamas. Gvazdikmedžio ekstrakto slopinamasis poveikis buvo matomas prieš ALT1 ir ALT4 izoliatų. Tačiau ALT2 ir ALT3 izoliatų augimas buvo skatinamas. Prieš visus tirtus *Alternaria* izoliatų buvo matoma, kad augalinio ekstrakto ir eterinio aliejaus poveikis buvo trumpalaikis, t. y. jis nesunaikina tirtų mikroskopinių grybų. Pagal gautus duomenis galima teigti, kad vaistinio čiobrelio eterinis aliejus yra efektyvesnis prieš tirtus *Alternaria* izoliatų.

Literatūros sąrašas

1. LAKTRA, N., A. MARWAL, N. SUDHEEP, K. ANWAR and K. ANWAR. Crop Genetic Engineering: An Approach to Improve Fungal Resistance in Plant System. *Plant-Microbe Interact. Agro-Ecological Perspect* [interaktyvus]. 2017, 581-591 [žiūrėta 2023-02-12]. Prieiga per doi: 10.1007/978-981-10-6593-4_23.
2. Kumar, J., A. RAMLAL, D. MALLICK and V. MISHRA. An overview of some biopesticides and their importance in plant protection for commercial acceptance. *Plants* [interaktyvus]. 2021, **10** (6), 1-15 [žiūrėta 2023-02-12]. Prieiga per doi: 10.3390/plants10061185.
3. PAL, K. K. and B. M. GARDENER. Biological control of plant root pathogens. *Plant Heal. Instr.* [interaktyvus]. 2006, **7**(3), 1-25 [žiūrėta 2023-02-12]. Prieiga per doi: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.
4. ABDULKHAIR, W. M. and M. A. ALGHUTHAYMI. Plant Pathogens. *Plant Growth* [interaktyvus]. 2016, 49-59 [žiūrėta 2023-02-12]. Prieiga per doi: 10.5772/65325.
5. RAJWADE, J. M., R. G. CHIKTE and K. M. PAKNIKAR. Nanomaterials: new weapons in a crusade against phytopathogens. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* [interaktyvus]. 2020, **104**(4), 1437-1461 [žiūrėta 2023-02-16]. Prieiga per doi: 10.1007/s00253-019-10334-y.
6. PELCZAR, R. M., M. J. PELCZAR, A. KELMAN and M. C. SHURTLEFF. Plant disease. *Encyclopedia Britannica* [interaktyvus]. 2022 [žiūrėta 2023-02-16]. Prieiga per: <https://www.britannica.com/science/plant-disease/General-characteristics>.
7. MONDAL, A and D. PAL. Role of Abiotic Factors in Plant Disease. *Int. J. Res. Stud. Biosci* [interaktyvus]. 2015, 102-106 [žiūrėta 2023-02-16]. ISSN 2349-0365. Prieiga per: <https://www.arcjournals.org/pdfs/ijrsb/special-issues/irsmt-2015/18.pdf>.
8. FLORENTINA, I. G and B. ION. The Effects of Air Pollutants on Vegetation and the Role of Vegetation in Reducing Atmospheric Pollution. *Impact Air Pollut. Heal. Econ. Environ. Agric. Sources* [interaktyvus]. 2011, 242-280 [žiūrėta 2023-02-16]. Prieiga per doi: 10.5772/17660.
9. DABKEVIČIUS Z., A. VASILIAUSKAS and A. ŽIOGAS. *Miško fitopatologija*. Kaunas: Lututė, 2006 [žiūrėta 2023-02-16]. Prieiga per: <https://gamtosknyga.lt/wp-content/uploads/2017/10/Misko-fitopatologija.pdf?x13947>.
10. ENYIUKWU, D., C. ONONUJU and J. MARANZU. Plant Pathogenic Fungi - Novel Agents of Human Diseases: Implications for public Health. *Greener J. Epidemiol. Public Heal.* [interaktyvus]. 2018, **6**(1), 1-19 [žiūrėta 2023-02-06]. Prieiga per doi: 10.15580/gjeph.2017.8.072817097.
11. WAHID, A. and M. A. KHAN. Economic importance of Viruses, bacteria and thalloid organisms. *Viruses Bacteria and Thalloid Organisms* [interaktyvus]. 2020, 139-144 [žiūrėta 2023-02-24]. ISBN: 969=417-085-0.
12. ZEILINGER, S. et al. Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions with plants. *FEMS Microbiol. Rev.* [interaktyvus]. 2015, 1-26 [žiūrėta 2023-02-24]. Prieiga per doi: 10.1093/femsre/fuv045.
13. MENG, S., T. TORTO-ALALIBO, M. C. CHIBUCOS, B. M. TYLER and R. A. DEAN. Common processes in pathogenesis by fungal and oomycete plant pathogens, described with Gene Ontology terms. *BMC Microbiol* [interaktyvus]. 2014, **9**(1), 1-11 [žiūrėta 2023-02-24]. Prieiga per doi: 10.1186/1471-2180-9-S1-S7.
14. WOUDEBERG, J. H. C. et al. *Alternaria* section *Alternaria*: Species, formae speciales or

- pathotypes?. *Stud. Mycol.* [interaktyvus]. 2015, vol. **82**, 1-21 [žiūrėta 2023-02-24]. Prieiga per doi: 10.1016/j.simyco.2015.07.001.
15. RIVERA, K. G. and K. A. SEIFERTKEITH. A taxonomic and phylogenetic revision of the *Penicillium sclerotiorum* complex. *Stud. Mycol.* [interaktyvus]. 2011, vol. **70**, 139-158 [žiūrėta 2023-03-02]. Prieiga per doi: 10.3114/sim.2011.70.03.
 16. BULLERMAN, L. B. Fungi in Food. 2003, 5511-5522 [žiūrėta 2023-03-02]. Prieiga per doi: 10.1016/B0-12-227055-X/01129-9.
 17. ASKUN, T. Introductory Chapter: *Fusarium* - Pathogenicity, Infections, Diseases, Mycotoxins and Management. *Fusarium - Plant Dis. Pathog. Divers. Genet. Divers. Resist. Mol. Markers.* [interaktyvus]. 2018, 1-12 [žiūrėta 2023-03-02]. Prieiga per doi: 10.5772/intechopen.76507.
 18. CHEHRI, K., B. SALLEH, T. YLI-MATTILA, K. R. N. REDDY and S. ABBASI. Molecular characterization of pathogenic *Fusarium* species in cucurbit plants from Kermanshah province, Iran. *Saudi J. Biol. Sci* [interaktyvus]. 2011, **18**(1), 341-351 [žiūrėta 2023-03-02]. Prieiga per doi: 10.1016/j.sjbs.2011.01.007.
 19. KHALIL, A. M. A. and A. H. HASHEM. Morphological changes of conidiogenesis in two *Aspergillus* species. *J. Pure Appl. Microbiol.* [interaktyvus]. 2018, **12**(4), 2041-2048 [žiūrėta 2023-03-02]. Prieiga per doi: 10.22207/JPAM.12.4.40.
 20. GU, X., R. WANG, Q. SUN, B. WU, and J. Z. SUN. Four new species of *Trichoderma* in the *Harzianum* clade from northern China. *MycKeys* [interaktyvus]. 2020, vol. **73**, 109-132 [žiūrėta 2023-03-02]. Prieiga per doi: 10.3897/MYCOKEYS.73.51424.
 21. EL-BAKY, N. A. and A. A. F. AMARA. Recent approaches towards control of fungal diseases in plants: An updated review. *J. Fungi* [interaktyvus]. 2021, **7**(11) 1-17 [žiūrėta 2023-03-02]. Prieiga per doi: 10.3390/jof7110900.
 22. NAZZARO, F., F. FRATIANNI, R. COPPOLA and V. DE FEO. Essential oils and antifungal activity. *Pharmaceuticals* [interaktyvus]. 2017, **10**(4), 1-20 [žiūrėta 2023-03-15]. Prieiga per doi: 10.3390/ph10040086.
 23. SATYAL, P., B. L. MURRAY, R. L. MCFEETERS and W. N. SETZER. Essential oil characterization of *thymus vulgaris* from various geographical locations. *Foods* [interaktyvus]. 2016, **5**(4), 1-12 [žiūrėta 2023-03-15]. Prieiga per doi: 10.3390/foods5040070.
 24. MAURYA, A., J. PRASAD, S. DAS and A. K. DWIVEDY. Essential Oils and Their Application in Food Safety. *Front. Sustain. Food Syst.* [interaktyvus]. 2021, 1-25 [žiūrėta 2023-03-15]. Prieiga per doi: 10.3389/fsufs.2021.653420.
 25. KUMAR, A. and V. B. KUDACHIKAR. Antifungal properties of essential oils against anthracnose disease: a critical appraisal. *J. Plant Dis. Prot.* [interaktyvus]. 2017, 133-144 [žiūrėta 2023-03-16]. Prieiga per doi: 10.1007/s41348-017-0128-2.
 26. DEKEBO, A. Introductory Chapter: Plant Extracts. *Plant Extr.* [interaktyvus]. 2019, 1-10 [žiūrėta 2023-03-16]. Prieiga per doi: 10.5772/intechopen.85493.
 27. HERRERO, M., A. CIFUENTES and E. IBAÑEZ. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae - A review. *Food Chem.* [interaktyvus]. 2006, **98**(1), 136-148 [žiūrėta 2023-03-17]. Prieiga per doi: 10.1016/j.foodchem.2005.05.058.
 28. DUHAN, N., J. K. SAHU and S. N. NAIK. Sub-critical CO₂ extraction of volatile flavour compounds from ghee and optimization of process parameters using response surface methodology. *Lwt.* [interaktyvus]. 2020, vol. **118**, 1-8 [žiūrėta 2023-03-17]. Prieiga per doi:

- 10.1016/j.lwt.2019.108731.
29. ALVAREZ-RIVERA, G., M. BUENO, D. BALLESTEROS-VIVAS, J. A. MENDIOLA and E. IBÁÑEZ. Pressurized liquid extraction. *Liq. Extr.* [interaktyvus]. 2020, 375–398 [žiūrėta 2023-03-24]. Prieiga per doi: 10.1016/B978-0-12-816911-7.00013-X.
 30. LLOMPART, M., M. CELEIRO and T. DAGNAC. Microwave-assisted extraction of pharmaceuticals, personal care products and industrial contaminants in the environment. *TrAC - Trends Anal. Chem.* [interaktyvus]. 2019, vol. **116**, 136-150 [žiūrėta 2023-03-24]. Prieiga per doi: 10.1016/j.trac.2019.04.029.
 31. KAUFMANN, B. and P. CHRISTEN. Recent extraction techniques for natural products: Microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochem. Anal.* [interaktyvus]. 2002, **13**(2), 105-113 [žiūrėta 2023-03-24]. Prieiga per doi: 10.1002/pca.631.
 32. ARAMRUEANG, N., S. ASAVASANTI and A. KHANUNTHONG. Leafy Vegetables. *Integrated Processing Technologies for Food and Agricultural By-Products* [interaktyvus]. 2019, 245-272 [žiūrėta 2023-03-24]. Prieiga per doi: 10.1016/B978-0-12-814138-0.00010-1.
 33. AZMIN, S. N. H. M., Z. A. MANAN, S. R. W. ALWI, L. S. CHUA, A. A. MUSTAFFA and N. A. YUNUS. Herbal processing and extraction technologies. *Sep. Purif. Rev.* [interaktyvus]. 2016, 45(4), 305-320 [žiūrėta 2023-04-05]. Prieiga per doi: 10.1080/15422119.2016.1145395.
 34. BOŽOVIĆ, M., A. NAVARRA, S. GARZOLI, F. PEPI and R. RAGNO. Essential oils extraction: a 24-hour steam distillation systematic methodology. *Nat. Prod. Res* [interaktyvus]. 2017, 1-10 [žiūrėta 2023-04-05]. Prieiga per doi: 10.1080/14786419.2017.1309534.
 35. KUMAR, V. S., M. SHAH, S. PARMAR, A. KUMAR. *Fungi Bio-Prospect in Sustainable Agriculture, Environment and Nano-technology*. 2nd ed. 2021. ISBN 9780128213957.
 36. MATHUR, S. B. and O. KONGSDAL. *Common Laboratory Seed Health Testing Methods for Detecting Fungi*. International Seed Testing Association. 2003.
 37. LUGAUSKAS, A., A. PAŠKEVIČIUS, J. REPEČKIENĖ. *Patogeniški ir toksiški mikroorganizmai žmogaus aplinkoje*. Vilnius, 2002. ISBN 9986820286.
 38. HUSSIN, M.S. Survey of the Fungi that Infect Imported Carrot (*Daucus Carota* L.) in the Areas of Baghdad. *Al-Mustansiriyah Journal of Science* [interaktyvus]. 2018, **29**(4), 38-42 [žiūrėta 2023-04-05]. Prieiga per doi: 10.23851/mjs.v29i4.428.
 39. RANA, I. S., A. S. RANA and R. C. RAJAK. Evaluation of antifungal activity in essential oil of the *Syzygium aromaticum* (L.) by extraction, purification and analysis of its main component eugenol. *Brazilian J. Microbiol.* [interaktyvus]. 2011, **42**(4), 1269-1277 [žiūrėta 2023-04-05]. Prieiga per doi: 10.1590/S1517-83822011000400004.
 40. ŠEGVIĆ KLARIĆ, M., I. KOSALEC, J. MASTELIĆ, E. PIECKOVÁ and S. PEPELJNAK. Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. *Lett. Appl. Microbiol.* [interaktyvus]. 2007, **44**(1), 36-42 [žiūrėta 2023-04-20]. Prieiga per doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.02032.x.
 41. ASLAM, M. F., G. IRSHAD, F. NAZ and M. A. KHAN. Evaluation of the antifungal activity of essential oils against *Alternaria alternata* causing fruit rot of *Eriobotrya japonica*. *Turkish J. Biochem.* [interaktyvus]. 2022, **47**(4), 511-521 [žiūrėta 2023-04-20]. Prieiga per doi: 10.1515/tjb-2021-0225.
 42. NAGRALE, D. T., A. P. GAIKWAD and L. SHARMA. Morphological and cultural characterization of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler. *J. Appl. Nat. Sci.* [interaktyvus]. 2013, **5**(1), 171-178 [žiūrėta 2023-04-20]. ISSN 0974-9411.

43. MORKELIŪNIENĖ, A., N. RASIUKEVIČIŪTĖ, L. ŠERNAITĖ and A. VALIUŠKAITĖ. The Use of Essential Oils from Thyme, Sage and Peppermint against *Colletotrichum acutatum*. *Plants* [interaktyvus]. 2021, **10**(1), 1-14 [žiūrėta 2023-05-02]. Prieiga per doi: 10.3390/plants10010114.
44. PANGESTUTI, R., E. A. SIAHAAN, S. K. KIM. Photoprotective substances derived from marine algae. *Mar. Drugs* [interaktyvus]. 2018, **16**(11), 1-16 [žiūrėta 2023-05-02]. Prieiga per doi: 10.3390/md16110399.
45. LIZCANO, S. C., J. A. DÁVILA and V. HERNÁNDEZ. *Fruit Agroindustrial Wastes for Preparing Beverages for Medicinal Purposes by Supercritical Fluid Extraction Technology: Andes Berry (Rubus glaucus benth) Case*. Elsevier Inc., 2019. Prieiga per doi: 10.1016/B978-0-12-815260-7.00005-5.

Publikacijų sąrašas

BUNEVIČIUS, V., S. CHRAPAČIENĖ, A. BALČIŪNAITIENĖ, N. RASIUKEVIČIŪTĖ. Augalų ligas sukeliančių *Alternaria* spp. patogeninių grybų biokontrolės galimybės. 11-osios jaunųjų mokslininkų konferencijos „Jaunieji mokslininkai – žemės ūkio pažangai“ pranešimų tezės. Vilnius: Lietuvos mokslų akademija, 2022, p. 21. ISBN: 9789986080909.