

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE
MIKROBIOLOĢIJAS UN BIOTEHNOLOĢIJAS KATEDRA

LIELĀS PERGAMENTSĒNES *PHLEBIOPSIS GIGANTEA*
(FR.) JŪL. IZOLĀTU ATTĪSTĪBA PARASTĀS EGLES
PICEA ABIES (L.) KOKSNĒ

Maģistra darbs

Autors: Arta Bēča

Stud. apl. Nr. ab17175

Darba vadītāji: Dr. silv. Tālis Gaitnieks

Dr. biol., asoc. prof. Vizma Nikolajeva

RĪGA 2022

KOPSAVILKUMS

Skujkoku mežos Eiropas savienībā, tai skaitā Latvijā, būtiskus zaudējumus izraisa sakņu piepes *Heterobasidion* spp. izraisošā sakņu un stumbra trupe. Šīs sēnes antagonists lielā pergamentsēne (*Phlebiopsis gigantea* (Fr.) Jülich.) tiek izmantota svaigu celmu apstrādei, lai ierobežotu sakņu piepes infekciju un tās izplatību. Tiek izmantotas dažādas lielās pergamentsēnes oīdiju suspensijas, taču ilgtermiņā izmantojot preparātus, kuru sastāvā ir viens sēnes izolāts, var tikt ietekmēta celmu kolonizējošo sēņu daudzveidība. Pierādīts, ka vietējās izcelsmes *P. gigantea* izolāti ir efektīvāki *Heterobasidion* spp. infekcijas ierobežošanā kā Somijā izstrādātais bioloģiskais preparāts *Rotstop*.

Pētījuma mērķis ir noskaidrot *Phlebiopsis gigantea* atsevišķu izolātu un dažādu izolātu suspensiju maisījumu efektivitāti pret *Heterobasidion* spp. infekciju, kā arī lielas pergamentsēnes micēlija attīstības dinamiku egles koksnē. Pētījumi veikti laboratorijas un lauka apstākļos. Izmantoti četri vietējās izcelsmes *P. gigantea* izolāti un izolātu maisījumi. Kontrolei izmantots Somijā ražots bioloģiskais preparāts *Rotstop*.

Secināts, ka Latvijas izcelsmes *P. gigantea* izolāts PG 182 uzrādījis labāko augšanas dinamiku un efektivitāti pret *Heterobasidion* spp. infekciju, salīdzinot gan ar bioloģisko preparātu *Rotstop*, gan izolātu maisījumiem. Lauka apstākļu eksperimentā dažādu *P. gigantea* izolātu maisījumu aizņemtie laukumi ir mazāki kā laboratorijas pētījumos, kā arī konstatēta būtiska korelācija starp *P. gigantea* aizņemto laukumu trīs cm dziļumā un efektivitāti pret *Heterobasidion* spp.

Atslēgas vārdi: *Phlebiopsis gigantea*, *Heterobasidion* spp., izolātu maisījumi, *Rotstop*, egle.

SUMMARY

Coniferous forests in European Union, including Latvia, suffer from significant losses caused by butt rot *Heterobasidion* spp. *Phlebiopsis gigantea* (Fr.) Jülich is used in freshly cut coniferous stumps to limit the infection and spread of butt rot. A variety of *P. gigantea* ooidia suspensions are used, but in long term, the use of preparations containing one fungal isolate may affect the diversity of stump-colonizing fungi. It has been demonstrated that local *P. gigantea* isolates are more effective in limiting *Heterobasidion* spp. infection, compared to Finnish-made biological treatment *Rotstop*.

The aim of this study is to analyze the efficacy of individual *P. gigantea* isolates, as well as mixtures of various isolates against *Heterobasidion* spp. infection, as well as the development of *P. gigantea* mycelium in spruce wood. A field and a laboratory experiment has been performed, where four isolates and isolate mixtures of local origin *P. gigantea* have been used, as well as biological control treatment *Rotstop*.

It has been concluded that Latvian origin *P. gigantea* isolate PG 182 showed the best growth dynamics and efficacy against *Heterobasidion* spp. compared to both – biological treatment *Rotstop* as well as *P. gigantea* isolate mixtures. Field experiment shows a significant correlation between the area occupied by *P. gigantea* isolates in three cm and the efficacy against *Heterobasidion* spp.

Keywords: *Phlebiopsis gigantea*, *Heterobasidion* spp., mixtures of isolates, *Rotstop*, spruce.

SATURS

SATURS.....	4
IEVADS	6
1. LITERATŪRAS APSKATS	7
1.1. Lielā pergamentsēne <i>Phlebiopsis gigantea</i>	7
1.1.1. <i>P. gigantea</i> sastopamība	7
1.1.2. <i>P. gigantea</i> augļķermeņi.....	8
1.1.3. <i>P. gigantea</i> mikroskopiskās pazīmes	9
1.1.4. <i>P. gigantea</i> pielietojums	10
1.2. Sakņu piepe <i>Heterobasidion</i> spp.	11
1.2.1. <i>Heterobasidion</i> spp. bioloģija	11
1.2.2. <i>Heterobasidion</i> spp. izplatība	12
1.2.3. <i>Heterobasidion</i> spp. primārā izplatība.....	13
1.2.4. <i>Heterobasidion</i> spp. sekundārā izplatība.....	15
1.3. Sakņu piepes <i>Heterobasidion</i> spp. ierobežošana	16
2. MATERIĀLI UN METODES.....	18
2.1. Materiālu iegūšana.....	18
2.2. Augšanas ātruma pārbaude	19
2.2.1. Koksnes paraugu sagatavošana laboratorijas eksperimentam klimata kamerās.....	19
2.2.2. Koksnes paraugu sagatavošana lauka eksperimentam	20
2.2.3. Eksperimentiem izvēlētie <i>Phlebiopsis gigantea</i> izolāti.....	21
2.2.4. Suspensiju sagatavošana.....	21
2.2.5. Sporu skaitīšana.....	23
2.2.6. Bluķīšu apstrāde eksperimentam klimata kamerās.....	24
2.2.7. Bluķīšu apstrāde eksperimentam lauka apstākļos	24
2.3. Augšanas ātruma analīze	26

2.3.1.	Ripu sagatavošana inkubācijai	26
2.3.2.	Ripu analīze laboratorijas eksperimentam.....	27
2.3.3.	Ripu analīze lauka eksperimentam	28
2.4.	<i>P. gigantea</i> reizolācija no ripām	29
2.4.1.	Izolātu iegūšana no koksnes paraugiem	29
2.4.2.	Paraugu salīdzināšana ar oriģināliem izolātiem	30
2.5.	Statistiskās analīzes.....	30
3.	REZULTĀTI	32
3.1.	<i>P. gigantea</i> attīstības dinamika klimata kamerā	32
3.1.1.	<i>P. gigantea</i> augšanas ātrums oīdiju suspensijām koksnē	32
3.1.2.	<i>P. gigantea</i> aizņemtais laukums	33
3.2.	<i>P. gigantea</i> suspensiju antagonisms pret <i>Heterobasidion</i> spp.....	35
3.2.1.	<i>P. gigantea</i> aizņemtais laukums	35
3.2.2.	<i>P. gigantea</i> efektivitāte.....	38
3.3.	Korelācija starp <i>P. gigantea</i> micēlija attīstību un antagonismu pret <i>Heterobasidion</i> spp. 40	
3.4.	<i>P. gigantea</i> izolātu genotipu noteikšana	41
4.	DISKUSIJA	42
4.1.	<i>P. gigantea</i> attīstības dinamika klimata kamerā	42
4.2.	<i>P. gigantea</i> suspensiju antagonisms pret <i>Heterobasidion</i> spp.....	43
4.3.	<i>P. gigantea</i> izolātu genotipu noteikšana	45
	SECINĀJUMI	47
	PATEICĪBAS	48
	LITERATŪRAS SARAKSTS	49

IEVADS

Sakņu un stumbra trupi izraisošā sakņu piepe *Heterobasidion* spp. ir plaši sastopams patogēns, kas nonākot saskarsmē ar svaigi zāģētiem celmiem, kā arī inficējot sakņu sistēmas (Hodges, 1969), Eiropas Savienībā izraisa zaudējumus līdz pat 500 – 800 miljonu eiro gadā (Webber & Thorpe, 2001; Korhonen & Holdenrieder, 2005). Latvijā parastās egles (*Picea abies* (L.) Karst.) audzēs zaudējumi mērāmi 800 – 4790 EUR/ha (Gaitnieks et al., 2007). Lai ierobežotu sakņu piepes izplatību, tiek izmantotas dažādas aizsardzības metodes, no kurām visplašāk izmantota ir celmu apstrāde ar Somijā ražotā bioloģiskā preparāta *Rotstop* suspensiju, kura sastāvā ir viena lielās pergamentsēnes (*Phlebiopsis gigantea* (Fr.) Jülich.) izolāta oīdijas (Gonthier & Thor, 2013).

Veicot pētījumus noskaidrots, ka *P. gigantea* bioloģisko preparātu efektivitāti būtiski nosaka sēnes augšanas ātrums koksnē, kā arī sporulācija, kas nodrošina pietiekamu dzīvotspējīgu sporu daudzumu (Korhonen, 2003). Šobrīd vislabākos attīstības un efektivitātes rādītājus var novērot vietējas izcelsmes *P. gigantea* izolātiem (Rönning et al., 2006), tāpēc Latvijā būtiski ir izmantot tieši vietējos *P. gigantea* izolātus sakņu piepes ierobežošanā. Ilgtermiņā izmantotas ģenētiski viendabīgas viena izolāta celmu apstrādes suspensijas var radīt kaitējumu videi, ietekmējot citas celmus kolonizējošās sēnes (Vainio et al., 2001). Šī iemesla dēļ celmu apstrādē varētu tik izmantotas Latvijas izcelsmes dažādu *P. gigantea* izolātu oīdiju suspensijas.

Pētījuma mērķis ir noskaidrot vietējas izcelsmes lielās pergamentsēnes *P. gigantea* izolātu attīstību parastās egles koksnē laboratorijas un lauka apstākļos, kā arī pārbaudīt atsevišķu izolātu un to suspensiju maisījumu efektivitāti pret sakņu piepi *Heterobasidion* spp.

Izvirzītie darba uzdevumi:

1. Salīdzināt atsevišķu lielās pergamentsēnes izolātu un to suspensiju maisījumu attīstību egles koksnē, novērtējot micēlija augšanas ātrumu un tā aizņemto laukumu;
2. Novērtēt *P. gigantea* atsevišķu izolātu un to suspensiju maisījumu efektivitāti pret *Heterobasidion* spp. bazīdijsporu infekciju lauka apstākļos;
3. Noskaidrot korelāciju starp *P. gigantea* micēlija attīstību un antagonismu pret *Heterobasidion* spp.;
4. Salīdzināt Latvijas izcelsmes *P. gigantea* izolātu un bioloģiskā preparāta *Rotstop* sastāvā esošā *P. gigantea* izolāta īpašības – micēlija attīstību koksnē un antagonismu pret *Heterobasidion* spp.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Lielā pergamentsēne *Phlebiopsis gigantea*

1.1.1. *P. gigantea* sastopamība

Lielā pergamentsēne *Phlebiopsis gigantea* (Fr.) Jülich ir koksni noārdoša bazīdijsēne, kas plaši sastopama boreālajos, kā arī mērenās joslas skujkoku mežos (Holdenrieder & Greig, 1998). *P. gigantea* kolonizē skujkoku celmus, lielu dimensiju mežistrādes atliekas, izgāztos kokus, un sēne ierosina balto trupi (1. attēls). Lielās pergamentsēnes sporas atrodamas ne tikai augsnē un sakņu rizosfērā, bet sporu klātesamība arī ir novērota gaisā (Rishbeth, 1959; Vasiliauskas, 1998). Pētījumos arī noskaidrots, ka eglēm *P. gigantea* sakņu sistēmās spēj veidot mikorizai līdzīgus veidojumus (Vasiliauskas et al., 2007; Sun et al., 2009) *P. gigantea* pārsvarā ir atrodama uz skujkokiem, taču tā arī ir novērota uz lapu koku mežizstrādes atliekām (Василяускас, 1989). Tā primāri kolonizē koksni ar augstu mitrumu, taču tā lielākoties nespēj veģetatīvi izplatīties caur skujkoku sakņu kontaktiem, inficējot veselos kokus (Holdenrieder & Greig, 1998). *P. gigantea* izraisa kokmateriālu bojājumus, ja tie atstāti mežā, veidojot sēnei raksturīgo oranži-brūno krāsojumu (Vainio, 2008). Kaut gan sēne ierosina balto trupi, tā nerada draudus dzīvajai koksnei (Gaitnieks, 2014), jo *P. gigantea* ir saprofitisks organisms, kas attīstībai, iegūstot oglekli, izmanto nedzīvās koksnes šūnas (Meredith, 1960; Vasiliauskas, 1998).

P. gigantea izplatību īpaši ietekmē klimatiskie apstākļi – sausuma periodos sēnei ir apgrūtināta bazīdijsporu attīstība un tās no augļķermeņiem neizplatās. Augļķermeņi ir jutīgi pret izžūšanu, kas būtiski ietekmē sporu izplatību (Rishbeth, 1959). Lielās pergamentsēnes attīstību kopumā ietekmē temperatūras izmaiņas, piemēram, temperatūras, kas ir zemākas par 5 °C un augstākas par 35 °C ir sēnei nelabvēlīgas (Thor et al., 1997). Labākie apstākļi, *P. gigantea* bazīdijsporām, izdaloties no augļķermeņiem, ir naktīs, īpaši vējainos laikapstākļos. Oīdijas spēj pārnēsāt arī kukaiņi (Holdenrieder & Greig, 1998).

Sporulācija ir sezonāla – vasaras periodos koksnes kolonizēšana ir novērojama biežāk kā rudens periodos (Gžibovska, 2016). Lielās pergamentsēnes bazīdijsporas spēj izplatīties ievērojamos attālumos, tāpēc sēne ir bieži sastopama. Inficētā koksne novērojami vairāki kolonizējoši *P. gigantea* augļķermeņi ar dažādiem genotipiem (Rishbeth, 1959; Vainio et al., 2001).



1. attēls. *Phlebiopsis gigantea* augļķermeņi uz koksnes (T. Gaitnieka foto).
Figure 1. *Phlebiopsis gigantea* fruitbodies on wood (photo by T. Gaitnieks).

1.1.2. *P. gigantea* augļķermeņi

P. gigantea augļķermeņi ir viengadīgi, vaskveidīgi, aptuveni 0,5 mm biezi un bieži sasniedz 70 cm garumu un 15 cm platumu, taču ir arī novēroti ievērojami lielāki augļķermeņi (Gaitnieks, 2014). Jaunie augļķermeņi atšķirībā no *Heterobasidion* cieši piekļaujas pie substrāta, visbiežāk uz kralām, augļķermeņiem veidojoties pāris gadus pēc koksnes kolonizēšanas (2. attēls) (Kenigvalde et al., 2011). Uz koksnes iespējams novērot arī micēlija pavedienus (3. attēls) (Holdenrieder & Greig, 1998).



2. attēls. *P. gigantea* augļķermeņi uz priedes celma (T. Gaitnieka foto).
Figure 2. *P. gigantea* fruitbodies on pine stump (photo by T. Gaitnieks).

Augļķermeņu krāsojums var būt atšķirīgs – jaunāki augļķermeņi ir pelēki, zilganpelēki un mitruma apstākļos tie ir pat caurspīdīgi, taču vecāki tie ir iedzelteni vai pelēkbalti. Sēnes krāsojumu spēj ietekmēt arī sūnas, uz kurām atrodas mežizstrādes atliekas (Rishbeth, 1959). Iespējams sēnes

latviskais nosaukums saistīts ar augļķermeņa morfoloģiju – vecāki, izžuvusi augļķermeņi atgādina pergamenta papīru (4. attēls) (Kenigsvalde et al., 2011).



3. attēls *P. gigantea* micēlijs uz egles koksnes (A. Bēčas foto).

Figure 3. *P. gigantea* mycelium on spruce wood (photo by A. Bēča).



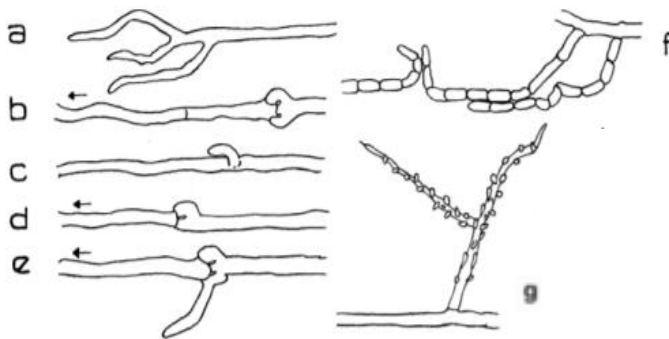
4. attēls. *P. gigantea* vecie augļķermeņi atgādina pergamenta papīru (T. Gaitnieka foto).

Figure 4. Old *P. gigantea* fruitbodies resembling parchment paper (photo by T. Gaitnieks)

1.1.3. *P. gigantea* mikroskopiskās pazīmes

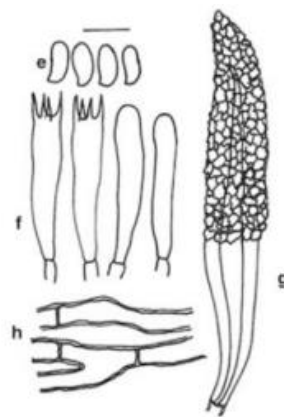
Lielā pergamentsēne laboratorijas apstākļos ir raksturojama kā vidēji līdz ātri augoša bazīdijsēne, kur, augot uz glikozes – peptona agara barotnēm 28-30 °C temperatūrā, tās micēlijs desmit dienu laikā spēj attīstīties 9 – 14 cm. Barotnēs esošais micēlijs novērojams dažādos krāsojumos – no balta, matēta līdz krēmīgi rozā un bēša. Micēlijs ir viegls, brīvs, cieši pieguļas pie substrāta pamatnes (Negi et al., 2017; Käärik & Rennerfelt, 1957).

P. gigantea raksturīgas ir dzimumsporas (bazīdijsporas) un bezdzimumsporas (oīdijas), un augļķermeņus veido sazarotas hifas aptuveni 4 μm diametrā. Micēlijā hifas ir ar sprādzēm un dubultajām sprādzēm, un šīs hifas ir sadalītas oīdiju virknēs. Pie šīm virknēm ir novērojami pergamentsēnei raksturīgie kalcija oksalāta kristāli (5. attēls) (Holdenrieder & Greig, 1998).



5. attēls. *P. gigantea* micēlija mikroskopiska struktūra: a) hifas no dalīšanās zonas; b) – e) dažādas sprādzu attīstības stadijas no augšanas zonām; f) areālā micēlija oīdijas; g) cistīdijas areālajā micēlijā (Käärik & Rennerfelt, 1957).

Figure 5. *P. gigantea* microscopic view illustration: a) hyphae from branching zone; b) – e) stages of development of various clamp growing zones; f) areal mycelium ooidia; g) cystidia in the areal mycelium (Käärik & Rennerfelt, 1957).



6. attēls. *P. gigantea* augļķermeņa daļas: e) bazīdijsporas, f) bazīdija, g) cistīda, h) ģeneratīvās hifas (Prasher, 2015)

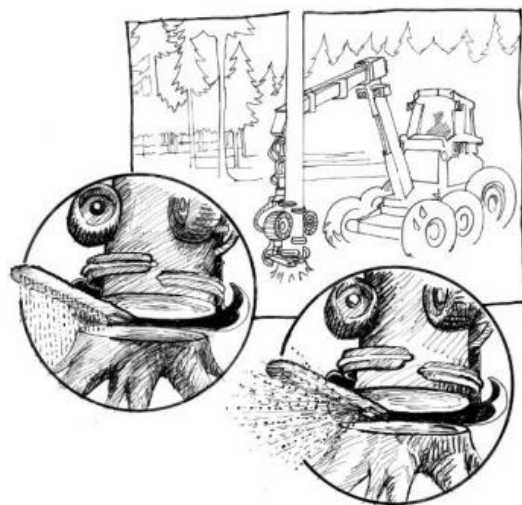
Figure 6. Microscopic structure of *P. gigantea* fruiting body: e) basidiospores, f) basidia, g) cystidiols, h) hyphae (Prasher, 2015)

Bazīdijas ir cilindriskas, šauras, novērojamas četras sterigmas, savukārt, cistīdas ir koniskas un salīdzinoši lielas. Oīdijas ir īsas, cilindriskas un veidojas hifām fragmentējoties (6. attēls). Par oīdiju nozīmi, izplatīšanās veidiem un dzīvotspēju ir maz informācijas, taču ir noskaidrots, ka tās spēj inficēt koksni. Laboratorijas apstākļos tās aktīvi attīstās uz barotnēm un tās ir viegli kultivējamas (Holdenrieder & Greig, 1998). Bioloģisko preparātu izstrādē nozīmīga ir tieši bezdzimumsporu jeb oīdiju veidošanās (Brūna, et al., 2020; Burņeviča et al., 2022).

1.1.4. *P. gigantea* pielietojums

Aizsardzība pret *Heterobasidion* spp. izraisīto sakņu trupi tiek pētīta jau kopš pagājušā gadsimta piecdesmitajiem gadiem, kur aprakstītas tikai divas konkurētspējīgas sēnes – *P. gigantea* un *Trichoderma* (Kuhlman & Hendrix, 1964.) Taču šobrīd vienīgā komerciāli pielietotā sēne skujkoku aizsardzībai ir *P. gigantea* (Pratt et al., 2000). Kolonizējot *Heterobasidion* spp. neskarto koksni, pergamentsēne ierobežo sakņu piepes tālāko attīstību, tādējādi samazinot inficētās koksnes daudzumu (Gaitnieks, 2014). Ar *P. gigantea* oīdiju suspensijām apstrādā svaigi cirstus celmus (Gonthier & Thor, 2013). Oīdijas iegūst no heterokariotiska micēlija, tādējādi suspensijas maisījumā ir gan homokariotiskas, gan heterokariotiskas sporas (Korhonen & Kauppila, 1987).

Ar šādiem *P. gigantea* oīdijas saturošiem preparātiem tiek apstrādāti svaigi celmi daudzviet pasaulē, īpaši Eiropā, kur, izmantojot komerciāli pieejamo bioloģisko preparātu *Rotstop* vien, ik gadu tiek apstrādāti vairāk kā 200 000 ha mežu (Thor, 2001). Būtiski ir nosegt vismaz 85% no celma virsmas, īpaši egles koksni, jo tās *P. gigantea* nekolonizē tik efektīvi kā priedes koksni (Korhonen, 2003). Ir dažādi veidi kā veikt celmu apstrādi – manuāli vai mehanizēti. Mehanizēti ar preparātu apstrāde galvenokārt notiek, izmantojot zāģa sliedēs speciāli izveidotas atveres, kuras zāģēšanas procesā apsmidzina celmu (7. attēls). Lai kontrolētu apsmidzinātos celmus, pie suspensijas preparāta tiek lietota speciāla krāsviela, kas ir gatavota no dabiskiem minerāliem, neietekmējot *P. gigantea* attīstību un efektivitāti. Šī krāsviela dažu dienu laikā sadalās (Gaitnieks, 2014). Vairumā valstu tiek izmantota mehanizēta apstrāde, taču manuāli cirsmas 100% apstrādā Polijā, kur *P. gigantea* micēlijs tiek kultivēts zāģu skaidās. (Thor, 2001; Korhonen & Holdenrieder, 2005). Manuālā apstrāde ir efektīvāka pret *Heterobasidion* sporu infekcijas samazināšanu (79-98%), salīdzinot ar mehānisko apstrādi, kur efektivitāte ir 53-83% (Thor & Stenlid, 2005).



7. attēls. Celmu mehānizēta apstrāde ar bioloģisko preparātu *Rotstop*. Ilustrācija pēc Tove Vollbrecht (Berglund, 2005).

Figure 7. Mechanical stump treatment with biological agent *Rotstop*. Illustration by Tove Vollbrecht (Berglund, 2005).

1.2. Sakņu piepe *Heterobasidion* spp.

1.2.1. *Heterobasidion* spp. bioloģija

Sakņu piepe *Heterobasidion* spp. izraisa arī balto trupi noārdot lignīnu un celulozi. Šī bazidiomicēte, izraisa gan stumbra, gan sakņu trupi. Tās micēlijs spēj noārdīt gan dzīvu, gan nedzīvu koksni, kas to klasificē kā nektrotrofu un saprotrofu (Korhonen & Stenlid, 1998.).

Kolonizējot dzīvās saimniecorganisma šūnas, sēne iegūst barības vielas no dzīvās koksnes daļas, savukārt, tā kā saprotrofs spēj barības arī uzņemt no nedzīvās koksnes. Lai degradētu koksni *Heterobasidion* spp. (specifiski *H. annosum*) sintezē ekstracelulārus enzīmus (Garbelotto & Gonthier, 2013). Sakņu piepe visbiežāk novērojama audzēs ar aktīvu mežsaimniecisku darbību (Redfern & Stenlid, 1998.).

Heterobasidion augļķermeņi ir daudzgadīgi, neregulāras formas, to krāsa variē no baltas līdz sarkanbrūnai. Himenofors, kas ir jaunu augļķermeņu sporu veidojošais slānis, ir balts, taču vecāki augļķermeņi ar laiku iegūst raksturīgo brūno krāsojumu. Augļķermeņus uz koksnes var novērot gan piepes formā, gan klajeniski, un tie ir līdz 5 cm biezi un var sasniegt 40 cm garumu tomēr ir atrasti pat 90 cm gari sēnes augļķermeņi (Asiegbu et al., 2005; Gaitnieks et al., 2022). *Heterobasidion* veido bazīdijsporas un konīdijsporas (Korhonen & Stenlid, 1998).

1.2.2. *Heterobasidion* spp. izplatība

Heterobasidion spp. ir sēņu sugu komplekss, no kurām Latvijā ir sastopamas divas sugas – *Heterobasidion parviporum* (Niemelä & Korhonen) un *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. s.s. Vēsturiski šīs abas sugas ir sadalītas S (*spruce*) un P (*pine*) intersterilitātes grupās, taču Eiropā ir sastopamas trīs saimniecorganismu specifiskas grupas – S, P un F (*fir*) grupa (*Heterobasidion abietinum* (Niemelä & Korhonen)) (8. attēls). Dabā gan šīs sugas vizuāli nav atšķiramas (Niemelä & Korhonen, 1998.; Korhonen et al., 1998)). Eiropā sakņu piepe kā patogēns nodara būtisku kaitējumu saimnieciskajos mežos, izraisot zaudējumus līdz pat 500 – 800 miljonu eiro gadā (Webber & Thorpe, 2001; Korhonen & Holdenrieder, 2005) (8. attēls). Latvijā *Heterobasidion* spp. ir plaši sastopama īpaši egļu audzēs (9. attēls), un tiek lēsts, ka aptuveni 22% egļu ir inficētas. Arī Latvijā sakņu piepe rada saimnieciskus zaudējumus, kur pēc 2006. gada datiem tie ir 1070 eiro/ha (Arhipova et al., 2011).



8. attēls. *H. annosum*, *H. parviporum* un *H. abietinum* izplatība Eiropā (Pettersson, 2013).
 Figure 8. Distribution of *H. annosum*, *H. parviporum*, un *H. abietinum* in Europe (Pettersson, 2013).



9. attēls. Ar *Heterobasidion* spp. inficēta egļu audze (T. Gaitnieka foto).
 Figure 9. Spruce stand infected with *Heterobasidion* spp. (photo by T. Gaitnieks).

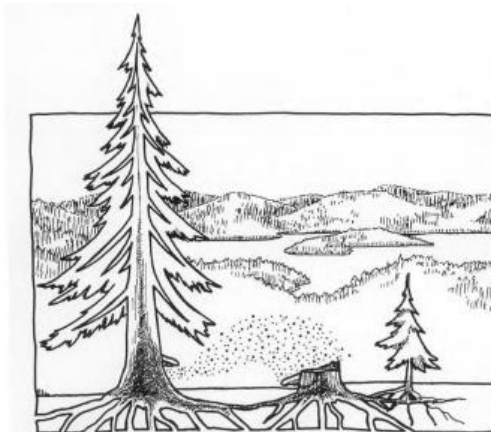
Heterobasidion spp. ir novērojama uz aptuveni 150 koku sugām, taču vislabāk tā attīstās uz skujkokiem, īpaši parastās egles (*Picea abies* (L.) Karst.), parastās priedes (*Pinus sylvestris* L.) un Sibīrijas baltegles (*Abies sibirica* Ledeb.) koksnes (Vollbrecht & Agestam, 1995).

Ir novērojamas atšķirības starp abām Latvijā sastopamajām *Heterobasidion* sugām. *H. parviporum* visbiežāk kolonizē parastās egles koksni, taču tā ir arī izolēta no parastās priedes un Sibīrijas baltegles. *H. annosum*, savukārt, ir veiksmīgāka kolonizētāja priedes koksne, taču arī šī suga ir izolēta no egles, kadiķa (*Juniperus communis* L.), kā arī dažādiem lapu kokiem – baltalkšņa (*Alnus incana* (L.) Moench.), bērza (*Betula pendula* Roth.) un citiem (Korhonen & Piri, 1994.) *H. abietinum* ir galvenokārt novērota balteglēm (*Abies alba* Mill.) (Korhonen et al., 1998).

1.2.3. *Heterobasidion* spp. primārā izplatība

Heterobasidion annosum primārā inficēšanās celmiem notiek ar sēnes izdalītajām bazīdijsporām un konīdijsporām, tām nokļūstot uz svaigiem celmiem vai stumbra sakņu bojājuma vietā ar vēja palīdzību (10. attēls) (Hodges, 1969). Bazīdijsporas ir 3,5-5,0 x 3,0-4,0 μm lielas, ovālas formas dzimumsporas, kuras izdala sakņu piepes augļķermeņi (Korhonen & Stenlid, 1998; Piri, 2003). Konīdijsporas ir *H. annosum* bezdzimumsporas, kas sēnei optimālos apstākļos veidojas uz koksnes. Šo bezdzimumsporu funkcija līdz šim nav noskaidrota, taču šīs sporas ir būtiskas intersterilitātes grupu noteikšanā un eksperimentu veikšanā (Korhonen & Stenlid, 1998).

Izplatība, līdzīgi kā *P. gigantea* sakņu piepes izplatīšanās, ir novērota plašā diapazonā, ja meteoroloģiskie un ģeogrāfiskie apstākļi ir optimāli sēnes attīstībai. Bazīdijsporas visveiksmīgāk inficē koksni, ja ir piemērota gaisa temperatūra, mitrums, vējš, veģetācijas blīvums, kā arī ir maza konkurējošo organismu klātbūtne koksne. Optimālā temperatūra sporu attīstībai ir 12°C - 28°C, taču, kā iepriekš minēts, arī gaisa mitrums ir būtisks – sporu dīgtspēja ilgstošos sausuma periodos ievērojami samazinās. Inficētību ietekmē arī attālums no augļķermeņa līdz piemērotam substrātam (Redfern & Stenlid, 1998; Garbelotto & Gonthier, 2013; Brūna et al., 2021). *Heterobasidion* spp. sporulācija notiek visu gadu, un optimālos apstākļos no 1 cm² sēnes augļķermeņa spēj izdalīties aptuveni 50 miljonu sporu diennaktī (Rosnev, 1976.). Novērojumos Somijas skujkoku audzēs, *H. annosum* infekcijas centrā sporu izdalīšanās var sasniegt 42 000 – 151 000 sporu h/m² (Kallio, 1970) Latvijā veiktos pētījumos konstatēts, ka *Heterobasidion* sporulācijas intensitāte rudens mēnešos 10 – 30 m no sporulācijas avota sasniedz 0 – 131600 sporas/ m² (Brūna et al., 2021).



10. attēls. *H. annosum* izplatīšanās mežos. Ilustrācija pēc Tove Vollbrecht (Berglund, 2005).
Figure 10. Spread of *H. annosum* in forests. Illustration by Tove Vollbrecht (Berglund, 2005).

Sakņu piepes bazīdijsporas spēj inficēt koksni, ja koka bojājums ir svaigs un tas vēl nav izveidojis lignificētu audu zonu, kura sēnei lielākoties ir nepārvarama (Hodges, 1969). Sporas inficē koksni ātri – tās izdīgst jau pēc divām stundām, taču dziļāka infekcija sakņu vaskulārajos audos novērojama pēc aptuveni divām nedēļām (Asiegbu et al., 2005). Sporām dīgstot uz koksnes virsmas, tās veido primāro micēliju (11. attēls, 12. attēls) (Rishbeth, 1959), taču tās arī spēj aptuveni gadu izdzīvot augsnē, ja sporas nav nonākušas saskarsmē ar koksnes substrātu. Augsnē gan micēlijs neveidojas (Korhonen & Stenlid, 1998.) Tomēr augsne ļoti nozīmīgi ietekmē *Heterobasidion* micēlija attīstību un izplatību (Brūna et al., 2020). Abiotiskā ietekme *Heterobasidion* attīstībai augsnē ir pH izmaiņas, bet biotiskā – citu sēņu klātbūtne (piemēram,

Trichoderma), kā arī augšnes iepriekšējais izmantošanas veids (Korhonen & Stenlid, 1998; Brūna et al., 2020). Lauksaimniecības zemes ir saistītas ar augstu *Heterobasidion* infekcijas risku jaunos kokaugu stādījumos. Intensīva sēnes attīstība ir bijušajās ganībās un palieņu pļavās (Klavina et al., 2016). Sporu dīgšanu un sēnes attīstību var kavēt spēcīgi nokrišņi un skujkokiem dabīgi raksturīgie aizsardzības mehānismi – enzīmu, sveķu, fenola izdalīšanās, kā arī pastiprināta suberīna uzkrāšanās koksnes šūnāpvalkos (Asiegbu et al., 1998).



11. attēls. *Heterobasidion* spp. uz egles koksnes virsmas (T. Gaitnieka foto).

Figure 11. *Heterobasidion* spp. on spruce wood (photo by T. Gaitnieks).



12. attēls. *Heterobasidion* spp. augļķermenis (T. Gaitnieka foto).

Figure 12. *Heterobasidion* spp. fruitbody (photo by T. Gaitnieks).

1.2.4. *Heterobasidion* spp. sekundārā izplatība

Sekundārā izplatīšanās notiek ar micēliju, kur inficētas saknes saskaras ar veselu koku saknēm (6. attēls) (Piri, 2003). Šāds infekcijas izplatīšanās veids ir biežāk novērojams vecākās mežaudzēs, kur micēlijs ir kolonizējis ievērojamu daļu sakņu (Garbelotto & Gonthier, 2013). Infekcija caur koksnes vadaudiem iekļūst blakus esošajās šūnās, tādējādi nonākot dziļāk sakņu sistēmā, kas attiecīgi nodrošina citu koku inficēšanos. Ģenētiski viendabīgs micēlijs (genotips) var inficēt vienu koku/celmu, taču inficēto koku skaits genotipā var pārsniegt 20 (Gaitnieks et al., 2022). Genotipi vecākās mežaudzēs var aizņemt ievērojamu laukumu – lielākais reģistrētais *H. annosum* genotips Ziemeļeiropā ir aptuveni 100 gadu vecs un sniedzas 50 m diametrā (Korhonen & Stenlid, 1998.).

Micēlija augšanas ātrums atšķiras starp klimata zonām un koka īpašībām, piemēram, sakņu dimensijām, koka veselības, mizas biezuma (Redfern & Stenlid, 1998.). Atmiruša celma saknēs micēlija izplatība ir ātrāka. Ziemeļeiropā micēlija augšanas ātrums ir 20 – 30 cm gadā, taču siltākos reģionos tas ir ātrāks (Korhonen & Stenlid, 1998.).

1.3. Sakņu piepes *Heterobasidion* spp. ierobežošana

Heterobasidion spp. izraisītās sakņu trapes ierobežošana ir iespējama izmantojot bioloģiskas, ķīmiskas un mežsaimnieciskas apstrādes metodes, kuru pamatā ir infekcijas ierobežošana svaigi cirstiem koku celmiem vai sekundārās infekcijas ierobežošana, izvēcot celmus (Gaitnieks, 2014).

Celmu apstrāde ar bioloģiskajiem preparātiem ir videi draudzīgākā sakņu piepes izplatības ierobežošanas metode, kura arī ir viena no visbiežāk izmantotajām aizsardzības metodēm (Gonthier & Thor, 2013). Pamatā tiek pielietoti preparāti, kuru sastāvā ir *P. gigantea* sporas. Preparāti ir dažādi, piemēram, Lielbritānijā ražots līdzeklis *PG suspension* un Polijā izstrādāts *PG IBL*, taču visplašāk pielietotais bioloģiskais preparāts ir Somijā ražotais *Rotstop* (Pratt et al, 2000). Dažādos eksperimentos somu zinātnieks *Tauno Kallio* apstiprinājis *P. gigantea* nozīmi egļu celmu aizsardzībā (Kallio & Hallaksela, 1979), tādējādi popularizējot šāda veida bioloģiskā preparāta pielietojumu Somijas mežos (Gaitnieks, 2014). *Rotstop* autors ir somu zinātnieks *Kari Korhonen* un preparātu komerciāli ražo no 1991. gada. Līdz šim bioloģisko preparātu izmanto celmu aizsardzībā vairākās Eiropas valstīs – Bulgārijā, Lielbritānijā, Somijā, Zviedrijā, Norvēģijā, Francijā, Vācijā, Itālijā, Šveicē, Polijā (Thor, 2001). Igaunijā *Rotstop* reģistrēts 2004. gadā, taču Latvijā, kā augu aizsardzības līdzeklis, *Rotstop* reģistrēts 2007. gadā (Kenigsvalde et al., 2016).

Ķīmiskā apstrāde, ir ar augstākām izmaksām apstrādē, kā arī tā var negatīvi ietekmēt vidi un cilvēkus (Nicolotti & Gonthier, 2005). Celmus iespējams apstrādāt ar urīnvielu, kas paaugstina substrāta pH līdz tādām līmenim, kas ir toksisks *Heterobasidion* attīstībai un sporu dīgšanai. Urīnvielas pielietošana sakņu piepes ierobežošanā negatīvi ietekmē apkārtējo veģetāciju, mikrofloru un rada augsnes piesārņojumu (Johansson et al., 2002.) Tomēr urīnviela var būt pietiekami efektīva egles koksnē (Zaļuma, et al., 2020).

Sakņu piepi *Heterobasidion* spp. var arī ierobežot ar mežsaimnieciskiem paņēmieniem – kokus stādot lielākos attālumos, tādējādi samazinot sakņu kontaktus, vai arī īpaši inficētās platībās ierīkojot lapu koku jaunaudzēs (Piri, 2003; Piri & Korhonen, 2001). *Heterobasidion* infekcijas ierobežošanas efektivitāti nodrošina micēlija izplatīšanās ierobežošana, samazinot inficēto koku daudzumu, kas jau ir kolonizēti ar *Heterobasidion* spp. iepriekšējās ģenerācijās (Vasaitis et al., 2008.), tāpēc celmu izvākšana ir efektīva mehāniskā sakņu piepes ierobežošanas metode, taču tā ir dārga (Cleary et al., 2013).

Pielietojot bioloģiskos preparātus, piemēram, *Rotstop*, kura sastāvā ir viena *P. gigantea* izolāts, ilgtermiņā var tikt ietekmēta citu celmu kolonizējošo sēņu daudzveidība (Vasiliauskas et al., 2005).

Tāpēc ir veikti pētījumi, lai pārbaudītu arī citu koksni noārdošo sēņu pielietošanu *Heterobasidion* ierobežošanā (Burņeviča et al., 2022). Kā alternatīva varētu tikt izmantota arī suspensija, kas sastāv no vairākiem *P. gigantea* izolātiem. Līdz šim pasaulē ir veikti tikai daži pētījumi, analizējot jaukto *P. gigantea* suspensiju ietekmi pret *Heterobasidion* (Korhonen, 2003; Holdenrieder, 1984).

Latvijā šādi pētījumi tika uzsākti autores bakalaura darbā, kur izvēlētas parastās priedes (*Pinus silvestris* (L.)) un parastās egles (*Picea abies* (L.) Karst.), tajās novērtējot atsevišķu *P. gigantea* izolātu un dažādu izolātu maisījumu suspensiju attīstību koksnē. Secināts, ka dažādu izolātu suspensiju maisījumi neuzrāda labākus rādītājus *P. gigantea* attīstībā koksnē, salīdzinot ar atsevišķu izolātu suspensijām. Autores maģistra darbā iesāktie pētījumi ir papildināti ar efektivitātes pret *Heterobasidion* spp. novērtēšanu.

2. MATERIĀLI UN METODES

2.1. Materiālu iegūšana

Pētījums izstrādāts Latvijas Valsts mežzinātnes institūta “Silava” Meža fitopatoloģijas un mikoloģijas laboratorijā ERAF projekta “Bioloģiskā preparāta izstrāde sakņu trupes izraisīto zaudējumu samazināšanai skuju koku audzēs” (projekta Nr. 1.2.1.1/18/A/004) ietvaros.

Projekta ietvarā iepriekš veiktas sekojošas darbības:

- 1) lielās pergamentsēnes izolātu ievākšana no egles un priedes koksnes – koksnes paraugi paņemti no substrāta, uz kura atrasti lielu dimensiju (vismaz 20x50 cm) augļķermeņi;
- 2) *P. gigantea* izolātu atlase, novērtējot micēlija augšanas ātrumu un antagonismu iesala – agara barotnē un veicot sporu produkcijas novērtējumu;
- 3) Ierīkots eksperiments, kur laboratorijas apstākļos (augšanas kamerās) egles koksne un priedes koksne pārbaudīts *P. gigantea* dažādu izolātu kombināciju micēlija augšanas ātrums un aizņemtais laukums koksne. Tika veikta gan atsevišķu izolātu, gan to suspensiju pārbaude, pārbaudīti *P. gigantea* izolātu kombināciju sastāvi, atlasīti labākie izolāti un sagatavotas *P. gigantea* suspensijas, kombinējot atšķirīgus izolātus.

Maģistra darba ietvaros eksperimentiem izvēlēti izolāti ar augstākajiem rādītājiem sporu produkcijā, augšanas ātrumā, kā arī augstāko efektivitāti pret sakņu piepes micēlija attīstību laboratorijas apstākļos barotnē (papildus informācija: <http://www.silava.lv/23/section.aspx/View/244>). Maģistra darba eksperimentiem *P. gigantea* oīdiju suspensiju pārbaudei izvēlēti četri Latvijas izcelsmes *P. gigantea* izolāti (PG 382, PG 408, PG 182, PG 334), kā arī bioloģiskā preparāta *Rotstop* izolāts (1. tabula).

1. tabula. Eksperimentos izmantoto Latvijas izcelsmes *P. gigantea* izolātu raksturojums.
Table 1. The characteristics of Latvian origin *P. gigantea* isolates used in the experiments.

Izolāts Isolate	Iegūšanas vieta Sampling location	Izdalīšanas avots Sampling source	Gads Year
<i>P. gigantea</i> PG 382	Žiādze	Egle	2014
<i>P. gigantea</i> PG 408	Kalsnava	Priede	2014
<i>P. gigantea</i> PG 182	Vesetnieki	Priede	2012
<i>P. gigantea</i> PG 334	Kalsnava	Priede	2013

2.2. Augšanas ātruma pārbaude

2.2.1. Koksnes paraugu sagatavošana laboratorijas eksperimentam klimata kamerās

Eksperimentam izmantotas divas parastās egles (*Picea abies* (L.) Karst.) koku stumbru bazālās daļas aptuveni \varnothing 25 cm. Eksperimentam paredzētās sumbra daļas izvēlētas gandrīz bez vai kopumā bez zariem, uzmanoties no mizas bojājumiem zāgēšanas procesā. Koki iegūti MPS Kalsnava zinātniskajos mežos, egles sadalot piecos metru garos nogriežņos, piefiksējot nogriežņa izvietojumu un secību pirms zāgēšanas. Nogriežņi pēc pirmējās apstrādes nogādāti LVMI Silava teritorijā tālākajai eksperimenta daļai. Pēc nogriežņu pārvietošanas, izmantojot motorzāģi, tie sazāģēti trīs daļās, no katras egles kopumā sagatavojot 15 blukīšu (30 kopā) (11. attēls). Blukīti apzīmēti, sanumurēti pēc loģikas pirmā vai otrā egles, blukļa numurs pēc kārtas, numerāciju sākot no koka apakšas (E1.1, E2.1, E1.2, u.t.t.).

Pēc apzīmēšanas katra egles blukļa augšpusē izveidoti 12 bedrītes, izmantojot triecienu urbja mašīnu (1. pielikums). Padziļinājumi izurbti aptuveni 0,5 cm dziļumā, \varnothing 2 cm, lai tajos iepilinātu iepriekš sagatavotas *P. gigantea* izolātu, izolātu maisījumu un bioloģiskā preparāta *Rotstop* oīdiju suspensijas. Lai orientētos nākamajos eksperimenta soļos, katrs padziļinājums atzīmēts ar kārtas numuru 1 – 12 (13. attēls).

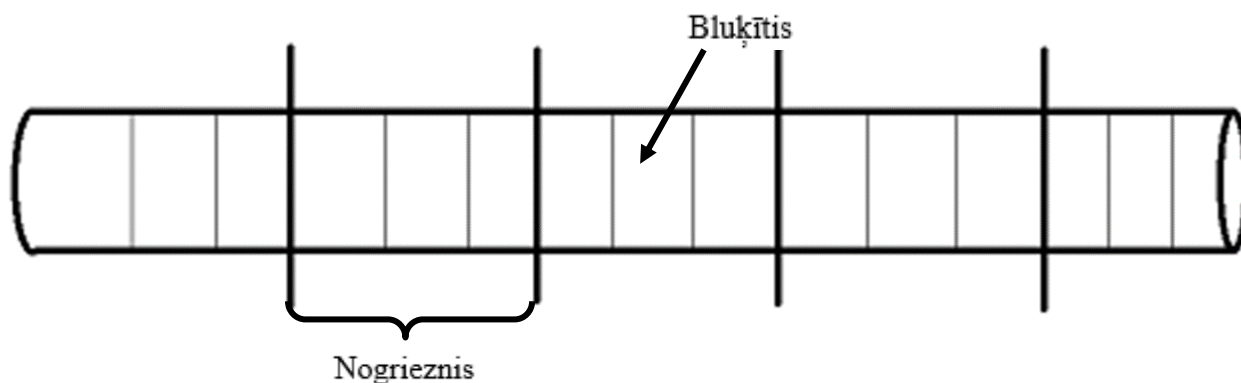


13. attēls Padziļinājumi blukī (A. Bēčas foto).
Figure 13. Recesses in billet (photo by A. Bēča)

2.2.2. Koksnes paraugu sagatavošana lauka eksperimentam

Līdzīgi kā klimata kameras eksperimentam, lauka eksperimentam izmantotas divas parastās egles (*Picea abies* (L.) Karst.) koku stumbru bazālās daļas aptuveni \varnothing 25 cm. Eksperimentam paredzētās stumbru daļas izvēlētas gandrīz bez vai kopumā bez zariem, uzmanoties no mizas bojājumiem zāģēšanas procesā. Koki iegūti MPS Kalsnava zinātniskajos mežos, egles sadalot piecos metru garos nogriežņos, piefiksējot nogriežņa izvietojumu un secību pirms zāģēšanas. Egļu nogriežņos sadalīta turpat MPS Kalsnava zinātnisko mežu teritorijā.

Izmantojot motorzāģi, četri nogriežņi sazāģēti trīs daļās, bet viens nogrieznis, kas sākotnēji atradies koka augstākajā daļā, sazāģēts divās daļās, no katras egles kopumā sagatavojot 15 blukītus (30 kopā) (14. attēls).



14. attēls. Shēma blukīšu zāģēšanai.
Figure 14. Scheme of billet sawing.

Blukīši apzīmēti, sanumurēti pēc loģikas pirmā vai otrā egļu, blukļa numurs pēc kārtas, numerāciju sākot no koka apakšas. Katram blukītim arī dots izolātu un izolātu maisījumu suspensiju kombinācijas apzīmējums, lai vienmērīgi izkliedētu suspensiju sadali pa visiem nogriežņiem (2. tabula). Katram sektoram, kurš tiks apstrādāts ar noteiktu kombināciju vai atstāts kontrolei, tiek piešķirts numurs I – IV.

2. tabula. Kombināciju apzīmējumi blūķīšiem.
Table 2. Combination names given for billets.

Apzīmējums	Kombinācija*			
	I	II	III	IV
1	C	R	A	B
2	C	R	C	D
3	C	R	E	F
4	C	R	G	H

*kombināciju atvasinājumi atrodami 4. tabulā.

2.2.3. Eksperimentiem izvēlētie *Phlebiopsis gigantea* izolāti

Eksperimentiem izvēlētajiem Latvijas izcelsmes *P. gigantea* izolātiem iepriekš tika analizēta sporu produkcija, augšanas ātrums un antagonisms laboratorijas apstākļos, vadoties pēc LVMI Silava pētniecības projekta 1.2.1.1/18/A/004 “Bioloģiskā preparāta izstrāde sakņu trupes izraisīto zaudējumu samazināšanai skuju koku audzēs” izstrādātajām vadlīnijām. Eksperimentos tika sagatavota arī *Rotstop* preparāta suspensija kā references rādītājs.

Suspensiju maisījumus veidoja no tiem izolātiem, kas uzrāda labākos rādītājus augšanas ātrumā, aizņemtajā laukumā egles koksnēs, sporu produkcijā un augšanas ātruma platē. PG 334 izolāts izvēlēts, jo tas uzrādīja labākos rādītājus laukumos priedes koksnē (4,27 cm²) un sporu produkcijā (167,3 milj./Petri platē). Tas uzrādīja arī optimālus rādītājus augšanas ātrumam priedes koksnē (8,79 mm·dienā⁻¹). Izolāts PG 382 izvēlēts, jo tas uzrādīja optimālus rezultātus augšanas ātrumā gan uz Petri plates (7,1 mm·dienā⁻¹), kā arī tas laboratorijas apstākļos uzrādījis ātrāko micēlija augšanas pieaugumu *Heterobasidion* spp. P grupas izolāta pāraugumam (2,5 mm·dienā⁻¹). Izolāts PG 408 izvēlēts, jo tam novērtēts vislielākais sporu daudzums vienā Petri platē (176,4 miljoni), kā arī tas uzrādījis labu augšanas ātrumu Petri platē (6,9 mm·dienā⁻¹). Izolāts PG 182 – aizņēma vislielāko laukumu egles koksnē (9,76 cm²) (2. pielikums).

2.2.4. Suspensiju sagatavošana

Suspensijas tika sagatavotas abu eksperimentu dienās 2 – 4 stundas pirms blūķīšu apstrādes. Petri platē ar Hagem barotni (iesala ekstrakts, mikrobioloģiskais agars, NaNO₃, KH₂PO₄, MgSO₄) ielejot nelielu daudzumu ūdens un ar špateli nomazgājot Petri platē esošā izolāta micēliju. Šo iegūto oīdiju suspensiju ielej kolbā ar litru dejonizēta ūdens. No šī litra ar automātisko pipeti paņem 3. tabulā doto daudzumu attiecīgi katram izolātam un atšķaida katru izolāta suspensiju ar 500 mL ūdens (3. tabula). Suspensijā nepieciešamo izolāta sporu daudzumu koriģēja uz 5000 sporām/mL. Suspensiju salēja 500 mL plastmasas pudelēs un ar permanento marķieri atzīmēja attiecīgo izolāta

nosaukumu. Suspensijai tika pievienota krāsviela, lai bluķīšu apstrādes posmos gan laboratorijas, gan lauka eksperimentos, būtu vienkāršāk orientēties. Izolātiem un izolātu maisījumiem doti jauni nosaukumi abos eksperimentos (4., 5. tabula).

3. tabula. Piešķirtie apzīmējumi un nepieciešamais suspensijas daudzums uz 500 mL.
Table 3. Given names and needed suspension amount on 500 mL.

Izolāts Isolate	Apzīmējums Name	Daudzums uz 500 mL, mL Volume in 500 mL, mL
PG 382	1	26,2
PG 408	2	84,7
PG 182	3	8,0
PG 334	4	29,2
Rotstop	R	8,0

4. tabula. Izvēlēto izolātu suspensiju numerācija, suspensiju maisījumi laboratorijas eksperimentam.

Table 4. Chosen isolate suspension numeration, suspension mixtures for laboratory experiment.

Bedrītes Nr. Recess number	Izvēlētais izolāts Chosen isolate
1	PG 382
2	PG 408
3	PG 182
4	PG 334
5	R
6	PG 182 + PG 382
7	PG 182 + PG 334
8	PG 182 + PG 382 + PG 334
9	PG 408 + PG 182
10	PG 382 + PG 408
11	PG 182 + PG 382 + PG 334 + PG 408
12	PG 334 + PG 382

5. tabula. Izvēlēto izolātu suspensiju numerācija, suspensiju maisījumi lauka eksperimentam.

Table 4. Chosen isolate suspension numeration, suspension mixtures for field experiment.

Apzīmējums Name	Izvēlētais izolāts/izolātu maisījums Chosen isolate/isolate mixture
A	PG 182
B	PG 182 + PG 382
C	PG 182 + PG 382 + PG 334
D	PG 182 + PG 334
E	PG 382
F	PG 408 + PG 182
G	PG 334
H	PG 382 + PG 408

2.2.5. Sporu skaitīšana

No katras iegūtās *P. gigantea* izolāta kultūras, tai skaitā *Rotstop* izolāta, ar liesmā sterilizētu metāla cilindru iegūti vienādi micēlija gabaliņi un, izmantojot sterilizētu metāla preparējamo adatu, atsevišķi ievietoti Petri platēs ar iesala – agara barotni. Katram izolātam trīs atkārtojumi. *P. gigantea* izolāti tiek inkubēti vienu mēnesi 20 °C temperatūrā. Pēc inkubācijas no katra *P. gigantea* (t.sk. *Rostop*) izolāta tūrkultūras ar 10 mL ūdens, izmantojot stikla špateli, noskalotas oīdijas un pagatavota suspensija vienā litrā krāna ūdens. Ar automātisko pipeti paņemti 0,5 mL no *P. gigantea* suspensijas, kas pārnesti uz jaunu Petri plati, ar stikla špateli tos vienmērīgi izklidējot pa visu Petri plates virsmu. *P. gigantea* oīdijas skaitītas Petri platē 20 mikroskopa redzeslaukos pie 100x palielinājuma. Noskaidrojot sporu skaitu, tiek veikts aprēķins, lai iegūtu kopējo oīdiju skaitu (miljonos) konkrētajam analizētajam izolātam pēc formulas:

$$N_{vid} = \frac{N_{sp.} \times S_p}{S_r \times 2000}$$

$N_{sp.}$ – vidējais sporu skaits vienā redzeslaukā; S_p – Petri plates laukums ($(\pi r^2, r=4,5 \text{ cm}, \pi \sim 3,14)$, cm^2); S_r – redzeslauka laukums ($0,0371 \text{ cm}^2$).

2.2.6. Bluķīšu apstrāde eksperimentam klimata kamerās

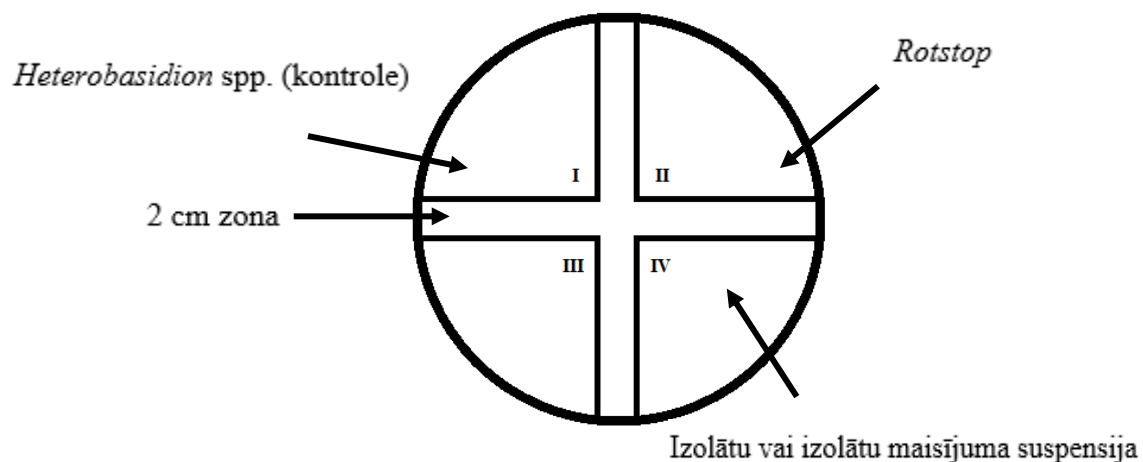
Pēc bluķīšu apstrādes ar atsevišķiem izolātiem un to suspensijām, tie tika ievietoti klimata kamerā, kur tika nodrošināts mēnesi (4 nedēļas) ilgs inkubācijas periods konstantā temperatūrā (20 °C) un mitrumā (80%) (15. attēls).



15. attēls. Bluķīšu novietojums klimata kamerā (A. Bēčas foto).
Figure 15. Billet placement in climate chamber (photo by A. Bēča).

2.2.7. Bluķīšu apstrāde eksperimentam lauka apstākļos

Bluķīšu augšējā virsma sadalīta 4 sektoros, atstājot starp tiem 2 cm platu joslu (16. attēls). Trīs sektori apsmidzināti ar analizējamā *P. gigantea* izolāta suspensiju un ceturtais sektors atstāts kā kontroles sektors *Heterobasidion* infekcijai. Kamēr veikta viena sektora apsmidzināšana ar *P. gigantea* suspensiju, pārējie sektori aizsegti ar papīra lapu (17. attēls).



16. attēls. Shēma suspensiju apstrādei bluķīšiem.
Figure 16. Scheme for suspension treatment of billets.



17. attēls. Bluķīšu apsmidzināšana ar izolātu vai izolātu maisījuma suspensiju (A. Bēčas foto).
Figure 17. Manual treatment of billets with isolate or isolate mixture suspensions (photo by A. Bēča).

Bluķīši izvietoti divu līdz četru metru attālumā no *Heterobasidion* spp. sporu avota (celmi un ciršanas atliekas/ kaltuši koki, uz kuriem sastopami *Heterobasidion* spp. augļķermeņi). Zem tiem novietota agroplēve, lai samazinātu kontaktu ar augsni (18. attēls). Bluķīši atstāti mežā piecas dienas.

Pēc bluķīšu inficēšanas perioda, tie pārvietoti uz tuvējo kokaudzētavas teritoriju, kur bluķīši novietoti nojumē, lai atrastos daļējā noēnojumā, un regulāri laistīti, lai nodrošinātu optimālus apstākļus *Heterobasidion* spp. un *P. gigantea* attīstībai. Arī šajā solī bluķīši novietoti uz agroplēves, lai izslēgtu tiešu kontaktu ar augsni (19. attēls). Bluķīši lauka apstākļos inkubēti četras nedēļas.



18. attēls. Bluķīši novietoti pie sporu avota mežā
(A. Bēčas foto).
Figure 18. Billets next to spore source in forest
(photo by A. Bēča).



19. attēls. Bluķīšu novietojums
inkubācijas periodā (A. Bēčas foto).
Figure 19. Billet placement during
incubation period (photo by A. Bēča).

2.3. Augšanas ātruma analīze

2.3.1. Ripu sagatavošana inkubācijai

Bluķīšus pēc inkubācijas gan laboratorijas, gan lauka eksperimentiem sazāģēja katru 7 ripās (20. attēls) 2,5 cm biezumā, tām atzīmējot virspusi un apakšpusi, numurējot katras ripas (izņemot pirmās) augšpusi ar romiešu cipariem. Kontrolei veikts viens horizontāls, taisns un viens nedaudz slīps zāģējums bluķa malā, lai ripas vēlāk varētu analizēt atbilstoši konkrētam dziļumam. Ripas sagatavoja inkubācijai, tās vispirms nomizojot un nomazgājot ar birsti zem tekoša, silta ūdens. Pēc mazgāšanas tās ievietoja polietilēna maisos mitruma nodrošināšanai ar atvērtiem galiem gaisa cirkulācijai. Polietilēna maisus ievietoja kastē stāvus, kastes atstāja istabas temperatūrā inkubācijā (~20 °C) līdz novērojams *P. gigantea* raksturīgais oranžais krāsojums (aptuveni septiņas dienas).



20. attēls. Bluķītis tikko pēc tā sazāģēšanas ripās (A. Bēčas foto).
Figure 20. Billet just after it is cut in to wood disks (photo by A. Bēča).

2.3.2. Ripu analīze laboratorijas eksperimentam

Pēc nedēļas inkubācijas perioda tika veikta *P. gigantea* sastopamības analīze katrai ripai ik pēc divām dienām, kopumā tās analizējot trīs reizes. Analīze tika veikta, vizuāli nosakot, vai uz koksnes ir sarkanbrūns krāsojums (Berglund, 2005). Papildus sarkanbrūnā krāsojuma noteikšanai, *P. gigantea* sastopamība tika noteikta arī izmantojot stereomikroskopu ar palielinājumu 25 x, lai novērtētu micēlija struktūru. Krāsojuma laukumus pēc septiņu dienu inkubācijas ar zaļu permanento marķieri atzīmēja uz katru no ripām. Pēc deviņu dienu inkubācijas – ar sarkanu permanento marķieri un ar zilu permanento marķieri pēc 11 dienu inkubācijas tika atzīmēts *P. gigantea* novērotais micēlijs uz ripas (21. attēls).

Iegūtie *P. gigantea* laukumi visiem inkubācijas periodiem tika arī pārzīmēti uz caurspīdīgas plēves, lai ar planimetru (PLANIX 10S) izmērītu to laukumus.



21. attēls. *P. gigantea* aizņemtā laukuma salīdzinājums dažādos dziļumos (3-15 cm dziļumā)(A. Bēčas foto).

Figure 21. *P. gigantea* occupied area comparison in different depths (photo by A. Bēča).

2.3.3. Ripu analīze lauka eksperimentam

Lauka eksperimenta blūķīšu ripas analizēja, izmantojot stereomikroskopu Leica MZ 7.5. (20x palielinājums). Ripām, piestiprinot plastmasas režģi (0,7 x 0,7 cm), pārbaudīja katru rūtiņu uz ripas virsmas. Rezultātus nosaka katram kvadrantam. *Heterobasidion* spp. noteica pēc vizuālām pazīmēm – sēnei raksturīgajiem konīdijnesējiem (22. attēls) (Sun et al., 2009). Ja rūtiņā konstatēja vismaz vienu konīdijnesēju, to atzīmēja ar marķieri.



22. attēls. *Heterobasidion* spp. raksturīgie konīdijnesēji (A. Bēčas foto).
Figure 22. *Heterobasidion* spp. characteristic conidiophores (photo by A. Bēča).

2.4. *P. gigantea* reizolācija no ripām

2.4.1. Izolātu iegūšana no koksnes paraugiem

Lai iegūtu *P. gigantea* tīrkultūras, katrai *P. gigantea* izolāta vai izolātu maisījuma suspensijai pēc ripu inkubācijas dažādos dziļumos, izmantojot stereomikroskopu (palielinājums 3 – 20x) ar liesmā sterilizētu pinceti tika paņemts *P. gigantea* micēlijs, to pārnesot Petri platē uz iesala – agara barotnes. Novērtējums, vai uz ripas ir atrodams *P. gigantea* micēlijs, tika veikts gan vizuāli apskatot ripas, meklējot koksnes iekrāsojumu, gan analizējot ripas ar stereomikroskopu, kā arī atrastā micēlija struktūras ar mikroskopa palīdzību. Pēc *P. gigantea* izolātu attīstības uz barotnes, to pārbauda pēc mikroskopiskajām pazīmēm zem mikroskopa Leica DM 4000B (pal. 100x) (23. attēls).

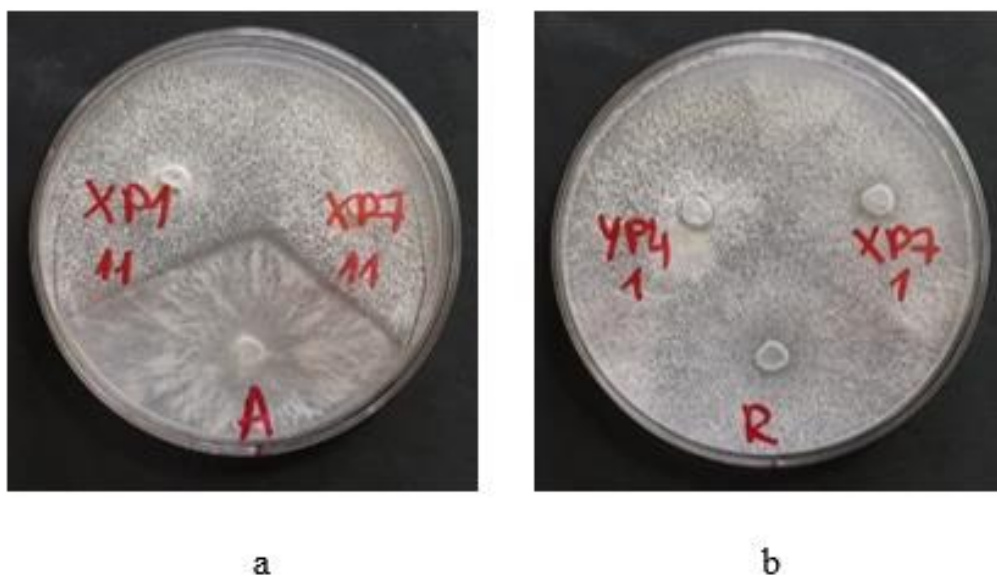


23. attēls. *P. gigantea* micēlija struktūras (A. Bēčas foto).
Figure 23. *P. gigantea* mycelium structures (photo by A. Bēča).

2.4.2. Paraugu salīdzināšana ar oriģināliem izolātiem

Pēc *P. gigantea* tīrkultūru iegūšanas tika pārbaudīta to piederība konkrētam *P. gigantea* genotipam, ar kuru tas tika apstrādāts.

P. gigantea genotipu piederību noskaidro pēc demarkācijas līnijas veidošanās. Katra izmantotā izolāta tīrkultūras gabaliņus ar sterilu preparējamo adatu pārnes uz Petri plati ar Hagem barotni. Sekojoši uz šīs pašas Petri plates uznes uz eksperimenta ripām 2.4.1 punktā izolētos *P. gigantea* izolātus 1 – 1,5 cm attālumā no pirmā uzliktā tīrkultūras gabaliņa. Pēc trim nedēļām novēro demarkācijas līniju veidošanos starp *P. gigantea* izolātiem, šādā veidā nosakot to piederību konkrētam genotipam. (Stenlid, 1985.). Piederība Rotstop izolāta genotipam redzama 24.b attēlā, kur demarkācijas līnijas nav izveidojusies, norādot uz kopīgu genotipu, savukārt, 24.a attēlā redzama demarkācijas līnija, kas norāda uz izolāta A atšķirību no pārējiem 2 izolātiem nesaderību.



24. attēls. *P. gigantea* salīdzināšana. a – izolātu šķir demarkācijas līnija, kura liecina par to nesaderību; b – izolāti pieder vienam genotipam (A. Bēčas foto).
Figure 24. The comparison of *P. gigantea*. a – a demarcation line between the isolates indicate their incompatibility; b – isolates belong to the same genotype (photo by A. Bēča).

2.5. Statistiskās analīzes

Maģistra darbā izmantotie dati tika apstrādāti, izmantojot Microsoft Excel 365 programmu, aprēķinot vidējās aritmētiskās vērtības un standartnovirzes. Rēķinātas korelācijas starp dažādiem izolātu rādītājiem, tās būtiskumu nosakot pie $\alpha = 0,05$ (Liepa, 1974).

Paraugkopas arī tika salīdzinātas pie būtiskuma līmeņa $\alpha = 0,05$, izmantojot t-testu un Wilcoxon test.

P. gigantea izolātu laukumu (%) iegūst dalot konkrētās sēnes izolāta aizņemto laukumu cm² ar pirmās ripas laukumu cm². *P. gigantea* izolāta augšanas ātrumu koksne noteica, izmērot visas ripas, kurās tika konstatēta *P. gigantea* attīstība, un, saskaitot kopā, kā arī pieskaitot 0,2 cm, kas reprezentētu zāģēšanas laikā zaudēto koksnes daļu.

H. annosum laukumu (%) aprēķināja pēc formulas:

$$S_{H.a.}(\%) = \frac{n \times S_r}{100}$$

n – rūtiņu skaits ar konīdijnesējiem;

S_r - rūtiņas laukums (0,49 cm²).

Suspensiju efektivitāti (E, %) aprēķināja pēc formulas:

$$E(\%) = 100 - \left(\frac{(n_a \times S_r) \times 100}{n_k \times S_r} \right)$$

n_a – *H. annosum* novērojumu skaits vienā kvadrantā, kas apstrādāts ar *P. gigantea* oīdiju suspensiju;

n_k – *H. annosum* novērojumu skaits kontroles kvadrantā;

S_r - rūtiņas laukums (0,49 cm²).

3. REZULTĀTI

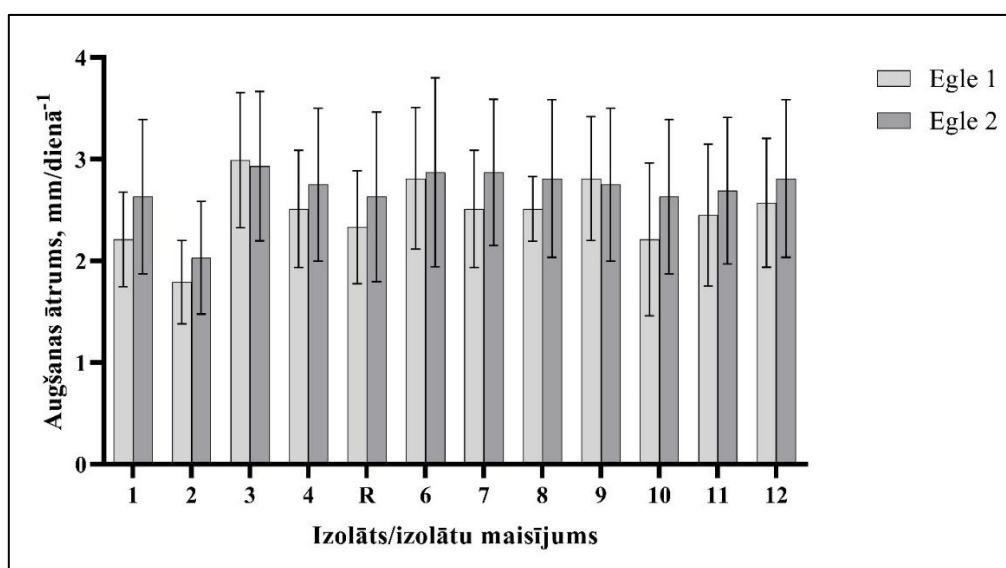
3.1. *P. gigantea* attīstības dinamika klimata kamerā

Eksperimentam izvēlētas divas parastās egles (\varnothing 25 cm), lai novērtētu lielās pergamentsēnes izolātu un izolātu maisījumu attīstību koksniē laboratorijas apstākļos. *P. gigantea* attīstība novērtēta pēc sēņu augšanas ātruma un aizņemtā laukuma (%) egles koksniē. Eksperimentā izmantoto egļu blukšiem izurbti 12 padziļinājumi, lai tajos ar automātisko pipeti iepilinātu pētāmo *P. gigantea* izolātu vai izolātu maisījumu suspensijas.

3.1.1. *P. gigantea* augšanas ātrums oīdiju suspensijām koksniē

Visi pētāmie izolāti un izolātu maisījumi veiksmīgi attīstījušies egles koksniē. Būtiski atšķirīgi vidējie augšanas ātruma rādītāji novērojami tikai 2. izolātam (PG 408) ($1,913 \pm 0,484$ mm·dienā⁻¹, $p=0,029$), kas, salīdzinot to ar R izolātu (*Rotstop*) ($2,483 \pm 0,694$ mm·dienā⁻¹), audzis lēnāk. Kaut gan 3. (PG 182) ($2,963 \pm 0,700$ mm·dienā⁻¹, $p= 0,106$) un 4. izolāts (PG 334) ($2,633 \pm 0,663$ mm·dienā⁻¹, $p= 0,592$) attīstījies nosacīti ātrāk, tiem nav novērojamas būtiskas atšķirības ($p>0,05$), salīdzinot ar *Rotstop* izolātu.

Salīdzinot izolātu maisījumus ar *Rotstop*, netika novērotas būtiskas atšķirības vidējos augšanas ātrumos ($p>0,05$), taču nosacīti labus rādītājus varēja novērot 6. (PG 182 + PG 382) ($2,843 \pm 0,813$ mm·dienā⁻¹, $p= 0,254$) un 9. (PG 408 + PG 182) ($2,783 \pm 0,679$ mm·dienā⁻¹, $p= 0,295$) izolātu maisījumiem, kur abiem sastāvā ir 3. izolāts (25. attēls, 6. tabula).



25. attēls. *P. gigantea* augšanas ātrums abu eksperimentā izmantoto egļu koksniē pēc četru nedēļu inkubācijas perioda, \pm standartnovirze.

Figure 25. *P. gigantea* growth rate in both spruce trees used in the experiment after four week incubation period, \pm standard deviation

6. tabula. Ar *Rotstop* salīdzināto izolātu un izolātu suspensiju maisījumu p-vērtības.
Table 6. p – values of the compared isolates and isolate mixtures with *Rotstop*.

Izolāts Isolate	Vidējais izaugšanas dziļums, mm·dienā ⁻¹ * Average growth depth, mm·day ⁻¹	p- vērtība
R	2,483	-
1	2,423	0,824
2	1,913	0,029
3	2,963	0,106
4	2,633	0,592
6	2,843	0,254
7	2,693	0,451
8	2,663	0,488
9	2,783	0,295
10	2,423	0,841
11	2,573	0,756
12	2,693	0,467

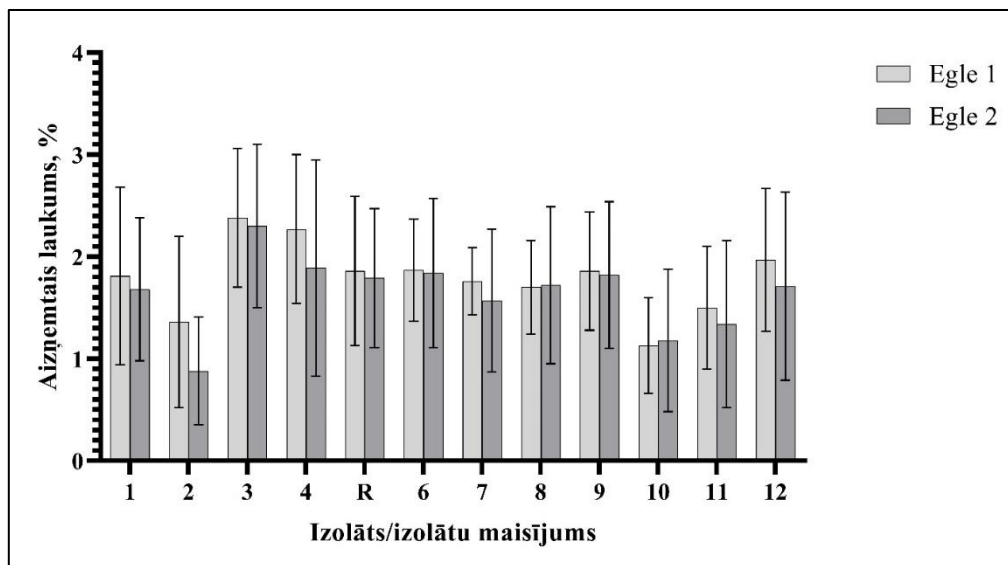
*vidējais izaugšanas dziļums pa abām eglēm.

3.1.2. *P. gigantea* aizņemtā laukums

Novērtēts *P. gigantea* vidējais relatīvais aizņemtā laukums (%) 3 cm un 9 cm dziļumos, kur 3 cm dziļumā (1. ripas apakšpusē) būtiskas atšķirības novēroja 2. izolātam (PG 408) ($1,121 \pm 0,685$ %, $p=0,021$), kas, salīdzinot ar *Rotstop* ($1,824 \pm 0,702$ %), aizņēma procentuāli mazāku laukumu. Relatīvi labākus rādītājus konstatēja 3. izolātam (PG 182) ($2,342 \pm 0,742$ %, $p=0,091$) un 4. izolātam ($2,080 \pm 0,896$ %, $p=0,439$), salīdzinot ar *Rotstop* izolātu, taču šie rādītāji nav statistiski būtiski atšķirīgi ($p>0,05$).

Analizējot izolātu maisījumu vidējos relatīvos aizņemtā laukumus (%), statistiski būtiskas atšķirības konstatētas 10. izolātu maisījumam (PG 382 + PG 408) ($1,154 \pm 0,588$ %, $p=0,019$), kas salīdzinot ar *Rotstop*, ir ar mazāku procentuāli aizņemto laukumu (26. attēls, 7. tabula).

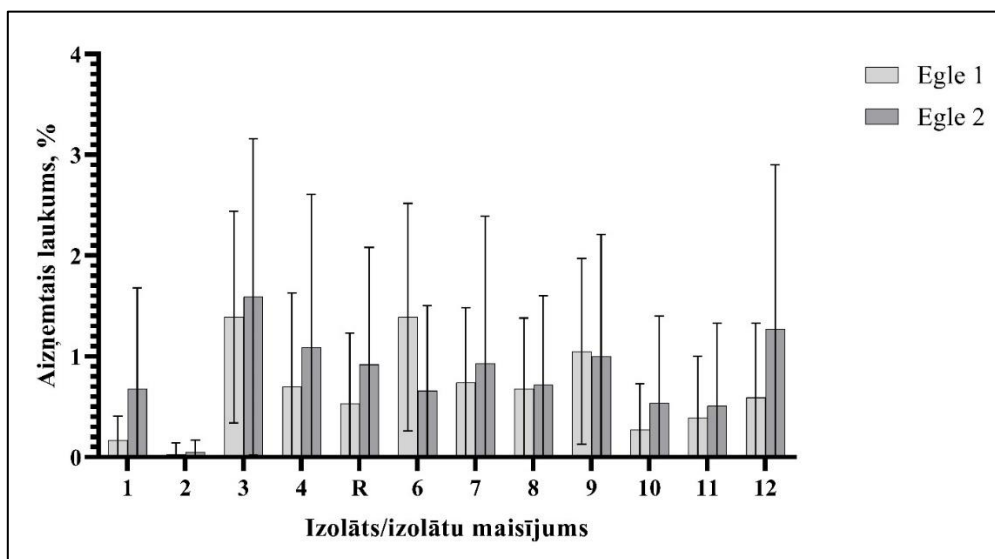
Augstākā aizņemtā laukuma vērtības uzrādīja 3. un 4. izolāts, taču atšķirības nebija statistiski būtiskas.



26. attēls. *P. gigantea* izolātu un izolātu maisījumu aizņemtais laukums 3 cm dziļumā abās eksperimentā izmantotajās egļu koksnēs, ± standartnovirze.

Figure 26. *P. gigantea* isolate and isolate mixture occupied areas in both spruce trees used in the experiment in 3 cm depth, ± standard deviation.

Arī 9 cm dziļumā 2. izolāts ($0,041 \pm 0,114$ %, $p=0,005$) uzrādīja būtiski mazāku aizņemto laukumu, salīdzinot ar *Rotstop* ($1,026 \pm 0,983$ %). Augstākās vērtības raksturoja 3. izolātu (PG 182) ($1,491 \pm 1,311$ %, $p=0,342$), salīdzinot ar *Rotstop* izolātu, taču šie rādītāji nav statistiski būtiski atšķirīgi ($p>0,05$) (27. attēls, 7. tabula).



27. attēls. *P. gigantea* izolātu un izolātu maisījumu aizņemtais laukums 9 cm dziļumā abās eksperimentā izmantotajās egļu koksnēs, ± standartnovirze.

Figure 27. *P. gigantea* isolate and isolate mixture occupied areas in both spruce trees used in the experiment in 9 cm depth, ± standard deviation.

7. tabula. Vidējais *P. gigantea* izolātu aizņemtais laukums izolātiem uz pirmās ripas apakšpusē eglei 3 cm un 9 cm dziļumā, p-vērtības attiecībā pret *Rotstop*.
 Table 7. Average occupied area of *P. gigantea* isolates on the lower side of spruce and pine discs in 3 cm and 9 cm depth, p-values against *Rotstop*.

Izolāts/i Isolate/s	<i>P. gigantea</i> aizņemtais laukums, %* <i>P. gigantea</i> occupied area %			
	3 cm	p-vērtība p-value	9 cm	p-vērtība p-value
R	1,824	-	1,026	-
1	1,742	0,795	0,425	0,894
2	1,121	0,021	0,041	0,005
3	2,342	0,091	1,491	0,342
4	2,080	0,439	0,892	0,761
6	1,857	0,884	0,721	0,435
7	1,662	0,532	0,838	0,659
8	1,711	0,686	0,698	0,374
9	1,838	0,943	1,025	0,981
10	1,154	0,019	0,402	0,080
11	1,424	0,179	0,449	0,114
12	1,843	0,949	0,929	0,824

*vidējais aizņemtais laukums abās eglēs.

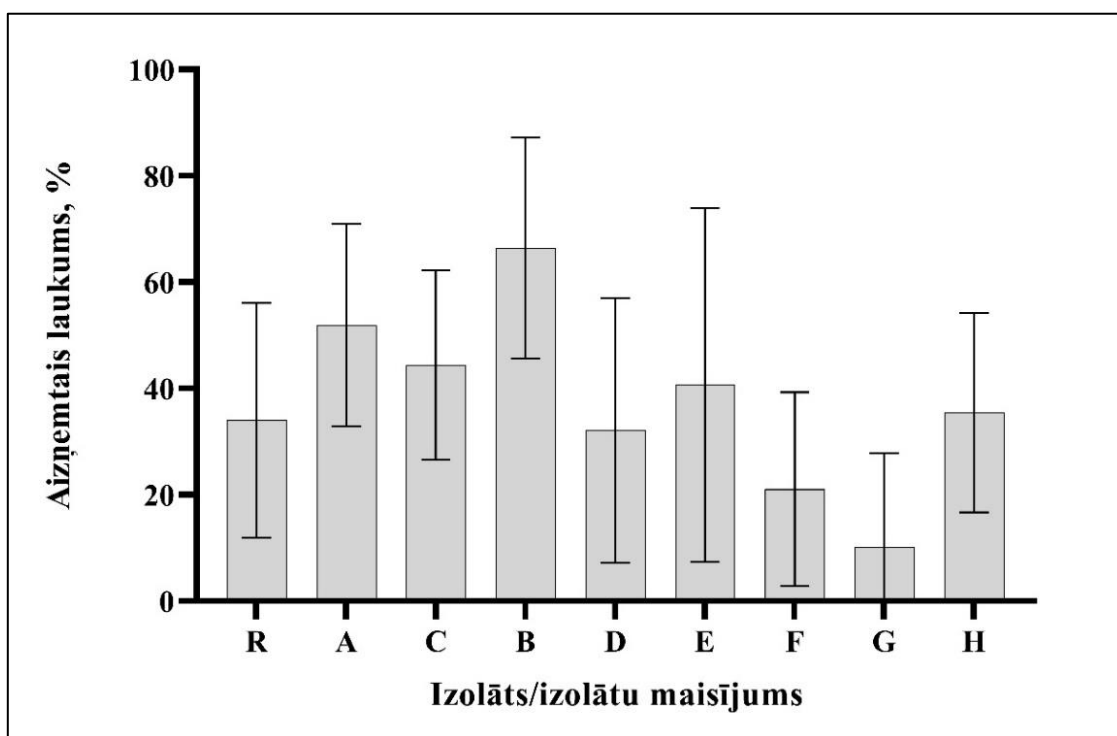
3.2. *P. gigantea* suspensiju antagonisms pret *Heterobasidion* spp.

Lai novērtētu *P. gigantea* antagonismu pret *Heterobasidion* spp. lauka eksperimentā, tika analizēts *P. gigantea* aizņemtais laukums (%) un efektivitāte pret sakņu piepes infekcijas samazināšanu. Analizētie blūķīši apstrādāti ar deviņām dažādām izolātu un izolātu maisījumu suspensijām, tostarp arī bioloģisko preparātu *Rotstop*. Apstrāde notika, apsmidzinot trīs no četriem egles blūķīšu virsmas sektoriem, vienu kvadrantu atstājot kontroles *Heterobasidion* spp. infekcijai.

3.2.1. *P. gigantea* aizņemtais laukums

Novērtēts *P. gigantea* vidējais relatīvais aizņemtais laukums (%) 3 cm un 9 cm dziļumos katrā pētāmajā egles blūķa sektorā, kur 3 cm dziļumā (1. ripas apakšpusē) būtiskus rādītājus novēroja G izolātam (PG 334) ($10,100 \pm 17,702$ %, $p=0,023$), kas, salīdzinot ar R (*Rotstop*) ($34,017 \pm 22,038$ %), aizņēma procentuāli mazāku laukumu. Relatīvi labākus rādītājus novēroja A izolātam (PG 182) ($51,929 \pm 19,044$ %, $p=0,08$), salīdzinot ar *Rotstop* izolātu, taču šie rādītāji nav statistiski būtiski ($p>0,05$).

Pētot izolātu maisījumu vidējos relatīvos aizņemtos laukumus (%), statistiski būtiskas atšķirības konstatētas B izolātu maisījumam (PG 182 + PG 382) ($66,453 \pm 20,756$ %, $p=0,005$), kas salīdzinot ar *Rotstop*, ir ar lielāku procentuāli aizņemto laukumu (28. attēls, 8. tabula).



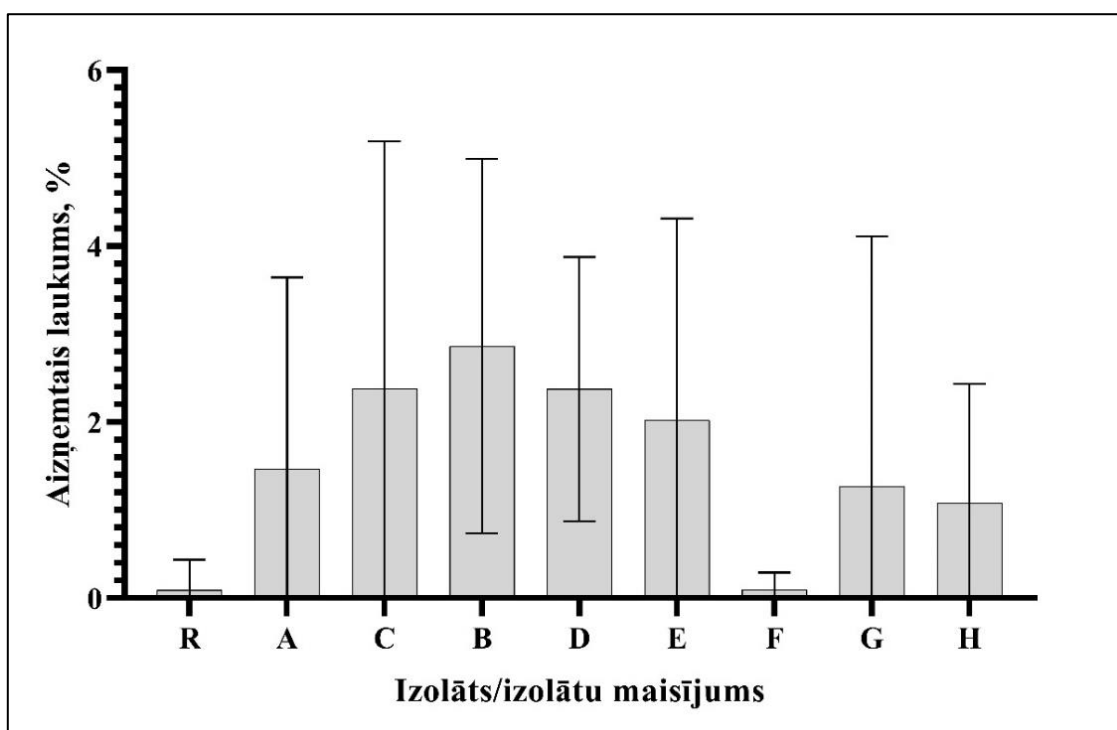
28. attēls. *P. gigantea* izolātu un izolātu maisījumu aizņemtais laukums 3 cm dziļumā, ± standartnovirze.

Figure 28. *P. gigantea* isolate and isolate mixture occupied area in 3 cm depth, ± standard deviation.

P. gigantea izolāts PG 382 (E) 9 cm dziļumā aizņēma būtiski lielāku laukumu ($2,023 \pm 2,292$ %, $p=0,036$) salīdzinājumā ar *Rotstop* ($0,089 \pm 0,346$) (29. attēls, 8. tabula).

Analizējot izolātu maisījumu vidējos relatīvos aizņemtos laukumus (%), secināts, ka statistiski būtiski atšķirīgas vērtības uzrādīja trīs izolātu maisījumi – iepriekš minētie maisījumi C ($2,384 \pm 2,805$ %, $p=0,040$), B ($2,863 \pm 2,805$ %, $p=0,004$), kā arī D ($2,374 \pm 1,500$ %, $p=0,002$), kas, salīdzinot ar *Rotstop*, bija ar lielāku procentuāli aizņemto laukumu (29. attēls, 8. tabula).

Jāatzīmē, ka 9 cm dziļumā bioloģiskais preparāts *Rotstop* uzrādīja mazāku aizņemto (%) laukumu ($0,089 \pm 0,346$ %) (29. attēls, 8. tabula).



29. attēls. *P. gigantea* izolātu un izolātu maisījumu aizņemtais laukums 9 cm dziļumā, ± standartnovirze.

Figure 29. *P. gigantea* isolate and isolate mixture occupied area in 9 cm depth, ± standard deviation.

8. tabula. *P. gigantea* aizņemtais laukums (%) vienā kvadrantā, p-vērtības attiecībā pret *Rotstop*.
Figure 8. *P. gigantea* occupied area (%) in one quadrant, p-values against *Rotstop*.

Izolātu kombinācija Combination of isolates	<i>P. gigantea</i> aizņemtais laukums, % <i>P. gigantea</i> occupied area %			
	3 cm	p-vērtība p-value	9 cm	p-vērtība p-value
R	34,017	-	0,089	-
A	51,909	0,084	1,466	0,096
C	44,409	0,288	2,384	0,040
B	66,453	0,005	2,863	0,004
D	32,115	0,866	2,374	0,002
E	40,673	0,625	2,023	0,036
F	21,066	0,193	0,096	0,958
G	10,100	0,023	1,270	0,250
H	35,476	0,882	1,081	0,063

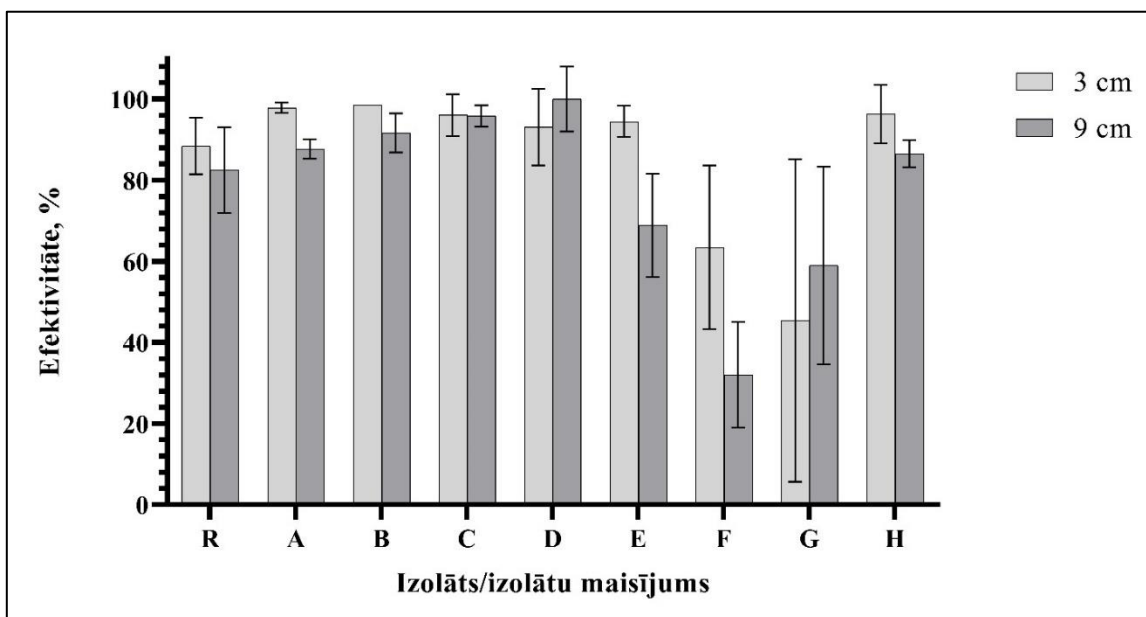
3.2.2. *P. gigantea* efektivitāte

P. gigantea efektivitātes pētījumos visi izolātu un izolātu maisījumi 3 cm un 9 cm dziļumos ir uzrādījuši labus rezultātus, kur 3 cm dziļumā atsevišķu izolātu efektivitāte vidēji bija 81,6%, bet izolātu maisījumu efektivitāte vidēji 89,5%. Savukārt, 9 cm dziļumā attiecīgi 74,5% un 81,2%.

Trīs cm dziļumā būtiski augstāku efektivitāti salīdzinājumā ar *Rotstop* ($88,483 \pm 8,790$ %), novēroti statistiski būtiski labāki rādītāji A izolātam (PG 182) ($97,835 \pm 1,843$ %, $p=0,013$). Savukārt, statistiski būtiski sliktāki rādītāji novēroti G izolātam (PG 334) ($45,435 \pm 32,059$ %, $p=0,004$).

Izolātu maisījumu mērījumos 3 cm dziļumā statistiski būtiski labākos rādītājus novēroja C izolātu maisījumam (PG 182 + PG 382 + PG 334) ($96,060 \pm 3,899$ %, $p=0,009$), B izolātu maisījumam (PG 182 + PG 382) ($98,563 \pm 2,402$, $p=0,009$) un H izolātu maisījumam (PG 382 + PG 408) ($96,308 \pm 18,349$, $p=0,039$), taču statistiski būtiskus sliktākus rādītājus uzrādīja F izolātu maisījums (PG 408 + PG 182) ($63,450 \pm 16,608$ %, $p=0,002$), salīdzinot ar bioloģisko preparātu *Rotstop* (29. attēls, 9. tabula).

Novērots, ka daži izolāti un izolātu maisījumi, 9 cm dziļumā ir uzrādījuši augstāku efektivitāti pret *Heterobasidion* spp. infekciju (D izolātu maisījums un G izolāts), kā 3 cm dziļumā. Taču, salīdzinot ar *Rotstop*, zemākus statistiski būtiskus rezultātus uzrādījis tikai F izolātu maisījums (PG 408 + PG 182) ($32,083 \pm 31,246$ %, $p=0,001$) (30. attēls, 9. tabula).



30. attēls. *P. gigantea* izolātu un izolātu maisījumu efektivitāte (%) pret *Heterobasidion* spp., ± standartnovirze.

Figure 30. *P. gigantea* isolate and isolate mixture efficacy against *Heterobasidion* spp., ± standard deviation.

9. tabula. *P. gigantea* izolātu un izolātu maisījumu efektivitāte (%) pret *Heterobasidion* spp. 3 cm un 9 cm dziļumos, p-vērtība attiecībā pret *Rotstop*.

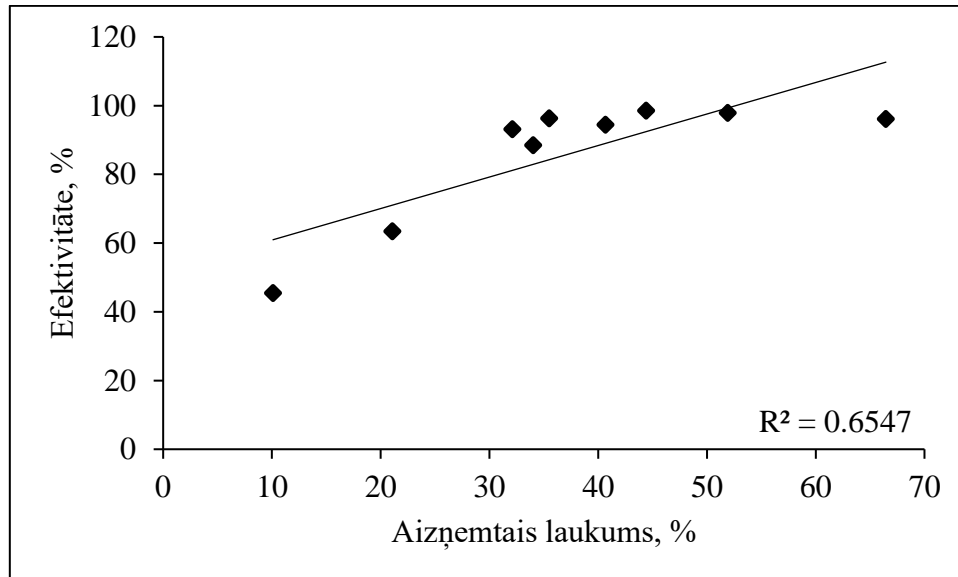
Table 9. *P. gigantea* isolate and isolate mixture efficacy against *Heterobasidion* spp. in 3 cm and 9 cm depths, p-value against *Rotstop*.

Izolātu kombinācija Combination of isolates	Efektivitāte % Efficiency %			
	3 cm	p-vērtība p-value	9 cm	p-vērtība p-value
R	88,483	-	82,511	-
A	97,835	0,013	87,703	0,536
B	98,563	0,009	91,667	0,299
C	96,060	0,038	95,833	0,125
D	93,090	0,281	100,000	0,047
E	94,460	0,157	68,889	0,396
F	63,450	0,002	32,083	0,001
G	45,435	0,004	58,967	0,148
H	96,308	0,039	86,574	0,680

3.3. Korelācija starp *P. gigantea* micēlija attīstību un antagonismu pret *Heterobasidion* spp.

No iegūtajiem *P. gigantea* aizņemtā laukuma (%) 3 cm un 9 cm, augšanas ātruma (mm·dienā¹) un efektivitātes (%) datiem, aprēķinātas korelācijas pie būtiskuma $\alpha = 0,05$ (Liepa, 1974).

Būtiska korelācija konstatēta starp *P. gigantea* aizņemto laukumu 3 cm dziļumā un efektivitāti pret *Heterobasidion* spp ($R = 0,833$, $p=0,005$) (31. attēls).



31. attēls. Korelācija starp *P. gigantea* aizņemto laukumu 3 cm un efektivitāti.
Figure 31. Correlation between *P. gigantea* occupied are in 3 cm depth and efficacy.

Pozitīvas, taču statistiski nebūtiskas korelācijas konstatētas arī starp *P. gigantea* aizņemto laukumu 9 cm dziļumā un efektivitāti ($R = 0,517$, $p=0,154$), kā arī starp *P. gigantea* augšanas ātrumu un efektivitāti ($R = 0,301$, $p=0,431$).

3.4. *P. gigantea* izolātu genotipu noteikšana

Lai noteiktu *P. gigantea* izolātu piederību konkrētam genotipam, izmantota somatiskās saderības metode (Stenlid, 1985.).

Tika salīdzināti Latvijas izcelsmes izolāti, izolātu maisījumi, kā arī *Rotstop* izolāti, kur mērķis ir pierādīt Koha postulātu, ka reizolētais *P. gigantea* izolāts ir tas pats, ar ko bluķītis sākotnēji inokulēts. Genotipa pārbaudei izvēlētas 24 egles ripas no laboratorijas eksperimenta un 15 ripas no eksperimenta lauka apstākļos.

No 24 laboratorijas eksperimenta ripām izdalīti 11 izolāti, kur astoņi uzrādīja saderību ar 3. izolātu (PG 182), bet trīs – 4. izolātu (PG 334). No 15 lauka eksperimenta ripām nav izdevies izdalīt nevienu izolātu (3. pielikums).

4. DISKUSIJA

4.1. *P. gigantea* attīstības dinamika klimata kamerā

Lielās pergamentsēnes *P. gigantea* attīstības dinamika ir būtiska egļu celmu aizsardzībā. Bioloģisko preparātu pareiza, vienmērīga pielietošana ir būtiska efektivitātē pret sakņu piepes *Heterobasidion* spp. infekciju skujkoku mežos (Berglund, 2005). Korekta celmu mehāniskā apstrāde ir būtiska infekcijas ierobežošanai, taču ir arī jāizvērtē piemērots bioloģiskais preparāts. (Sun et al., 2009a).

Lielās pergamentsēnes augšanas ātrums ir nozīmīgs faktors *Heterobasidion* spp. ierobežošanā (Sun et al., 2009a). Izvērtējot *P. gigantea* izolātu augšanas eksperimenta rezultātus, iegūtie dati par izolāta PG 182 augšanas ātrumu nav statistiski būtiski ($p > 0,05$), salīdzinot ar *Rotstop*, taču izolāts ir visātrāk ieaudzis koksne dziļumā. Šis aspekts ir ļoti svarīgs ilgtermiņa koksnes aizsardzībā, aizsargājot egles koksni pret *Heterobasidion* spp. infekciju (Zaļuma, et al., 2020). Tāpat labus, taču statistiski nebūtiskus ($p > 0,05$) rezultātus uzrādījis lielās pergamentsēnes izolāts PG 334. Šie abi izolāti LVMI Silava *P. gigantea* sēņu kolekcijā ir iegūti no priedes koksnes. Pētījumā Somijā pierādīts, ka *P. gigantea* labi attīstās priedes koksne (Korhonen, 2003). Kaut gan lielajai pergamentsēnei dabiskais saimniekorganisms ir priede (Rishbeth, 1951; Tubby et al., 2008; Kenigsvalde et al., 2011), ir nepieciešams atrast piemērotu *P. gigantea* izolātu ar augstu efektivitāti aizsardzībā pret *Heterobasidion* spp. izraisīto sakņu trupi arī eglēm.

Ne tikai atsevišķi izolāti ir uzrādījuši ātrāku ieaugšanas ātrumu kā *Rotstop*. Diviem izolātu maisījumiem – 6. un 9., attiecīgi: PG 182 + PG 382 un PG 408 + PG 182 ir labāki augšanas ātruma rādītāji kā *Rotstop*, taču iegūtie rezultāti nav statistiski būtiski ($p > 0,05$). Līdzīgi rezultāti iegūti arī Korhonen (2003) pētījumā, kur atsevišķa *P. gigantea* izolāta īpašības būtiski neatšķiras, salīdzinot ar *P. gigantea* vairāku izolātu maisījumu. Jāpiemin, ka abi vietējās izcelsmes izolāti satur PG 182 izolātu, kas iespējams individuāli ir attīstījušies visdziļāk egles koksne.

Novērotas arī atšķirības starp diviem eksperimentā izmantotajiem kokiem. Otrajā eglē kopumā augšanas ātruma rezultāti ir bijuši labāki. Iemesls tam ir dažādas individuālā koka īpašības, un līdzīgi rezultāti ir iegūti Sun et al. (2009a) eksperimentā, kur katram izmantotajam kokam tika novērotas būtiskas atšķirības *P. gigantea* attīstībā. Augšanas ātrumu proporcionāli neietekmē fakts vai bluķītis, uz kura ir veikts eksperiments, ir iegūts tuvāk galotnei, vai koka pamatnei (Helmisaari & Siltala, 1989). Sakņu un stumbra trupi izraisošā sakņu piepe *Heterobasidion* spp., savukārt, attīstās labāk tuvāk sakņu kaklam, salīdzinot ar augstāk esošo stumbra daļu (Dimitri, 1971).

Attiecībā uz *P. gigantea* micēlija augšanas ātruma rezultātiem, par vidējo relatīvo aizņemto laukumu gan 3 cm, gan 9 cm dziļumā novērojama līdzīga tendence kā attiecībā uz augšanas ātrumu, kur PG 182 un PG 334 izolāti arī ir aizņēmuši procentuāli lielākus laukumus kā bioloģiskais preparāts *Rotstop*, tomēr arī šeit iegūtās atšķirības nav statistiski būtiskas ($p > 0,05$). Maģistra darbā iegūtie *P. gigantea* augšanas ātruma dati egles koksne ir līdzīgi ar Somijā veiktā pētījuma rezultātiem (Sun et al., 2009a)

Berglund and Rönnberg (2004) pētījumā novērota būtiska korelācija starp *Heterobasidion* spp. koloniju lielumu un patogēna spēju veiksmīgi kolonizēt substrātu, kas ļauj spriest par *P. gigantea* sekmīgāku efektivitāti attiecībā pret *Heterobasidion* spp. – ja *P. gigantea* ir liels vidējais relatīvais laukums, tad tā ātrāk un efektīvāk spēj kolonizēt koksnes daļu, ierobežojot *Heterobasidion* spp. attīstību (Meredith, 1960; Sun et al., 2009; Alksne et al., 2015; Zaļuma, et al., 2020).

4.2. *P. gigantea* suspensiju antagonisms pret *Heterobasidion* spp.

Lauka eksperimentiem raksturīgi ir tas, ka ir augsta iespējamība rezultātiem variēt dažādu ārējo faktoru vai arī pašas koksnes īpašību dēļ. *P. gigantea* attīstību var ietekmēt meteoroloģiskie apstākļi, vides faktori, kā arī pašas koksnes īpašību kopums (Sun et al., 2009a). Maģistra darba lauka apstākļu pētījuma ierīkošanas diena bija apmākusies un nedaudz smidzināja, kas attiecīgi palielināja gaisa mitrumu.

P. gigantea efektivitātes eksperimentā lauka apstākļos novērotas atšķirības starp *P. gigantea* aizņemtajiem laukumiem gan 3 cm, gan 9 cm dziļumos. B maisījums (PG 182 + PG 382) abos dziļumos statistiski būtiski aizņēma lielāku vidējo relatīvo laukumu kā *Rotstop*, kā arī laboratorijas eksperimentos dominējošais izolāts PG 182 arī lauka apstākļos attīstījies visveiksmīgāk, taču ne ar statistiski būtiskām atšķirībām.

Runājot specifiski par vidējā relatīvā aizņemtā laukuma rezultātiem 9 cm dziļumā – jāuzsver fakts, ka bioloģiskais preparāts *Rotstop* ir aizņēmis vismazāko laukumu, un ar statistiski būtiskām atšķirībām C maisījums (PG 182 + PG 382 + PG 334), B maisījums (PG 182 + PG 382), kā arī D maisījums (PG 182 + PG 334) ir aizņēmuši vislielākos laukumus. Līdzīgi kā laboratorijas eksperimenta dominējošajos *P. gigantea* izolātu maisījumos, šo suspensiju sastāvā ir PG 182 izolāts.

Vidējā *P. gigantea* efektivitāte pret *Heterobasidion* analizēta divos dziļumos – 3 cm un 9 cm. Trīs centimetru dziļumā vidējā efektivitāte izolātiem bija 81,6%, bet izolātu maisījumiem – 89,5%, savukārt, 9 cm dziļumā attiecīgi 74,5% un 82,2%. Bioloģiskā preparāta *Rotstop* efektivitāte 3 cm bija 88,5%, un, neskatoties uz to, ka 9 cm dziļumā *Rotstop* ir uzrādījis vismazāko aizņemto laukumu, tā efektivitāte pret *Heterobasidion* spp. infekciju bija 82,5%. Iespējams *Rotstop* mazā aizņemtā laukuma rezultāti, taču optimālā efektivitāte, ir skaidrojama ar to, ka *Rotstop* sastāvā esošais *P. gigantea* izolāts attīstības laikā nav uzrādījis sēnei raksturīgo krāsojumu. Iegūtie rezultāti sakrīt ar LVMI Silava iepriekš iegūtajiem datiem par *P. gigantea* izolātu efektivitāti pret *Heterobasidion* spp. infekciju. Konstatēts, ka *P. gigantea*, neizdalot savu raksturīgo oranžo krāsojumu, spēj būt efektīva, tāpēc šajā gadījumā var runāt par inducēto rezistenci (Brūna et al., 2020). Arī citā pētījumā secināts, ka *P. gigantea* biomasas atšķirības netiek novērotas koksnes paraugos, kuros ir vai nav novērots sēnes raksturīgais oranžais krāsojums (Oliva et al., 2017). Neskatoties uz to, ka *Rotstop* vidējais relatīvais aizņemtais laukums ir mazākais, tas ir aizkavējis *Heterobasidion* spp. infekciju pietiekami efektīvi.

Būtiski pieminēt arī izolātu un izolātu maisījumu efektivitātes atšķirības starp abiem analizētajiem dziļumiem. Divos gadījumos: izolātam PG 334 (G) un izolātu maisījumam PG 182 + PG 334 (D) augstāka efektivitāte pret *Heterobasidion* spp. ir tieši 9 cm dziļumā. Arī šie rezultāti ļauj spriest par to, ka abas suspensijas, tām labāk ierobežojot *Heterobasidion* spp. infekciju dziļumā, varētu veiksmīgāk aizkavēt sakņu piepes sekundāro izplatīšanos, tai caur skujkoku sakņu sistēmu, ar micēliju inficējot tuvumā esošos kokus (Piri, 2003).

Vislabākie efektivitātes rezultāti 3 cm dziļumā konstatēti PG 182 (A) izolātam, kas visos maģistra darba pētījumos līdz šim ir ar ievērojami labiem rādītājiem. PG 182 izolāts un to saturošais izolātu maisījums C (PG 182 + PG 382 + PG 334) ir ar statistiski būtiskām atšķirībām efektivitātē pret *Heterobasidion* spp. infekciju, salīdzinot ar *Rotstop*. Iegūtie rezultāti ir samērā pārsteidzoši, jo *Rotstop* izolāts ir iegūts tieši no egles koksnes, un līdzšinējos pētījumos tas ir uzrādījis labus efektivitātes rādītājus, īpaši egles koksne (Korhonen et al., 1994; Korhonen, 2003). Tomēr arī Zviedrijā veiktā pētījumā bioloģiskais preparāts *Rotstop* izrādījies mazāk efektīvs pret *Heterobasidion* spp. infekciju, salīdzinot ar vietējas izcelsmes izolātiem (Berglund, 2005).

Deviņu cm dziļumā, kā jau iepriekš minēts, vienam izolātam un vienam izolātu maisījumam *P. gigantea* efektivitāte pret *Heterobasidion* spp. infekciju bija augstāka, salīdzinot ar 3 cm efektivitāti. Ar statistiski nebūtiskām atšķirībām pieci no deviņiem izolātiem vai izolātu

maisījumiem ir veiksmīgāk ierobežojuši sakņu piepes infekciju kā bioloģiskais preparāts *Rotstop*. Tas, ka vietējās izcelsmes izolāti ir uzrādījuši labākus rādītājus lielās pergamentsēnes efektivitātē pret sakņu piepes infekciju, bija sagaidāms, jo līdzīgi rezultāti iegūti arī citos dažādos *P. gigantea* pētījumos (Berglund & Rönnberg, 2004; Berglund et al., 2005; Zaļuma, et al., 2020).

Iepriekšējos pētījumos ir pierādīts, ka *P. gigantea* vidējais relatīvais aizņemtais laukums korelē ar *Heterobasidion* spp. attīstības ierobežošanu (Berglund & Rönnberg, 2004), kas arī ticis pierādīts maģistra darbā iegūtajos rezultātos *P. gigantea* 3 cm izaugšanas dziļumā. Statistiski nebūtiskas atšķirības konstatētas arī efektivitātes attiecībā pret *P. gigantea* augšanas ātrumu un aizņemto laukumu 9 cm dziļumā.

4.3. *P. gigantea* izolātu genotipu noteikšana

P. gigantea reizolācija ir veikta gan laboratorijas, gan lauka apstākļu eksperimentiem, taču veiksmīgi izolāti ir izdalīti tikai no laboratorijas eksperimenta, kur no 24 analizētajām egles blūķīšu ripām ir reizolēti 11 izolāti. Lauka apstākļu eksperimentam nav izdevies iegūt tīrkultūru no 15 analizētajām ripām.

Septiņas no 11 laboratorijas apstākļu eksperimenta reizolētajām *P. gigantea* tīrkultūrām ir iegūtas no otrās egles, un pārējās četras iegūtas no pirmās egles. Visveiksmīgāk reizolēti izolāti, kas sākotnēji blūķītī ir iepilināti kā atsevišķa izolāta suspensija, un tīrkultūras iegūšana blūķīšos visveiksmīgāk notikusi 9 cm dziļumā.

Visi reizolētie *P. gigantea* izolāti gan no viena izolāta, gan izolātu maisījuma ir vai nu PG 182, vai PG 334 izolāts, kas liecina par šo izolātu dominanci pret pārējiem. Sēņu konkurence koksne ir aprakstīta dažādos pētījumos, piemēram, Swedjemark un Stenlid (1993) pētījumā aprakstīta *Heterobasidion* spp. starpsugu konkurence vienā celmā. Tas apstiprina to, ka viens izolāts iespējams ar augstākiem vitalitātes rādītājiem, piemēram, augšanas ātrumu, spēj nomākt citu tās pašas sugas sēņu izolātu attīstību.

Atšķirības starp *P. gigantea* izolātiem gan reizolācijā, gan arī efektivitātes un augšanas dinamikas eksperimentiem ir saistītas ar konkrētā izolāta ģenētiskajām īpašībām (Berglund, 2005).

Kopumā ir tikai daži pētījumi par *P. gigantea* dažādu izolātu maisījumiem (Holdenrieder, 1984; Korhonen, 2003). Autores bakalaura darbā, *P. gigantea* izolātu un izolātu maisījumu attīstības dinamikas pētījumos, iegūti līdzīgi rezultāti par viena lielās pergamentsēnes izolāta dominanci par pārējiem suspensijās esošajiem *P. gigantea* izolātiem. Turpmākajos pētījumos

nepieciešams analizēt vai iegūtā *P. gigantea* izolāta izcelsme (priede vai egle) ir būtiska vairāku izolātu maisījumu attīstībā un efektivitātē.

SECINĀJUMI

1. *Phlebiopsis gigantea* izolāti PG 182 un PG 334 trīs cm dziļumā un *Phlebiopsis gigantea* izolāts PG 182 deviņu cm dziļumā uzrāda augstākas aizņemtā laukuma vērtības, salīdzinājumā ar izolātu maisījumiem.
2. *Phlebiopsis gigantea* dažādu izolātu maisījumi lauka apstākļos uzrāda sliktākus vidējā aizņemtā laukuma rādītājus, salīdzinot ar laboratorijas eksperimentiem.
3. *Phlebiopsis gigantea* izolātu maisījums, kuru sastāvā ir PG 182 un PG 334, kā arī *Phlebiopsis gigantea* izolāts PG 334, egles koksnē 9 cm dziļumā nodrošina lielāku efektivitāti pret *Heterobasidion* spp. infekciju, salīdzinājumā ar 3 cm dziļumu.
4. Egles koksnē trīs cm dziļumā konstatēta būtiska korelācija ($R = 0,83$) starp *Phlebiopsis gigantea* aizņemto laukumu un efektivitāti pret *Heterobasidion* spp.
5. Latvijas izcelsmes *Phlebiopsis gigantea* izolāts PG 182 egles koksnē uzrāda lielāku augšanas ātrumu, aizņemto laukumu un efektivitāti pret *Heterobasidion* spp. infekciju, salīdzinot ar Somijas izcelsmes bioloģisko preparātu *Rotstop*.
6. Izolātu maisījumi, kuru sastāvā ir Latvijas izcelsmes *Phlebiopsis gigantea* izolāts PG 182, uzrāda lielāku augšanas ātrumu, aizņemto laukumu un efektivitāti pret *Heterobasidion* spp. infekciju, salīdzinot ar Somijas izcelsmes bioloģisko preparātu *Rotstop*.

PATEICĪBAS

Izsaku vislielāko pateicību bakalaura darba vadītājiem Dr. silv. Tālim Gaitniekam un Dr. biol., asoc. prof. Vizmai Nikolajevai par darba vadīšanu, organizēšanu sniegtajiem ieteikumiem un palīdzību maģistra darba veikšanā.

Pateicos Magdalēnai Grosbergai un Laumai Silbaumai par palīdzību eksperimenta ierīkošanā un atbalstu darba veikšanā, kā arī pārējam LVMI Silava kolektīvam par palīdzību maģistra darba tapšanā.

Maģistra darbs izstrādāts LVMI Silava Meža mikoloģijas un fitopatoloģijas nodaļā saskaņā ar projektu "Bioloģiskā preparāta izstrāde sakņu trupes izraisīto zaudējumu samazināšanai skuju koku audzēs", īstenojot "Meža nozares kompetences centra" un Latvijas centrālo finanšu aģentūras projektu Nr. 1.2.1.1/18/A/004, kas veikts ar Eiropas Reģionālās attīstības fonda atbalstu.

LITERATŪRAS SARAKSTS

- Alksne, L., Nikolajeva, V., Petriņa, Z., Eze, D., & Gaitnieks, T. (2015). Influence of *Trichoderma* isolates and *Phlebiopsis gigantea* on the growth of *Heterobasidion parviporum* and wood decay of Norway spruce in controlled conditions. *Environmental and Experimental Biology*, 13, 159–168. http://eeb.lu.lv/EEB/201512/EEB_13_Alksne.pdf
- Arhipova, N., Gaitnieks, T., Donis, J., Stenlid, J., & Vasaitis, R. (2011). Butt rot incidence, causal fungi, and related yield loss in *Picea abies* stands of Latvia. *Canadian Journal of Forest Research*, 41(12), 2337–2345. <https://doi.org/10.1139/x11-141>
- Asiegbu, F. O., Adomas, A., & Stenlid, J. (2005). Conifer root and butt rot caused by *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. s.l. *Molecular Plant Pathology*, 6(4), 395–409. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00295.x>
- Berglund, M. (2005). Infection and growth of *Heterobasidion* spp. in *Picea Abies*: Control by *Phlebiopsis gigantea* stump treatment [Doctoral]. Swedish University of Agricultural Sciences.
- Berglund, M., & Rönnerberg, J. (2004). Effectiveness of treatment of Norway spruce stumps with *Phlebiopsis gigantea* at different rates of coverage for the control of *Heterobasidion*. *Forest Pathology*, 34(4), 233–243. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2004.00363.x>
- Brūna, L., Kļaviņa, D., Korhonen, K., Zaļuma, A., Burņeviča, N., & Gaitnieks, T. (2020). Effect of soil properties on the spread of heterobasidion root rot. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, Section B: Natural, Exact, and Applied Sciences*, 73(6), 466–471. <https://doi.org/10.2478/prolas-2019-0072>
- Brūna, L., Kļaviņa, D., Zaļuma, A., Kenigvalde, K., Burņeviča, N., Nikolajeva, V., Gaitnieks, T., & Piri, T. (2020). Efficacy of *phlebiopsis gigantea* against heterobasidion conidiospore and basidiospore infection in spruce wood. *IForest*, 13(5), 369–375. <https://doi.org/10.3832/ifor3279-013>
- Brūna, L., Lione, G., Kenigvalde, K., Burņeviča, N., Zaļuma, A., Klaviņa, D., Gaitnieks, T., & Gonthier, P. (2021). Inferences on the susceptibility of wood of different tree species to

- heterobasidion annosum sensu lato primary infections and on the range of pathogen spores dispersal. *Forests*, 12(7), 1–15. <https://doi.org/10.3390/f12070854>
- Burņeviča, N., Kļaviņa, D., Lione, G. G., & Pellicciaro, M. (2022). In vitro screening of Latvian isolates of *Bjerkandera adusta* and *Sistotrema brinkmannii* as potential biocontrol agents against *Heterobasidion* root and butt rots. *Baltic Forestry* 28(1), 637.
- Cleary, M. R., Arhipova, N., Morrison, D. J., Thomsen, I. M., Sturrock, R. N., Vasaitis, R., Gaitnieks, T., & Stenlid, J. (2013). Stump removal to control root disease in Canada and Scandinavia: A synthesis of results from long-term trials. *Forest Ecology and Management*, 290, 5–14. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2012.05.040>
- Gaitnieks, T. (2014). *Phlebiopsis gigantea* (Fr.) Jül. nozīme *Heterobasidion annosum* S.L. izraisītās sakņu trapes izplatības ierobežošanā. J. Jansons, & I. Konstantinova (Eds.), Četri mežzinātņu motīvi (lpp. 107-164). Salaspils: DAUGAUPILS UNIVERSITĀTES AKADĒMISKAIS APGĀDS "SAULE".
- Garbelotto, M., & Gonthier, P. (2013). Biology, epidemiology, and control of *Heterobasidion* species worldwide. *Annual Review of Phytopathology*, 51, 39–59. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102225>
- Gžibovska, Z. (2016). Evaluation of *Phlebiopsis gigantea* and *Pseudomonas* spp. for biocontrol of *Heterobasidion* spp. in Norway spruce. Swedish University of Agricultural Sciences.
- Helmisaari, H. S., & Siltala, T. (1989). Variation in nutrient concentrations of *Pinus sylvestris* stems. *Scandinavian Journal of Forest Research* 4, 443-451.
- Hodges, C. S. (1969). Modes of Infection and Spread of *Fomes Annosus*. *Annual Review of Phytopathology*, 7(1), 247–266. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.07.090169.001335>
- Holdenrieder, O. (1984). Untersuchungen zur biologischen Bekämpfung von *Heterobasidion annosum* an Fichte (*Picea abies*) mit antagonistischen Pilzen. *European Journal of Forest Pathology*, 14(1983), 137–153.
- Holdenrieder, O., & Greig, B. (1998). Biological methods of control. In S. Woodward, J. Stenlid, R. Karjalainen, & A. Hüttermann (Eds.). *Heterobasidion annosum: Biology, Ecology, Impact and Control* (lpp. 235-258). Wallingford, UK: CAB International.

- Käärik, A., & Rennerfelt, E. (1957). Investigations on the fungal flora of spruce and pine stumps (47 (7): 15 izd.). Statens Skogsforskningsinstitut.
- Kallio, T. (1970). Aerial distribution of the root-rot fungus *Fomes annosus* (Fr.) Cooke in Finland. *Acta Forestalia Fennica*, 107, 5–52.
- Kallio, T., & Hallaksela, A.-M. (1979). Biological control of *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. (*Fomes annosus*) in Finland. *European Journal of Forest Pathology* 9(5), 298.-308.
- Kenigšvalde, K., Donis, J., Korhonen, K., & Gaitnieks, T. (2011). *Phlebiopsis gigantea* skujkoku celmu bioloģiskajā aizsardzībā pret *Heterobasidion annosum* s.l. izraisīto sakņu trupi – literatūras apskats. *Mežzinātne*, 23(56), 25–40.
- Kļaviņa, D., Gaitnieks, T., & Menkis, A. (2013). Survival, growth and ectomycorrhizal community development of container- and bare-root grown *Pinus sylvestris* and *Picea abies* seedlings outplanted on a forest clear-cut. *Baltic Forestry*, 19(1), 39–49.
- Klavina, D. *et al.* (2016) “The ectomycorrhizal community of conifer stands on peat soils 12 years after fertilization with wood ash,” *Mycorrhiza*, 26(2), pp. 153–160. doi:10.1007/s00572-015-0655-2)
- Korhonen, K. (2003). Simulated stump treatment experiments for monitoring the efficacy of *Phlebiopsis gigantea* against *Heterobasidion*. Baishideng Publishing Group Inc., 206-210.
- Kuhlman, E. G., & Hendrix, F. F. (1964.). Infection, growth rate, and competitive ability of *Fomes annosus* in inoculated *Pinus echinata* stumps. *Phytopathology* 54(5), 556-561.
- Liepa, I. (1974). *Biometrija*. Rīga: Zvaigzne, 336.
- Negi, S., Prasher, I. B., & Kumar, R. (2017). Nutritional characteristics and physiological studies on the growth and development of *Phlebiopsis gigantea*. *Current Botany*, 8, 92–96. <https://doi.org/10.19071/cb.2017.v8.3180>
- Nicolotti, G., & Gonthier, P. (2005). Stump treatment against *Heterobasidion* with *Phlebiopsis gigantea* and some chemicals in *Picea abies* stands in the western Alps. *Forest Pathology*, 35(5), 365–374. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2005.00419.x>
- Pettersson, M. (2013). Stump treatment with the root rot antagonist *Phlebiopsis gigantea*: - sensitivity of *P. gigantea* spores to high pressure stress; - reduced water consumption for

- stump treatment. Second cycle, A2E. Alnarp: SLU, Southern Swedish Forest Research Centre.
- Piri, T., & Korhonen, K. (2001). Infection of advance regeneration of Norway spruce by *Heterobasidion parviporum*. *Canadian Journal of Forest Research*, 31(6), 937–942. <https://doi.org/10.1139/cjfr-31-6-937>
- Piri, T. (2003). Early development of root rot in young Norway spruce planted on sites infested by *Heterobasidion* in southern Finland. *Canadian Journal of Forest Research*, 33(4), 604–611. <https://doi.org/10.1139/x02-200>
- Prasher, I. B. (2015). *Wood-rotting non-gilled Agaricomycetes of Himalayas*. Springer.
- Pratt, J. E. (2000). Effect of inoculum density and borate concentration in a stump treatment trial against *Heterobasidion annosum*. *Forest Pathology*, 30, 277–283.
- Rönnberg, J., Sidorov, E., & Petrylaite, E. (2006). Efficacy of different concentrations of Rotstop® and Rotstop®S and imperfect coverage of Rotstop®S against *Heterobasidion* spp. spore infections on Norway spruce stumps. *Forest Pathology*, 36(6), 422–433. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2006.00476.x>
- Redfern, D. B., & Stenlid, J. (1998). Spore Dispersal and Infection. – In: Woodward, S., J. Stenlid, K. Karjalainen, A. Hüttermann (ed.) *Heterobasidion annosum: biology, ecology, impact and control*. Wallingford: CAB International, 109.-116.
- Rosnev, B. (1976). The dynamics of sporulation of *Fomes annosus* (fr.) Cke in Bulgaria. *Gorskostopanska Nauka* 13, 70. - 76.
- Stenlid, J. (1985). Population structure of *Heterobasidion annosum* as determined by somatic incompatibility, sexual incompatibility, and isoenzyme patterns (63: 2268-2273 izd.). Uppsala, Zviedrija: Department of Forest Mycology and Pathology, Swedish University of Agricultural Sciences.
- Sun, H., Korhonen, K., Hantula, J., & Kasanen, R. (2009). Variation in properties of *Phlebiopsis gigantea* related to biocontrol against infection by *Heterobasidion* spp. in Norway spruce stumps. *Forest Pathology*, 39(2), 133–144. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2008.00574.x>

- Swedjemark, G., & Stenlid, J. (1993). Population dynamics of the root rot fungus *Heterobasidion annosum* following thinning of *Picea abies*. *Oikos*, 66(2), 247–254.
<https://doi.org/10.2307/3544811>
- Thor, M., & Stenlid, J. (2005). *Heterobasidion annosum* infection of *Picea abies* following manual or mechanized stump treatment. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 20(2), 154–164. <https://doi.org/10.1080/02827580510008338>
- Vainio, E. J. (2008). Ecological impacts of *Phlebiopsis gigantea* biocontrol treatment against *Heterobasidion* spp. as revealed by fungal community profiling and population analyses [University of Helsinki]. <http://www.doria.fi/handle/10024/37405>
- Vainio, E. J., Lipponen, K., & Hantula, J. (2001). Persistence of a biocontrol strain of *Phlebiopsis gigantea* in conifer stumps and its effects on within-species genetic diversity. *Forest Pathology*, 31(5), 285–295. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0329.2001.00249.x>
- Vasiliauskas, R., Larsson, E., Larsson, K. H., & Stenlid, J. (2005). Persistence and long-term impact of Rotstop biological control agent on mycodiversity in *Picea abies* stumps. *Biological Control*, 32(2), 295–304. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2004.10.008>
- Vollbrecht, G., & Agestam, E. (1995). Identifying butt rotted Norway spruce trees from external signs. *Forest and Landscape Reserach*, 1, 241–254.
- Zaļuma, A., Kenigšvalde, K., Brūna, L., Kļaviņa, D., Bruņeviča, N., Stenlid, J., . . . Gaitnieks, T. (2020). Natural infection and colonization of pre-commercially cut stumps of *Picea abies* and *Pinus sylvestris* by *Heterobasidion* rot and its biocontrol fungus *Phlebiopsis gigantea*. *Biological Control*, 143.
- Василяускас, А. П. (1989). Корневая губка и устойчивость экосистем хвойных лесов. Вильнюс: Мокслас., 174.

PIELIKUMI

1. pielikums

Darbā izmantotās iekārtas, materiāli un reaģenti.
Laboratory equipment, materials and reagents used in experiments.

Reaģenti Reagents	Ražotājs Manufacturer	
Iesala ekstrakts (ME – Malt Extract)	Biolife, Itālija	
Mikrobioloģiskais agars (Agar Bios Special LL)	Biolife, Itālija	
Glikoze	Penta	
NaNO ₃	Enola	
MgSO ₄	Enola	
KH ₂ PO ₄	Enola	
Etanols	SIA Farma Balt	
Dejonizēts ūdens		
Ūdenī šķīstoša krāsviela		
Materiāli Materials	Ražotājs Manufacturer	
Petri plates (92 x 16 mm)	LP Italiana SpA, Itālija	
Permanentais marķieris		
Mērcilindrs (1L)		
Spirta lampiņa		
Kolbas (1L)		
Metāla cilindrs (ø 6 mm)		
Preparējamā adata		
Birste		
Caurspīdīgas plēves		
Plastmasas pudele 500 mL		
Polietilēna maisiņi		
Urbja uzgalis (ø 2 cm)		
Pudele ar smidzināmu uzgali		
Papīra lapas		
Iekārtas Equipment	Modelis un parametri Models and parameters	Ražotājs Manufacturer
Autoklāvs	Systec VX-100	Systec, Vācija
Automātiskā pipete	Eppendorf Research (100-1000 µl)	Eppendorf, Vācija
Laboratorijas bokss	KH-135 SL	Kojair, Somija
Audzēšanas kamera	KBWF (E6) 720	Binder, Vācija
Fotoaparāts	Sony DSC-HX7V	Sony, Japāna
Stereomikroskops	Leica MZ 16 (planapo 1.0 x)	Leica, Vācija
Stereomikroskopa apgaismojums	KL2500 LCD	Schott, Vācija
Mikroskops	DM 4000B	Leica Microsystems GmbH, Vācija
Planimetrs	PLANIX 10S	Tamaya Technics Inc., Japāna
Svari	Precisa XB 620C (e=0.1g, d=0.01g)	Precisa, Šveice
Ūdens dejonizātors	Crystal 5	Adrona
Triecienu urbja mašīna	BDCHD18KB 18V 2 x 1,5 Ah	Black & Decker, ASV
Motorzāģis	Husqvarna 236	Husqvarna, Zviedrija

2. pielikums.

Pieejamie Latvijas izcelsmes *Phlebiopsis gigantea* izolāti eksperimentam.
Accessible Latvian origin *Phlebiopsis gigantea* isolates for the experiment.

PG izolāts	izolēts no egles vai priedes	Laboratorijas antag P grupa, pārauguma zonas vidējais pieaugums, mm/dienā	Laboratorijas antag S grupa, pārauguma zonas vidējais pieaugums, mm/dienā	Augšanas ātrums platē, mm/dienā	Sporu daudz., miljonos vienā Petri platē	Augšanas ātrums egles koksņē	Augšanas ātrums priedes koksņē	Laukums egles koksņē	Laukums priedes koksņē	Piezīmes
52	E	1.2	1.3	6.7	95.4	2.53		7.93		nav audzēts priedes koksņē
119	E	1.0	6.0	5.9	36.2	1.95	3.43	7.05	7.57	
286	E	0.9	0.8	6.4	125.5	2.17	4.40	7.87	7.58	
382	E	2.5	0.8	7.1	22.5	1.63	3.44	1.11	6.77	
422	E	0.9	1.0	5.7	17.0	0.40	2.60	0.43	5.36	Būtiski ātrāk auga egles koksņē MNKC 2018
137	P	1.2	1.0	6.1	36.7	1.40	3.43	2.54	5.93	
175	P	1.2	0.9	5.2	84.7	1.62	3.33	2.82	7.45	
182	P	1.4	0.9	5.0	144.1	1.99	3.47	9.76	6.61	
192	P	0.7	0.8	5.0	63.6	1.61	3.32	4.36	8.92	
220	P	1.2	1.1	5.7	37.2	1.69	3.31	4.39	7.67	
331	P	0.8	0.5	5.0	71.3	2.07	4.03	3.02	6.5	
334	P	0.6	0.5	4.2	167.3	1.98	4.27	6.66	8.79	
408	P	0.8	0.6	6.9	176.4	1.59	3.44	1.85	6.55	
414	P	0.2	0.4	5.8	4.4	0.85	3.36	0.35	4.44	
420	P	0.2	0.4	3.7	99.7	0.90	2.45	0.84	3.73	
Rotst.		0.9	1.0	6.2	49.7	1.38	3.52	4.61	8.09	Vidējais no 2012 - 2018 g. datiem

3. pielikums.
Izolātu krustošanas rezultāti.
Results of isolate breeding.

Koka apzīmējums	Koka suga	Bluķa Nr.	Bedrītes Nr.	Dziļums, cm	Reizolētā PG
1	E	8	8	6	4
1	E	8	3	6	3
1	E	11	7	9	3
1	E	15	9	9	3
2	E	4	9	9	3
2	E	4	4	9	4
2	E	5	3	9	3
2	E	5	3	9	3
2	E	7	9	15	3
2	E	7	4	12	4
2	E	13	3	9	3

Maģistra darbs „LIELĀS PERGAMENTSĒNES PHLEBIOPSIS GIGANTEA (FR.) JŪL. IZOLĀTU ATTĪSTĪBA PARASTĀS EGLES PICEA ABIES (L.) KOKSNĒ” izstrādāts LU Bioloģijas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: Arta Bēča *paraksts* 26.05.2022.

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītāji: Dr. silv. Tālis Gaitnieks *paraksts* 26.05.2022.

Dr.biol., asoc. prof. Vizma Nikolajeva *paraksts* 26.05.2022.

Recenzents: *paraksts* Dr.biol. Nils Rostoks

Darbs iesniegts LU Bioloģijas fakultātē 26.05.2022.

Lietvede: *paraksts*

Darbs aizstāvēts Bioloģijas maģistra gala pārbaudījuma komisijas sēdē

prot. Nr. , vērtējums

Komisijas sekretārs/e: