

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE
MIKROBIOLOĢIJAS UN BIOTEHNOLOĢIJAS KATEDRA

***CORINECTRIA FUCKELIANA* ATTĪSTĪBA PARASTĀS
EGLES *PICEA ABIES* KOKSNĒ**

MAĢISTRA DARBS

Autors: Gustavs Daniels Loris
Stud. apl. Nr. g118018
Darba vadītāja: Dr. biol. Dārta Kļaviņa

RĪGA 2023

Saturs

Kopsavilkums	4
Abstract	4
Ievads	5
1. Literatūras apskats	7
1.1. Endofīti augos	7
1.1.1. Endofītu izplatība, izplatīšanās veidi un augšanas īpatnības	7
1.1.2. Auga aizsardzības reakcijas	8
1.1.3. Protektīvais mutuālisms un endofīti mikrobiālajās sabiedrībās	9
1.1.4. Ksilotropie un <i>P. abies</i> stumbra koksnes endofīti	10
1.2. <i>Corinectria fuckeliana</i> dzīvesveids un patoģenēze	11
1.3. Parastā egļu Latvijā un Eiropā, tās nozīmīgums un patogēni	13
2. Materiāli un metodes	15
2.1. Parauglaukuma informācija	15
2.2. Egļu inokulēšana un parauglaukuma apsekošana	15
2.3. Koku un mizas brūču mērījumi	16
2.4. Paraugu ievākšana	17
2.5. Mikrobioloģiskā sēnes izdalīšana no serdeņiem un koksnes fragmentiem	19
2.6. DNS izdalīšana no koksnes	19
2.7. Izdalītās DNS sekvencēšana	20
2.8. Datu apstrāde R programmā un aprakstošā statistika	21
2.9. Infekcijas izpausmes atvasinātie lielumi	21
2.10. Induktīvās statistikas analīze	22
2.11. Bioinformātikās analīzes	24
2.11.1. OTU un to taksonomiskās piederības un funkcionālo īpašību datu apstrāde ...	24
2.11.2. Mikrobiālās ekoloģijas analīzes	25
3. Rezultāti	26
3.1. Vispārējais audzes raksturojums un egļu vitalitāte	26
3.2. Mizas brūču izmēri un koksnes vertikālās iekrāsošanās distances	26
3.3. Micēlija saglabāšanās koksnē un DNS izdalīšanas	29
3.3.1. Mikroskopisko sēņu izolāti no serdeņiem	30
3.4. Mizas brūces modeļi	31
3.5. Brūču attīstības dinamika	32
3.6. Bioinformātikās analīzes	34

3.6.1. Taksonomisko nodalījumu sastāvs apstrādes grupās	34
3.6.2. Izplatītākās ģintis apstrādes grupās	36
3.6.3. Apstrādes grupu taksonu trofiskās funkcijas	40
3.6.4. Alfa daudzveidība apstrādes grupās	41
3.6.5. Beta daudzveidība apstrādes grupās	42
4. Diskusija	44
4.1. Egļu vitalitāte un mizas brūces	44
4.2. Brūču attīstības dinamika	45
4.3. Brūču izmēra modeļi	46
4.4. Vertikālā izplatība un micēlija saglabāšanās koksnē	47
4.5. Pārējās no <i>C. fuckeliana</i> infekcijas zonām izdalītās sēnes	48
4.6. DNS izdalīšana	49
4.7. Mikrobiālā ekoloģija	50
4.7.1. ITS un klāsterēšana	50
4.7.2. Taksonomiskais sastāvs	50
4.7.3. Brūces sēņu trofiskie veidi un alfa un beta daudzveidības	55
4.7.4. Mikrobiālās ekoloģijas sadaļas kopsavilkums	57
5. Secinājumi	59
Bibliogrāfija	60

Kopsavilkums

C. fuckeliana ir *P. abies* koksni apdzīvojošs endofīts, kam piemīt spēja radīt stumbra vēzi. Pēdējās desmitgadēs daudzviet pasaulē biežāk novērotas *C. fuckeliana* radītas kokaugu slimību epidēmijas. Šajā pētījumā ar 3 *C. fuckeliana* izolātiem tika inokulētas 60 *P. abies*, lai novērtētu *C. fuckeliana* patogenitāti *in vivo* egļu audzē; analizētu mizas brūču attīstības dinamiku; novērtētu *C. fuckeliana* izraisīto iekrāsojumu egles stumbrā un izvērtētu egles kolonizējošo sēņu ietekmi uz *C. fuckeliana* attīstību. Sēņu sabiedrības tika analizētas mikrobioloģiski un bioinformātiski ar DNS metabarkodingu, izmantojot ITS2 rDNS reģionu. Patogēnākais izolāts bija Suenenjoki, jo radīja lielākās brūces un stiprāko krāsojumu. Visiem izolātiem straujākā brūču augšana notika otrajā gadā. T3N izolātā bija vismazākais krāsojums un tanī biežāk novērota *Ascocoryne*.

***C. fuckeliana*; *P. abies*; stumbra vēzis; metabarkodings; patogenitāte; brūces dinamika; koksnes iekrāsojums**

Abstract

C. fuckeliana is an endophyte of *P. abies* wood, which causes cankers. In the last decades there have been increasing disease outbreaks caused by *C. fuckeliana* globally. In this study 60 *P. abies* were inoculated with 3 *C. fuckeliana* isolates to assess the pathogenicity of *C. fuckeliana* in a spruce stand *in vivo*; analyze the dynamics of stem wound development; assess coloration of wood caused by *C. fuckeliana* and to analyze the effect of other fungi that colonize spruce wood on *C. fuckeliana* development. Fungal communities were assessed microbiologically and bioinformatically with metabarcoding, using ITS2. The most pathogenic isolate was Suenenjoki, due to its larger wounds and stronger coloration. Fastest wound growth was observed in the second year. T3N isolate had the least coloration and it was more often associated with *Ascocoryne*.

***C. fuckeliana*; *P. abies*; stem canker; metabarcoding; pathogenicity; wound dynamics; wood coloration**

Ievads

Viena no būtiskajām klimata pārmaiņu šķautnēm ir temperatūras un ekstrēmu klimatisko epizožu biežuma pieaugums, kas izraisa nelabvēlīgus apstākļus vairumam kokaugu sugu un padara tos uzņēmīgākus pret dažādiem patogēniem (Pautasso et al., 2012). Turpretī kokaugu slimību izraisošajām sēnēm to ātrākās pielāgošanās dēļ prognozētas vairākas priekšrocības: ilgāka augšanas sezona, novājināts saimniekaugs un atvieglota izplatīšanās ar vēja un ūdens palīdzību, kas kopā paaugstina iespējamību epidēmijām (Sturrock et al., 2011). Daudzas ekonomiski nozīmīgas skuju koku sugas ir pakļautas paaugstinātam patogēnēzes riskam (Kubiak et al., 2017) It īpaši Ziemeļu mērenās un boreālās zonas dominējošajai skuju koku sugai parastajai egļu *Picea abies*, kurai raksturīga zema noturība pret biotiskajiem stresoriem, prognozēta biežāka un pastiprināta slimības incidence (Marčiulynas et al., 2022).

P. abies apdraud dažādi sēņu patogēni, pie biežākajiem pieskaitot tādas ģintis kā *Heterobasidion* un *Armillaria* (Vasiliauskas & Stenlid, 1998; Garbelotto & Gonthier, 2013; Kubiak et al., 2017), taču zināmu uzmanību akadēmiskajās un saimnieciskajās aprindās raisījusi endofītiskā askomicēte *Corinectria fuckeliana*, kuras ekoloģiskā loma *P. abies* joprojām nav pavisam skaidra. Ir zināms, ka tā spēj izraisīt stumbra vēzi un ir konstatēta dažādu priežu dzimtas koku brūcēs, taču novērota arī neskartā, vizuāli neietekmētā koksne (Roll-Hansen F & Roll-Hansen Helga, 1979; Huse, 1981; Ramsfield et al., 2013; Burņeviča et al., 2016). Kaut arī izsenis pazīstama, tieši pēdējās desmitgadēs reģistrēti pastiprināti tās izraisītu patogēnēzes uzliesmojumi daudzviet pasaulē, tostarp uz *P. abies* Zviedrijā un Somijā (Talgø et al., 2012; Pettersson et al., 2018; Uimari et al., 2018), *Pinus radiata* Jaunzēlandē un Čīlē (Dick & Crane, 2009; Hopkins et al., 2012; González et al., 2020), *Abies concolor* ASV (Schultz & Parmeter, 1990). Lai arī zināma *C. fuckeliana* raksturīgā simptomātika – mizas brūču veidošanās, galotņu hloroze un retākos gadījumos arī koku bojāeja, nav apzināti tās patogēnēzi izraisīšie faktori, kā arī maz ir zināms par tās veidotajām koksni apdzīvojošo sēņu sabiedrībām. Turklāt pavisam maz pētīta ir atsevišķu šīs sēnes izolātu patogēnēzes atšķirība *in vivo*.

Šajā maģistra darba pētījumā ar trim dažādiem *C. fuckeliana* izolātiem tika inokulētas 60 egles, no kurām pēc 10 gadiem paņemti izveidojušos brūču koksnes paraugi mikrobioloģiskai un DNS metabarkodina analīzei. Paralēli notika brūču dimensiju uzmērīšana pētījuma pirmajos trīs gados un tā beigās brūču attīstības dinamikas noteikšanai, kā arī novērtēta *C. fuckeliana* micēlija saglabāšanās koksnes audos brūces zonā un dažādos attālumos no tās. Pētījumā plānots papildināt zināšanas par *C. fuckeliana* patogenitāti *P. abies*, kā arī viest skaidrību par ar to saistītajām koksni apdzīvojošo sēņu sabiedrībām. Šī pētījuma novitāte ir tiešā veidā no koksnes audiem veiktā koksnes sēņu DNS metabarkodina analīze *C. fuckeliana* veidoto brūču sēņu sabiedrībām, kas nav tikusi veikta līdz šim.

Pētījuma jautājums: kā atšķiras dažādu *C. fuckeliana* izolātu patogenitāte *P. abies* brūcēs, un kāda ietekme uz *C. fuckeliana* ir citām koksni apdzīvojošajām sēnēm?

Pētījuma mērķis: novērtēt endofīta *Corinectria fuckeliana* patogenitāti un analizēt *C. fuckeliana* mijiedarbību ar citām egles koksni kolonizējošām sēnēm.

Pētījuma uzdevumi:

- 1) noskaidrot atšķirīgu *C. fuckeliana* izolātu patogenitāti *in vivo* egļu audzē;
- 2) analizēt mizas brūču attīstības dinamiku pēc *C. fuckeliana* infekcijas
- 3) novērtēt *C. fuckeliana* izraisīto koksnes iekrāsojumu egles stumbrā;
- 4) izvērtēt egles koksni kolonizējošo sēņu ietekmi uz *C. fuckeliana* attīstību.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Endofīti augos

Endofīti ir mikroorganismi, kuras izraisa asimptomātisku auga veselīgu iekšējo audu kolonizāciju (Stone & Petrini, 1997; Stone et al., 2004; Sieber, 2007). Biežāk minētais endofītu veids ir sēnes, taču citi autori pie endofītiem pieskaita arī augu iekšējo vidi apdzīvojošās baktērijas, arhejus un viensūņus (Hardoim et al., 2015). Šī maģistra darba ietvaros un pētījuma analīzes specifikas labad par endofītiem tiks uzskatīti sēņu valstij piederīgie pārstāvji.

1.1.1. Endofītu izplatība, izplatīšanās veidi un augšanas īpatnības

Endofīti ir ļoti izplatīti augu sabiedrotie organismi. To kolonizācija ir novērota ļoti daudzās sauszemes augu sugās no primitīvākajiem sporaugiem līdz segsēkļiem visdažādākajās biomās un vides apstākļos (Stone et al., 2004), kā arī pilnīgi visos veselajos augu audos (Sieber, 2007). Tomēr ir neskaidra robeža starp endofītiem un patogēniem ar latentu, apturētu augšanu; daudzas endofītiskās sēnes tiek uzskatītas par vājiem vai sekundārajiem patogēniem, un to parādīšanās gan veselos, gan slimos audos liecina par apgrūtināto nošķiršanu starp endofītiem, fakultatīviem patogēniem un latentiem patogēniem (Stone & Petrini, 1997; Rodriguez et al., 2009).

Augi endofītus var iegūt horizontālā vai vertikālā infekcijas ceļā, iegūstot tos no apkārtējās vides vai nodot no paaudzes paaudzē ar sēklām vai veģetatīvajām auga daļām (Mishra et al., 2021). Tāpat endofīti var augu kolonizēt sistēmiski, kā tas ir raksturīgi graudzālēm, turklāt nereti tikai ar vienu vai pāris sugām, vai arī lokalizēti, nesistēmiski auga daļās, veidojot specifiskus mikrobiomus atkarībā no auga audu veida (Sieber, 2007; Kūngas et al., 2020; Mishra et al., 2021). Nesistēmisko endofītu un saimniekaugu sasaiste nereti ir īslaicīga un sezonāla, un šādu endofītu daudzveidība ir atkarīga no saimniekauga fizioloģiskajiem parametriem un vides apstākļiem (Botella & Diez, 2011 cit. pēc Mishra et al., 2021).

Visus endofītus raksturo periodiski un ilglaicīgi pārtraukta, epizodiska augšana augu audos. Šo pārejoši apturētās augšanas posmu dēvē par latentu jeb apklusinātu (angl. *quiescent*) fāzi (Williamson, 1994 cit. pēc Stone et al., 2004). Ir zināms, ka patogēnās sēnes arī spēj pāriet šādā asimptomātiskā, latentā, zemākas aktivitātes infekcijas izpausmē, turklāt patogēno sēņu celmi, kuriem ir samazināta virulence, var tikt uzskatīti par endofītiem (Stone et al., 2004). Par endofītiem tiek dēvētas arī tādas sugas, kuras kolonizē saimniekaugu asimptomātiski tikai kādā no infekcijas cikla daļām (Stone & Petrini, 1997). Šo iemeslu dēļ augu iekšieni apdzīvojošos organismus nevar iedalīt, izmantojot vienkāršotas definīcijas (Collinge et al., 2022). Minētā

raksta autori pauž, ka endofīts vienā saimniekaugā var izrādīties patogēns citas sugas augā, un aicina domāt par endofītu specifisko sekundāro metabolītu nozīmi sēnei labvēlīgu apstākļu nodrošināšanā saimniekauga iekšējā vidē.

1.1.2. Auga aizsardzības reakcijas

Neatkarīgi no tā, cik veiksmīgi sēne spēj kolonizēt saimniekaugu, ir zināms, ka visas sēnes, kuras kolonizē augus, tajos ierosina aizsardzības reakcijas (Lo Presti et al., 2015; Tanaka & Kahmann, 2021). Sēnes micēlijam ieaugot saimniekauga audos, jeb notiekot penetrācijas procesam, rodas auga šūnu bojājums un auga iekšējā vidē izdalās tā sauktie DAMPi jeb mazmolekulāri savienojumi, kas liecina par tā audu bojājumu (angl. *damage-associated molecular pattern*). Arī sēnes fizioloģisko procesu rezultātā auga iekšējā vidē tiek izdalīti sēnes šūnu veidojošo molekulu fragmenti jeb tā sauktie MAMPi (angl. *microbe-associated molecular pattern*), kas tipiski ir hitīna vai beta-glikānu oligosaharīdi (Tanaka & Kahmann, 2021). Gan DAMPu, gan MAMPu parādīšanās izraisa auga imūnsistēmas aktivāciju, t.s. paternu izsaukto imunitāti jeb PTI (angl. *pattern-triggered immunity*), kā rezultātā augs izdala dažādus savienojumus, piemēram, antimikrobiālos sekundāros metabolītus un reaktīvos skābekļa savienojumus (ROS), kuri ir toksiski sēņu audiem (Bigeard et al., 2015). Tomēr patogēniem ir papildu mehānismi, kā apiet auga PTI, izmantojot īpašus efektoru savienojumus, kas maskē sēnes MAMPus vai tiešā veidā kavē auga imūno atbildi (Lo Presti et al., 2015). Tomēr augiem atpazīstot efektorus, tiek ieslēgta nākamā līmeņa aizsardzība – efektoru izsauktā imunitāte jeb ETI (angl. *effector-triggered immunity*), kurai jau ir ātrāka un spēcīgāka atbilde (J. D. G. Jones & Dangl, 2006). Efektoru atpazīšanu nodrošina augu noturības jeb rezistences gēni, kas mērķēti konkrētam patogēna efektoram izraisa tā darbības kavēšanu (Tanaka & Kahmann, 2021). Sēņu patogēni adaptējas, radot jaunus efektoru gēnus, uz kuriem laika gaitā atbild saimniekaugs, radot jaunus, specifiskus rezistences gēnus; šī nepārtrauktā evolucionārā sāncensība tiek dēvēta par zig-zag modeli (Jones & Dangl, 2006). Šī augu patosistēmas struktūra ir raksturota Flor (1971) pētījumā, kurā postulēta "gēns pret gēnu" teorija: sēņu efektoru gēniem laika gaitā attīstās tieši specifiski augu rezistences gēni, kas galu galā izraisa sākotnēji virulenci nodrošinošo sēņu gēnu nozīmes infekcijā mainīšanos uz pretējo, tādēļ tos dēvē par avirulences gēniem (Avr).

Endofīti spēj novērst auga PTI un ETI toksiskās ietekmes un panākt fiksētā oglekļa ieguvu no saimniekauga, izmantojot pielāgotus efektorus, kuri stimulē augu padarīt pieejamas barības vielas un palīdz maskēt savu klātbūtni (Collinge et al. 2022). Iemesls, kādēļ endofīti neizraisa saimniekauga patogēnēzi, bet ierobežo savu augšanu un veido mutuālas vai komensālas attiecības lielā mērā slēpjas līdzsvarā starp sēnes barības vielu nepieciešamību un saimniekauga

aizsardzības spējām (Mishra et al. 2021). Minēto līdzsvaru var ietekmēt barības vielu apmaiņa, saimnieka un endofīta genotipi, endofīta koncentrācija audos, tā mijiedarbība ar citiem mikroorganismiem un stresa apstākļi (Hardoim et al. 2015).

Viena no raksturīgajām īpašībām, kas atšķir patogēnu no endofīta, ir tā daudzuma atšķirība saimniekauga audos – patogēnās sēnes ir daudzkārt augstākā koncentrācijā (Mishra et al. 2021). Kvoruma sajušana (angl. *quorum sensing*) jeb savas sugas šūnu blīvuma sajušana varētu būt iemesls patogēneses ierosināšanai. Piemēram, *Fusarium oxysporum*, augsnē dzīvojošs augu un dzīvnieku patogēns, savā apkārtējā vidē izdala feromonus, kuri, sasniedzot noteiktu koncentrāciju, ierosina dzimuma diferenciaciju un sporulāciju (Tian et al., 2021), vai arī *Penicillium* sugas pie augsta šūnu blīvuma aktivizē sekundāro metabolismu un izdala antibakteriālus savienojumus vai pastiprina celulāzes aktivitāti, kas dod tai sāncensīgas priekšrocības substrāta kolonizācijā (Barriuso et al., 2018). No šī var secināt, ka, iespējams, paaugstinoties endofīta koncentrācijai saimniekauga audos, piemēram, atvieglotas barības vielu vai enerģijas resursu ieguves dēļ, tiek aktivizēti virulences mehānismi, kas izraisa pāreju no endofītiskā režīma uz aktīvi augošu, patogēnu režīmu.

1.1.3. Protektīvais mutuālisms un endofīti mikrobiālajās sabiedrībās

Viena no pazīstamākajām endofītu īpatnībām ir tāda, ka tie saimniekaugam var piešķirt kādu pozitīvu ekoloģisku pielāgojumu, piemēram, palielināt auga noturību pret abiotiskiem vai biotiskiem stresa apstākļiem. Caur specifisku efektoru izdalīšanu endofīti var aktivizēt auga aizsardzības mehānismus, nodrošinot to noturību pret patogēnajiem mikroorganismiem, kā arī novērst patogēno mikroorganismu proliferāciju tiešā veidā, izdalot antimikrobiālus savienojumus (Collinge et al. 2022). Tāpat endofītu efektori var arī tiešā veidā stimulēt saimniekauga augšanas procesus, vienlaicīgi nodrošinot sev nepieciešamo barības vielu ieguvu no saimniekauga šūnām (Mishra et al. 2021). Šīs īpašības ir līdzīgas ar tādiem labvēlīgajiem augu mikroorganismiem kā mikorizas sēnes un augiem labvēlīgās baktērijas, taču atšķirībā no tiem endofīti ir galvenokārt lokalizēti ārpus šūnām, starpšūnu apoplasta reģionos (James 2000 un McCully 2011 cit. pēc Mishra et al. 2021). Lai arī konkrētas endofītu sugas tiek uzskatītas par saimniekaugam labvēlīgām (izmanto arī šādu apzīmējumu "protektīvais mutuālisms") ir maldīgi to antagonismu pret zināmiem auga patogēniem pētīt izolēti laboratorijā, tādēļ ka augu iekšieni apdzīvojošās sugas ir daudzskaitlīgas, un tās savā starpā mijiedarbojas; svarīgs ir tieši visas sabiedrības ietekmju kopiznākums (Lee et al., 2019). Manzotti et al. (2020) pētījumā no veselīgiem tomātu stādiem izdalīti vairāki endofīti, un, vēlāk inokulējot sterilos apstākļos audzētus tomātu sējeņus ar katru no izdalītajām sugām atsevišķi, novērota dažāda līmeņa patogēno simptomu attīstība. Tas pamato ideju, ka endofītu ietekmi nosaka sarežģīta

mikrobiomu veidojošo sugu mijiedarbība, un nevar veikt spriedumus par viena endofīta ietekmi atdalīti no pārējā mikrobioma.

Vēl viens skatpunkts endofītu ekoloģijas pētījumos ir dažādu endofītisko sēņu sugu līdzpastāvēšana. Endofītu sabiedrības meža kokaugos ir sevišķi daudzveidīgas, turklāt tās var stipri atšķirties atkarībā no saimniekauga genotipa (Pan et al. 2008 un Arnold 2007 cit. pēc Newcombe, 2011). Savstarpējā endofītu mijiedarbība ir maz pētīta, un iztrūkst informācijas par to mijiedarbību *in situ* koksnē (Lee et al. 2019). Sāncensīgās izslēgšanas teorija paredz, ka sugas ar līdzīgām pieejām resursu ieguvē savstarpēji mijiedarbojas negatīvi, tādēļ ir retāk sastopamas kopā (Abrams & Rueffler, 2009). Turpretī sugas ar līdzīgu toleranci pret vides apstākļiem kopā novērotas biežāk (Lee et al. 2019). Būtiska loma organismu sabiedrības struktūrā ir arī laikam un secībai, kurā tie attiecīgajā vietā parādās, kas pamatojas uz prioritātes efektu; jaunu sabiedrības veidošanās notikumu var iniciēt arī ekoloģiski traucējumi (Fukami, 2015). Galu galā var secināt, ka kokaugu endofīti nav viennozīmīga grupa un tā var mainīties atkarībā no dažādiem saimniekauga un vides apstākļiem, kā arī to būtiski var izmainīt ekoloģiski traucējumi.

1.1.4. Ksilotropie un *P. abies* stumbra koksnes endofīti

Vairums ne-graudzāļu endofītu rada nesistēmisku infekciju. Tie ir iedalāmi pēc to tipiskās atrašanās vietas saimniekauga audos, proti, lapu endofīti, sakņu endofīti, mizas un koksnes endofīti (Sieber 2007; Kūngas et al. 2020). Vislabāk izpētīti ir lapu endofīti, kas visticamāk ir zaļo, nelignificēto audu vieglās manipulācijas dēļ. Ksilotropo endofītu grupu sastāda koksni kolonizējošo sēņu sugas ar līdzīgām ekoloģiskajām īpatnībām, turklāt lielā taksonomiskajā daudzveidībā, kas pārspēj lapu un mizas endofītus (Stone et al. 2004; Sun et al., 2012).

Skuju kokos, sevišķi *Pinaceae* dzimtā, visbiežāk izdalītā endofītisko sēņu kārtā ir *Helotiales*, savukārt tādas kā *Xylariales*, *Pleosporales* un *Dothideales* novērotas arī lapkokos (Sieber 2007). Tomēr visos gadījumos ksilotropo endofītu sabiedrības veido galvenokārt Ascomycota nodalījuma sēnes, mazākā apmērā novērojamas arī Zygomycota sēnes (Chapela, 1989; Stone et al. 2004; Sieber 2007; Burņeviča et al., 2016). Biežāk novērotie koksnes endofīti parastās egles *Picea abies* zaros ir no *Mollisia*, *Pezicula*, *Tympanis*, *Tryblidiopsis* un *Pocillopyncis* ģintīm, kur visas ir no *Helotiales* kārtas (Sieber 2007). Nesenākos pētījumos *P. abies* koksnē atrastas arī *Agaricales*, *Capnodiales*, *Chatothyriales*, *Hypocreales*, *Pleosporales*, *Russulales* un *Xylariales* kārtu sēnes (Burņeviča et al. 2016; Klavina et al., 2023). Abos minētajos un vairākos citos rakstos *P. abies* stumbrā vizuāli neizmainītā koksnē atrasta arī *Corinectria fuckeliana* (= *Nectria fuckeliana*; = *Neonectria fuckeliana*) – endofīts vai vājš patogēns ar neskaidru ekoloģisko lomu (González & Chaverri, 2017).

1.2. *Corinectria fuckeliana* dzīvesveids un patoģenēze

Neonectria fuckeliana (C. Booth) Castl. & Rossman, pazīta arī kā *Nectria fuckeliana* Booth pirmo reizi oficiāli atzīta kā jauna suga 1959. gadā (Booth 1959), taču ir reģistrēti agrāki novērojumi ar saglabātiem paraugiem daudzviet Eiropā jau 20. gs. sākumā (https://www.gbif.org/occurrence/map?q=nectria%20fuckeliana&occurrence_status=present). Kopš González & Chaverri (2017) veiktās taksonomiskās revīzijas, šī suga ir pārklasificēta kā *Corinectria fuckeliana* (C. Booth) C. González & P. Chaverri, comb. nov.; tā ietver sākotnējo sugu, tās anamorfo stadiju *Cylindrocarpon cylindroides* un iepriekš kļūdaini nosauktu sugu *Nectria cucurbitula* (Tode) C. Booth.

C. fuckeliana comb. nov. izplatības areāls primāri ir Centrāleiropa, Lielbritānija, Skandināvija, Ziemeļamerika, taču tā parādījusies arī Jaunzēlandē, kā arī reģistrēti atsevišķi novērojumi Dienvidāfrikā, Austrumāzijā (Booth 1959; Roll-Hansen & Roll-Hansen 1979; Crane et al., 2009; Dick et al. 2009; Hopkins et al. 2012; un citi autori). Jāmin, ka ir atrasta līdz šim vēl nenosaukta atsevišķa *Corinectria* ģintij piederoša suga Sibīrijas vidienē, kuras izplatības areāls 11 gadu laikā ir izpleties par aptuveni 450 km Ziemeļu virzienā (Pavlov et al., 2020).

C. fuckeliana dzīvotne parasti ir dažādu ģinšu skuju koku miza, kā egles *Picea*, baltegles *Abies*, lapegles *Larix* un citas *Pinaceae* dzimtas sugas; vājš patogēns ar hemibiotrofu vai saprofitisku dzīvesveidu (Crane et al. 2009). Eiropas kontekstā *C. fuckeliana* ir bieži pieminēta kā parastās egles *Picea abies* koksnes endofīts vai arī stumbra brūču kolonizētājs, vairākos pētījumos esot visbiežāk izdalītā sēne no dabiskām vai mākslīgi radītām brūcēm, konkrēti, 79.0% (Roll-Hansen & Roll-Hansen 1979), 35.7% (Vasiliauskas et al., 1996), 27.5% (Vasiliauskas & Stenlid 1998), 24.8% (Burņeviča et al. 2016) no pētījumos apsekotajiem kokiem. *Picea abies* koksne šī sēne rada blāvu sarkanīgi brūnu vai pelēcīgu atkrāsošanos, taču tās klātbūtne var būt arī asimptomātiska (Roll-Hansen & Roll-Hansen 1979; Huse 1981; Schultz & Parmeter 1990; Dick et al. 2009; Burņeviča et al. 2016). Šī sēne ir nozīmīga ar to, ka mēdz izraisīt stumbra vēzi (angl. *canker* vai *flute*), tādējādi bojājot koksni un radot zaudējumus kokmateriālu industrijā. Lai arī izplatīta Ziemeļu puslodē, zināšanas par tās fizioloģiskajiem pamatprocesiem un izplatīšanās apstākļiem vēl ir papildināms (Crane et al. 2009).

C. fuckeliana pastāv trīs dažādās vairošanās formās, dzimumvairošanās stadija ar askusporām un peritēcijiem un divas bezdzimumvairošanās stadijas (Crane et al. 2009; Dick et al. 2009). Mikrobioloģiski inkubējot paraugus no simptomātisku koku brūcēm, iegūtā vairošanās stadija ir *Acremonium* tipa anamorfs, kam raksturīga viensūnu mikrokonīdiju veidošana; tā raksturīga arī atzāģētai, atklātai koksnei stipri mitros apstākļos, attiecīgi *Acremonium* stadijā sēne ir spējīga inficēt koku (Crane et al. 2009; Dick et al. 2009; Hopkins

et al. 2012; Ramsfield et al. 2013). Dabā reti ir novērojama arī bezdzimumiskā *Cylindrocarpon* tipa daudzšūnu makrokonīdiju veidošanās, kas nereti saistīta ar dzimumisko peritēciju stadiju (Dick et al. 2009). Laboratorijas apstākļos nav novērota makrokonīdiju klātbūtne šai sugai, kā arī Jaunzēlandes paraugiem ir vāji izteikta vai neesoša seksuālās attīstības stadija ar maz askusporām un mazattīstītiem peritēcijiem (González & Chaverri 2017).

Skaidras informācijas par *C. fuckeliana* dzīves ciklu iztrūkst, taču Gonzáles et al. (2020) ir izpētījuši dzīves ciklu filoģenētiski ļoti tuvai sugai *C. constricta*. Pētījumā tika novērota sēnes dabiski izraisītās slimības uz *Pinus radiata* simptomātiskas attīstība un secināts, ka aptuveni 7 nedēļas kopš pirmajām ārējās deformācijas pazīmēm, uz stumbra virsmas parādās anamorfe augļķermeņi – makrokonīdiju sakopojumi sporodohiji – un jau šinī stadijā tā ir spējīga inficēt citus kokus. Pēc diviem līdz trim mēnešiem notiek augļķermeņu attīstība uz dzimumisko stadiju – peritēcijiem, un tie spēj palikt uz stumbra virsmas visu gadu.

Vairāki avoti secina, ka askusporas ir galvenais izplatīšanās veids. Priekšnosacījums šim procesam ir augsts mitruma līmenis nevis vējš, tomēr insektu zoohorija nav izslēdzama sporu lipīgā apveida dēļ (Crane et al. 2009; Dick et al. 2009; Ramsfield et al. 2013). Askusporu izplatīšanās novērota visu gadu, taču, kad sporu ķērāji tikuši novietoti tālāk par 1 metru no inficētā koka, sporas principā netika noķertas (Dick et al. 2009), liekot domāt par lokālu sēnes izplatīšanās raksturu.

Vēl nesen pastāvēja uzskats, ka *C. fuckeliana* priežu ģints kokus visbiežāk inficē caur apgrieztu/apcirptu (*pruning*) zaru brūcēm, tomēr sēne ir tikusi izolēta gan no apcirptiem, gan neskartiem kokiem teju vienādās proporcijās (Ramsfield et al. 2013), kas norāda uz sēnes endofītisko dabu, taču autori nespēja minēt skaidru iemeslu, kas izraisīja patogenitātes uzsākšanos. *C. fuckeliana* infekcija tiek saistīta arī ar lielo zīdītāju (visbiežāk no briežu dzimtas) izraisītajām mizas brūcēm (Talgø et al. 2012; Burņeviča et al. 2016), taču sēne ievērojamā daudzumā atrasta arī neskartos kokos (Roll-Hansen & Roll-Hansen 1979; Burņeviča et al. 2016). Vairums pētījumu piemin *C. fuckeliana* kā vāju patogēnu, taču pēdējā dekādē ir bijuši ziņojumi par šīs sēnes izraisītiem stumbra vēžiem, spēcīgu sveķošanu un galotņu atmiršanu *Picea abies* audzēs Norvēģijā un Somijā (Pettersen et al. 2018).

Iespējamu simbiotisku nozīmi starp *C. fuckeliana* un parasto egli skaidro Krokene et al. (2001) pētījums – inokulējot *P. abies* ar laboratorijā pavairotu *C. fuckeliana* micēliju, egļu noturība pret patogēno *Ceratocystis polonica* palielinājās trīskārši (*C. polonica* izraisītie audu bojājumi ir trīs reizes mazāki). Dick et al. (2013) pētījumā pēc *Pinus radiata* inokulēšanas seklā brūcē (noņemta miza un kambijs, neskarta aplieva) novērota arī koku atlabšana, t.i., brūces bija sadzijušas tāpat kā kontroles variantiem. Atlabušo koku koksne bija redzams inokulācijas bojājums, taču nebija redzama koksnes iekrāsošanās. Mēģinot mikrobioloģiski izolēt sēni no

koksnes (no inokulācijas punkta, 2, 4, 6, 8 un 10 cm zem un virs tā), tas neizdevās nevienā no gadījumiem.

Hopkins et al. (2012) pētījumā secināts, ka *C. fuckeliana* infekcija *Pinus radiata* dziļās brūcēs daudz biežāk rezultējas audzējos (76%) nekā seklās brūcēs (noņemta miza un kambijs, neskarta aplieva) (17%) vai nogrieztu zaru stumbeņu brūcēs (17%). Turklāt nebija nozīmes, vai par inokulātu izmantoja *Acremonium* tipa konīdiju suspensiju vai askusporas. Divus gadus pēc inokulācijas patogēnu sanāca izolēt tikai no 68% koku, un no 42% koku izdevās izolēt patogēnu no inokulācijas punkta, kamēr tikai no 24% koku patogēnu izdevās izolēt tālāk par 2 cm no inokulācijas punkta. Vienā gadījumā patogēns bija izplatījies pa visu stumbru, tādēļ individuāliem kokiem varētu būt nozīme kā nejaušajam efektam. Vēl šajā pētījumā patogēnu no koksnes pārsvarā izdevās izolēt nedaudz pirms krāsojuma beigām.

Tāpat būtisks novērojums ir Ramsfield et al. (2013) pētījumā par *C. fuckeliana* klātbūtni *P. radiata* kokos – patogēns 96% no inficētajiem kokiem tika izolēts ar ģenētiskām metodēm, turpretī tikai 21% gadījumu izdalīšana bija sekmīga, izmantojot mikrobioloģiskās metodes; tomēr 4% izdalīšanas izdevās tikai ar mikrobioloģisko pieeju.

Pēdējā laikā pieaugusi *C. fuckeliana* nozīmība kā Dienvidu, tā Ziemeļu puslodē, radot riskus kokmateriālu industrijai. Vairākos pētījumos par *C. fuckeliana* kā nozīmīgu koku patogēnu Eiropas ziemeļvalstīs izteikts minējums, ka *C. fuckeliana* infekcijas faktiskais biežums, visticamāk, ir lielāks nekā mežziņu rīcībā esošajā informācijā (Talgø et al. 2012; Petterson et al. 2018; Uimari et al. 2018). Neskaidro infekcijas ceļu un palielināto gadījumu biežumu dēļ ir nepieciešams papildināt zināšanas par šīs sēnes optimālajiem dzīvotnes apstākļiem un vides apstākļu ietekmi uz tās fizioloģiju, kā arī vairot uzticamu rezultātu kopu par sēnes mijiedarbību ar citām koksni apdzīvojošajām sēnēm un tās ietekmi uz kokaugiem, tostarp Latvijā un Eiropā nozīmīgo skuju koku *Picea abies*.

1.3. Parastā egle Latvijā un Eiropā, tās nozīmīgums un patogēni

Parastā egle (*Picea abies* (L.) Karst.) ir nozīmīga suga Latvijas valstī gan ekoloģiskā, gan sociālekonomiskā kontekstā (Ruņģis et al., 2019). Tā ir otrā izplatītākā vietējā skuju koku suga Latvijā un aizņem aptuveni 650 tūkstošus hektāru, veidojot 18.5% no visas Latvijas mežu kopplatības, ar aprēķinātu 5.8 mlj. km³ krājas pieaugumu tekošajā desmitgadē (Nacionālais meža monitorings 2019-2022). *P. abies* ir nozīmīga arī Eiropas mērogā. Kā galvenā suga boreālajos un subalpīnajos skuju koku mežos no Centrāleiropas līdz Ziemeļu un Austrumeiropai tā dominē Ziemeļu un Ziemeļaustrumeiropas boreālo zonu, kā arī nereti tiek audzēta plantācijās, tostarp ārpus tās dabiskā izplatības areāla, piemēram, ASV, Japānā, Dienvidāfrikā un citur (Caudillo et al. 2016).

P. abies ir galvenais kokaugs vairumā skuju koku mežu Eiropā un Latvijā un tai ir augsta ekoloģiskā spēja piesaistīt CO₂ (Krišāns 2020), kas norāda uz tās ekoloģisko nozīmīgumu. Egles koksnes vieglā apstrādājamība un plašā izmantojamība tādās nozarēs kā būvniecība, papīra ražošana, mūzikas instrumentu ražošana un kā Ziemassvētku egli – *P. abies* neapšaubāmi ir sociāli ekonomiski nozīmīga suga (Caudullo et al. 2016).

P. abies ir raksturīga zema noturība pret abiotiskajiem stresoriem – vējgāzes (seklās sakņu sistēmas dēļ), uzņēmība pret sausuma periodiem un meža ugunsgrēkiem, un arī biotiskajiem stresoriem (Marčiulynas et al. 2022; Caudillo et al. 2016). Nozīmīgākie biotiskie faktori ir kaitēkļi vaboles – priežu smecernieks un egļu astoņzobu mizgrauzis. Viens no lielākajiem egli apdraudošajiem faktoriem ir sakņu trupe, ko izraisa galvenokārt *Heterobasidion* ģints sēnes un visbiežāk *H. parviporum* (Vasiliauska & Stenlid 1998; Garbelotto & Gonthier 2013). Vidēji 21% egļu audžu Latvijā ir inficēti ar sakņu trupi, un ziņots, ka tā no saknēm var izplatīties stumburā vidēji līdz 6.6 m augstumam un pat līdz 12.4 m augstumam (Gaitnieks et al., 2019). Lai arī *Heterobasidion* inficē egli caur celmu atklāto koksni un sekundāri caur sakņu kontakta vietām, zināma loma infekcijā ir arī stumbra brūcēm (Garbelotto & Gonthier 2013; Caudillo et al. 2016). Pa stumbra brūcēm egli inficēt spējīgas ir vairums citu sēņu, tostarp iepriekš pieminētā *C. fuckeliana* (Roll-Hansen & Roll-Hansen 1979; Crane et al. 2009; Dick et al. 2009).

Ir aplēsts, ka Ziemeļu puslodē klimata pārmaiņu ietekmē notiks patogēno sēņu migrācija Ziemeļu virzienā (Bebber et al., 2013). Tāpat meteoroloģisko apstākļu mainības (garākas vasaras, siltākas ziemas, biežākas ekstrēmas laikapstākļu epizodes) dēļ gan patogēnajām sēnēm būs ilgāks aktīvās augšanas periods, kas var radīt lielāku to infekciozitāti, gan koki būs pakļauti lielākam abiotisko bojājumu riskam, kas samazina to noturību pret patogēniem (Pautasso et al. 2012). *C. fuckeliana* novērota epidēmiska patogenitātes uzliesmojumu izpausme (Dick et al. 2009; Hopkins et al. 2012; Petterson et al. 2018), kas varētu būt saistīta ar klimatiskajām pārmaiņām, tādēļ ir aktuāli izpētīt tās patogenitāti un saistītās sēņu sabiedrības daudzējādi nozīmīgās *P. abies* koksne.

2. MATERIĀLI UN METODES

2.1. Parauglaukuma informācija

Šajā pētījumā ar trīs dažādiem sēnes *Corinectria fuckeliana* izolātiem un negatīvo kontroli tika inficētas 60 Parastās egles *Picea abies* bez mizas bojājumiem to stumbros. Egļu monoaudze atradās Ogres virsmežniecībā. Parauglaukuma shēma redzama pielikumos attēlā S1. Audzes informācija: atslēga 501-162-9; koordinātas 56.856521, 24.754058 (1. attēls); audzes sastāva formula (2021. gadā): 10E55 + B47 + Os47 ats.M47; 2.st.10E37; meža tips – platlapju ārenis; platība 2,6ha.



1. attēls. Eksperimenta parauglaukuma lokācija; a) Latvijas teritorijā (mērogs 1:200000),
b) Ogres virsmežniecībā (mērogs 1:1500); attēli no LVM GEO.

Figure 1. Experimental sample plot location; a) in the territory of Latvia (scale 1:200000),
b) in Ogre silviculture (scale 1:1500); pictures from LVM GEO.

2.2. Egļu inokulēšana un parauglaukuma apsekošana

Koku inficēšana ar sēni notika 2011. gada augustā mākslīgi radītās stumbra brūcēs, ar elektrisko urbi egļu stumbrā krūšu augstumā izurbjot 2-3 cm dziļu caurumu un ar mehānisko pipeti tajā iepilnot kādu no trim mikrobioloģiskajām *C. fuckeliana* tīrkultūru suspensijām vai

arī negatīvo kontroli – sterilu ūdeni. Katram egles stumbram tika izraisītas četras brūces pulksteņrādītāja virzienā, taču nejaušā orientācijā). Katrs eksperimenta koks saņēma visus apstrādes veidus. Pēc inokulēšanas brūce tika noslēgta no ārvides ar potvasku.

Virs katras brūces ar krāsas baloniņu tika uzpūsts identificējošs iekrāsojums: dzeltens (Dz) atbilstoši T3N izolātam, oranžs (O) atbilstoši Suenenjoki vai rozā (R) atbilstoši Jappila *C. fuckeliana* izolātam, un sarkans (S) negatīvajai kontrolei. Katrs koks tika iezīmēts ar kārtas skaitli, ar krāsas baloniņu uzpūšot to uz stumbra kaut kur zem brūces. Koka marķējums tika regulāri atjaunots (2. attēls).

Tālākajā periodā audzes tika apsekotas četras reizes: 2012. gada augustā un novembrī un 2013. gada augustā un novembrī.

2.3. Koku un mizas brūču mērījumi

2022. gada maijā notika koku parametru un brūču uzmērīšana un paraugu ievākšana no inficēto egļu stumbriem. No sākotnējiem 60 kokiem septiņi dabisku, nekontrolētu apstākļu dēļ tika izgāzti, tādēļ no tālākās eksperimenta gaitas izslēgti.

Tika noteikts egļu audzes vidējais augstums, ar infrasarkanu staru mērierīci Vertex 4 (Haglöf, Zviedrija) nomērot nejauši izvēlētos 27 eksperimentālos kokus kopā ar nejauši izvēlētiem 6 blakusaugošām neinficētām eglēm (ar 0.1 m precizitāti). No iegūtajiem augstuma mērījumiem tika aprēķināta aritmētiskā vidējā vērtība, ar kuru raksturota visa egļu audze. Tāpat katrai no 53 eksperimentālajām un 6 neapstrādātajām eglēm tika nomērīts stumbra diametrs krūšu augstumā un stumbra diametrs sakņu kakla augstumā, izmantojot mehānisko dastmēru (ar 0.1 cm precizitāti). Katram kokam, tostarp izgāztajiem un neinficētajiem, tika reģistrētas koordinātas, izmantojot LVM GEO lietotni (v. 3.6.0) viedtālrunī, tomēr no 60 eksperimentālajiem kokiem netika atrasts koks ar kārtas skaitli 6.

Koku vitalitāte tika noteikta, vizuāli novērtējot skuju vainaga defoliācijas apmēru un skuju hlorozi, kā arī stumbru un zaru mizas stāvokli. Vitalitāte raksturota ar pakāpēm no 1 līdz 5, kur 1 nozīmēja viszemāko vitalitātes stāvokli (visas skujas nobirušas, sausi, lūstoši zari, atlupusi miza) un 5 nozīmēja ideālu stāvokli (kups, zaļš vainags un stingra miza).

Mizas brūču uzmērīšana tika veikta, nosakot tās garumu un platumu. Par brūces garumu tika uzskatīts attālums vertikāli no brūces atvēruma zemākās vietas, kur novērojama stumbra audu hiperplāzija, līdz tādai pašai vietai brūces augšpusē. Tika nomērīts arī brūces platums – paralēli zemes virsmai no vienas brūces malas horizontāli cauri inficēšanas punktam līdz otrai malai. Mizas brūču garums un platums tika mērīts ar rokas lineālu, garums mērīts līdz 0.1 cm precizitātei, bet platums – līdz 0.5 cm precizitātei brūces robežu identificēšanas grūtību dēļ.



2. attēls. Mizas brūce uz *P. abies* stumbra.

Figure 2. Bark wound on *P. abies* stem.

2.4. Paraugu ievākšana

Inficētās koksnes paraugu ievākšanā tika izmantoti 44 no 53 parauglaukumā augošajiem kokiem. 10 kokus bija paredzēts saglabāt neskartus, tas ir, neņemt serdeņu paraugus, lai saglabātu stumbra koksnes struktūru vertikālās izplatības analīzēm no garengriezumiem un šķērsriezumu ripām. Koks Nr. 17 bija izgāzts, tādēļ trūkstošā koka aizstāšanai tika izvēlēts koks Nr. 41, no kura arī tika izurbts serdenis.

Paraugi tika ievākti, ar Preslera svārpstu izurbjot 2 serdenišus no katras brūces: vienu – 2 cm uz leju no brūces augšējās robežas, otru – 2 cm uz augšu no brūces apakšējās robežas. Svārpsts pirms katras urbšanas reizes sterilizēts spirtā un liesmā. Urbuma vietām miza netika ņemta nost, jo ar atstātu mizu bija daudz vieglāk panākt saķeri starp svārpsta vītņi un sasveķoto koksni. Mizas daļa tika noņemta no izurbtā serdeņa. Serdeņi tika ievietoti sterilos 15 mL stobriņos, uz kuriem iepriekš bija uzrakstīts koka numurs, izolāta vai negatīvās kontroles iniciālis un burts A vai B, attiecīgi apzīmējot brūces augšpusi vai apakšpusi.

No katras brūces viens no serdenīšiem tika izmantots mikrobioloģiskai sēnes izdalīšanai, un otrs – DNS izdalīšanai tiešā veidā no koksnes. Tas, kurš no serdenīšiem tika izmantots mikrobioloģiskajai analīzei un kurš – DNS analīzei, tika atlasīts nejauši. Stobriņi ar serdeņiem DNS izdalīšanai uzreiz pēc izurbšanas tika uzglabāti līdzņemtajā aukstumkastē. Pēc atnešanas uz laboratoriju 15 mL stobriņi ar koksnes serdeņiem ielikti saldētavā pie $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, lai saglabātu tos DNS ekstrakcijai un mikrobioloģiskajai sēnes izdalīšanai.

Lai noteiktu sēnes vertikālo izplatību koksnē, tika veikta inficēto egļu stumbra fragmentu ieguve ar motorzāģi. 7 no 10 kokiem (Nr. 4., 7., 16., 21., 24., 37. un 41.) tika atvēlēti šķērsriezumu jeb ripu analīzei, bet pārējie 3 (Nr. 22., 23., 34.) – garengriezumu. Koki ripu analīzēm sākumā tika stumbrā iezīmēti ar vienu vertikālu griezumu un otru slīpu griezumu pareiza ripu virziena nodrošināšanai, tad zāģēti ar motorzāģi ~2.5 cm biezuma ripās, pirmo zāģējumu veicot tieši cauri brūcei, un tad pa ripai atzāģējot uz augšu un uz leju, līdz vairs nebija redzams koksnē iekrāsojums. Pārējo 3 koku stumbra fragmenti tika sazāģēti vertikāli vietējā kokzāģētavā ar lentzāģi dažādos veidos, tostarp arī tieši cauri infekcijas punktam.

Saripotajiem fragmentiem ar rokas lineālu tika nomērīts ripu biezums. Vizuāli tika novērtētas koksnē atkrāsošanās pazīmes tieši virs inficēšanas vietas attiecīgajā fragmentā, tā ripām esot sakrātām pareizā orientācijā. Par izejas punktu atkrāsojuma distances noteikšanai tika izvēlēta 0. ripas apakšējā mala (gan skaitot uz augšu, gan uz leju). Par 0. ripu pieņemta tā, kuras apakšā atradās inokulācijas urbuma pēdas. Vertikāli sazāģēto stumbru fragmentiem par mērīšanas sākuma punktu tika izmantota tā vieta, kur koksnē atradās sākotnējā urbuma brūce. Par vertikālās izplatības gala robežu tika uzskatīta vieta, kur bija novērojamas jebkādas vizuālas koksnē izmaiņas, proti, arī pēc uzskatāmā tumšā krāsojuma, kas stiepās no brūces sākumpunkta, robežām. Saripotie un gareniski sazāģētie stumbru fragmenti tika analizēti istabas temperatūrā un uzglabāti aukstumkamerā pie 6 °C. Stumbru ripas ar uzskatāmākajām atkrāsošanās pazīmēm tika noskenētas ar skeneri Expression 12000 XL (Epson, ASV).

No ripām un stumbru fragmentu garengriezumiem tika izgūti koksnē fragmenti sēņu kultūru izolēšanai. Tie tika ņemti trīs dažādos atskaites punktos: tuvu brūcei (2 cm no tās ripām, bet 3 cm – garengriezumiem), pēdējā skaidrajā skaidrajā atkrāsojuma vietā un pēdējā vizuāli konstatējamajā koksnē izmaiņu vietā (šiem līmeņiem attālumi savstarpēji atšķīrās). Koksnē fragmenti kultūru izolēšanai paņemti arī no nozāģēto egļu celmiem aptuveni 30 cm augstumā no zemes. Ar motorzāģi izzāģētas ripas, un no to apakšējās virsmas 3 cm iekšējā virzienā no mizas izkalti paraugi.

No celmiem, ripām un garengriezumiem ar kalnu un āmuru izkalti koksnē gabaliņi, ievietoti tukšos Petri traukos un ilgākais 3 dienas uzglabāti ledusskapī līdz sēņu izdalīšanai. Pirms kalšanas procedūras kalns tika iemērīts 70% etilspirtā un nodedzināts uz liesmas, turklāt vēl pirms pašu paraugu ņemšanas tika atdalīta ripas vai garengriezuma koksnē virsējā daļa, lai samazinātu iekštelpu un citu nevēlamu mikroorganismu kontaminācijas risku. Veicot izkalto koksnē fragmentu pārlikšanu uz cietās Hagema barotnes, tie tika 1 sekundi apdedzināti liesmā no abām pusēm.

2.5. Mikrobioloģiskā sēnes izdalīšana no serdeņiem un koksnes fragmentiem

Mikrobioloģiskai sēņu izdalīšanai no egļu koksnes serdeņi sterilajos stobriņos atgādāti atpakaļ uz laboratoriju, kur antiseptiskos apstākļos laminārās plūsmas galdā pēc īslaicīgas apdedzināšanas virs spirta lampiņas tie tika uzlikti uz cietajām barotnēm Petri traukos. Izmantotā barotne bija Hagma cietā barotne, ar sastāvu uz 1 L apjomu: 5.0 g glikoze, 0.5 g NaNO₃, 0.5 g MgSO₄, 0.5 g KH₂PO₄, 5.0 g iesala ekstrakts un 20.0 g agars. Agars un iesala ekstrakts tika iegādāts no Thermo Fisher Scientific (ASV), taču pārējās minētās barotnes izejvielas no Enola (Latvija). Serdeņi kultivēti barotnēs sēņu mikrobioloģiskai izdalīšanai no 44 eglēm.

Uz Petri trauciņiem tika saglabāts izurbtā serdeņa identifikācijas kods, kā aprakstīts iepriekš. Visas mikroskopisko sēņu izdalīšanas notika sterilos apstākļos laminārajā galdā Biowizard (Kojair, Somija).

Serdeņiem uz barotnēm aizvērtas tika uzglabāti istabas temperatūrā. Ja barotnē tika novērota agresīva pelējuma sēņu augšana, sanitāru nolūku dēļ šīs kultūras tika likvidētas. Tomēr, ja šādas augšanas nebija, un bija redzamas kolonijas, kas morfoloģiski atbilda *Corinectria* ģints kolonijām, proti, bāli dzeltenīgas, sarkanīgas, vai oranžīgas ar pūkainu, piepaceltu virsmu un neregulāru malu (González & Chaverri 2017), tad tās tika pārsētas uz jaunām Hagma barotnēm, lai izolētu tīrkultūras. Sēņu kolonijas, kuras vizuāli atšķīrās no tipiski klātesošajām (kā *Heterobasidion*, *Mucor*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Ascocoryne*), arī tika pārsētas tīrkultūras izdalīšanai. Tīrkultūru ieguvei pārsēšana tika atkārtota tik ilgi, kamēr pēc 2 nedēļu ilgas inkubēšanas nebija novērojama citu organismu klātbūtne. Petri plates ar tīrkultūrām tika noslēgtas ar Parafilm plēvi un uzglabātas ledusskapī pie 5 °C.

2.6. DNS izdalīšana no koksnes

Koksnes audos esošo sēņu identificēšanai tika izmantots arī DNS. Koksnes serdeņi tika manuāli sasmalcināti ar sterilu skalpeli laminārās gaisa plūsmas galdā. Pirms smalcināšanas laminārais galds tika 15 minūtes sterilizēts ar UV starojumu. DNS ekstrakcijai netika atlasīta kāda specifiska serdeņa daļa, jo nereti tie bija salūzuši uz pusēm vai iziruši. Aptuveni 0.2 g skaidu tika pārņemti sterilā plastmasas 2 mL mikrocentrifugācijas mēģenē. 2 mL mikrocentrifugācijas mēģenes ar sasmalcināto koksni tika uzglabāti saldētavā pie -20 °C līdz mirklim, kad tika pārņemti uz DNS ekstrakcijas laboratoriju.

DNS tika izdalīta ar GeneJET Genomiskās DNS Attīrīšanas komplektu (Thermo Fisher Scientific, ASV). Paraugi vispirms tika homogenizēti ar MM400 homogenizētāju (Retsch, Vācija), paraugu kratot 4 min ar frekvenci 29 Hz kopā ar vienu 2.5 mm lielu sterilu nerūsējošā

tērauda lodīti un 160 µL noārdīšanas šķīduma (*Digestion solution*) no izmantotā DNS izdalīšanas komplekta. Ja paraugs vizuāli neliecināja par viendabīgu maisījumu, tad homogenizēts vēl 15-30 sekundes.

Paraugam pievienoti 20 µL Proteināzes K un 160 µL noārdīšanas šķīduma un vorteksēts 10 sekundes. Pēc tam paraugs inkubēts ūdens vannā 56 °C trīs stundas, ik pēc 30 minūtēm īsi vorteksējot. Pēc lizēšanas paraugiem tika pievienoti 20 µL RNāzes, un tie inkubēti istabas temperatūrā 10 minūtes. Tālāk paraugiem pievienoti 200 µL lizēšanas šķīduma (*Lysis solution*), un tie uzsildīti ūdens vannā līdz 37 °C, pēc tam vorteksēti. Sekojoši, paraugam pievienoti 400 µL 50% etanola un īsi vorteksēti. Lizāts tika pārnests uz GeneJET komplektā nodrošināto attīrīšanas kolonnu, kura centrifugēta 1 minūti pie 4800 RPM. Caurplūde nolieta un kolonna pārlikta jaunā, sterilā 2 mL mikrocentrifugācijas mēģenē. Ar nolūku palielināt izdalītās DNS koncentrāciju dažos no šiem soļiem bija atšķirības, kopā 5 dažādas metodes empīriskai salīdzināšanai (S1. tabula).

Pēc tam tika veikti DNS attīrīšanas soļi: kolonnā iepildīts 500 µL mazgāšanas buferis I (*Washing buffer*), centrifugēts 1 minūti pie 8600 RPM, caurplūde nolieta, tad iepildīts mazgāšanas buferis II un centrifugēts 3 minūtes pie tiem pašiem apgriezieniem, savākšanas stobriņš izmests. Visbeidzot kolonna ar paraugu tika pārnesta jaunā un sterilā mikrocentrifugācijas mēģenē, un veikts DNS ekstrakcijas pēdējais solis, kur parauga kolonnā tieši uz vidū esošās membrānas uzpilināts 800 µL elūcijas bufera (*Elution buffer*), inkubēts 2 minūtes istabas temperatūrā un tad īsi nocentrifugēts pie 8600 RPM. DNS šķīdumu tika uzglabāts saldētavā pie -20 °C līdz tālākai izmantošanai.

DNS koncentrāciju un kvalitāti noteica ar NanoDrop ierīci (Thermo Fisher Scientific, ASV).

2.7. Izdalītās DNS sekvencēšana

DNS paraugi kopā ar aukstumelementiem nosūtīti uz Zviedriju sekvencēšanai. Sekvencēšana notika sadarbībā ar Zviedrijas Lauksaimniecības zinātņu universitātes Meža mikoloģijas un augu patoloģijas departamentu Upsalā.

Paraugu DNS amplificēšana ar PCR un sekvencēšana notika saskaņā ar (Klavina et al., 2022), izmantojot šādus praimerus: tiešais ITS7 (5'-TGTGARTCATCGARTCTTTG-3') un reversais ITS4 (5'-TCCTCGCCTTATTGATATGC-3') (Ihrmark et al. 2012), ar kuriem PCR reakcijā tika amplificēts ITS2 rDNS rajons ar nelielām daļām no blakusesošajiem 5.8S un 28S rajoniem. Sekvencēšanā tika izmantota PacBio trešās paaudzes sekvencēšanas platforma RSII (Pacific Biosciences, ASV), kas izmanto SMRT sekvencēšanas metodi (Korlach et al., 2010).

Mikrobioloģiski izdalītajām *Heterobasidion* kultūrām arī tika izdalīta DNS un ar sēņu sugām specifiskiem ITS praimeriem noteikta to taksonomiskā piederība; pārbaudīti PCR rezultāti gēla elektroforēzē un salīdzinātas amplificēto paraugu migrācijas līnijas ar identificējamās sugas references pozīcijām.

2.8. Datu apstrāde R programmā un aprakstošā statistika

Dati tika apstrādāti, izmantojot Microsoft Excel programmu (v. 16.43) un R programmu (v. 4.2.1) (R Core Team, 2022). Datu ienešanā, pirmējā apstrādē un manipulācijās izmantota 'tidyverse' pakete (v. 1.3.2) (Wickham et al., 2019). Tā sastāvēja no atkarīgo mainīgo varbūtības biežuma sadalījuma (angl. *probability density function*) grafiskās analīzes: histogrammas forma, tās asimetrija (angl. *skewness*) un ekscess (angl. *kurtosis*), izmantojot paketi 'moments' (v. 0.14.1); ar paketes 'fitdistrplus' (v. 1.1.8) (Delignette-Muller & Dutang, 2015) funkcijām tika izmēģinātas vairākas datiem grafiski atbilstošas teorētisko sadalījumu saimes, modelētas to atlikuma vērtības jeb novirzes no reālās datu kopas (pakete 'car', v. 3.1.1), un iegūtie modeļi savstarpēji salīdzināti, izmantojot Akaikes Informācijas Kritēriju (AIC) un Beiza Informācijas Kritēriju (BIC), lai noteiktu datu atbilstību konkrētajam statistiskajam sadalījumam. Sadalījuma saime ar mazākajām AIC un BIC vērtībām tika izvēlēta tālākām statistiskajām analīzēm – brūces izmēram tas bija Gamma sadalījums, un Vertikālās izplatības koksnē datiem tas bija Binomiālais sadalījums.

Datu vizualizācija tika veikta, izmantojot vijoļveida diagrammas (angl. *violin plot*), punktu izkliedes grafikus (angl. *scatterplot*), un dažādus kombinētos grafikus, izmantojot paketes, kā 'ggplot' (v. 3.4.1), 'cowplot' (v. 1.1.1) un 'flexplot' (v.0.19.1) (Fife, 2022).

Lai izdarītu vispārinātus secinājumus par izolātu un pārējo iesaistīto faktoru ietekmi uz infekcijas pazīmēm kokos, tika izmantotas dažādas induktīvās statistikas metodes, kuras sīkāk aprakstītas sadaļā par induktīvās statistikas analīzēm.

2.9. Infekcijas izpausmes atvasinātie lielumi

Ērtības labad infekcijas izpausmes parametri brūces *garums* un *platums* tika apvienoti jaunā no tiem atvasinātā lielumā *izmērs*. Tas tika iegūts, pieņemot brūces formu par rombu un šos abus lielumus – par romba diagonālēm. Vadoties pēc romba laukuma formulas, brūces garums un platums tika viens ar otru sareizināti un tad izdalīti ar divi, jo ārējās brūces ģeometriski drīzāk atbilda rombam nekā taisnstūrim.

Šo rīcību atbalsta šādi statistikas secinājumi: pirmkārt, starp garuma un platuma post-hoc testiem gandrīz vai nebija atšķirības būtiski atšķirīgo apstrādes grupu pāros (vienīgi platuma

post-hoc būtiski neatšķirās negatīvajai kontrolei no Jappila izolāta); otrkārt, apvienojot tos jaunajā mainīgajā, uzlabojās GLM modeļa atlikuma vērtības gan grafiski, gan statistiski, pretēji tam, kā tas bija sākotnējajiem mainīgajiem GLM modeļos; treškārt, šos lielumus bija adekvāti pārveidot jaunā no tiem atvasinātā lielumā, jo starp tiem nepastāvēja kolinearitāte. Lai arī bija vidēja pozitīva korelācija ($r=0.41$), VIF (angl. *variance inflation factor*) koeficients bija 1.2, kas nozīmē, ka starp garumu un platumu kolinearitāte nepastāv un tos drīkst apvienot jaunā mainīgajā (O'Brien, 2007).

Iekšējās, vertikālās sēnes izplatības noteikšanai tika izmantota koksnes atkrāsotās daļas vertikālā distance. Tā kā vairumā gadījumu stumbra fragmentā atkrāsošanās bija novērojama viscaur, un fragmenti bija dažāda garuma, objektīvai un globālai šī parametra salīdzināšanai atkrāsošanās distance tika standartizēta, pārvēršot to proporcijā no kopējā fragmenta garuma.

Starp nomērītajiem koku diametriem krūšu augstumā (DBH) un sakņu kaklā (DRC) tika novērota stipra kolinearitāte. Tas tika pārbaudīts ar parametrisko Pīrsona korelāciju (DBH un DRC atbilda normālsadalījumam) un VIF koeficientu. Starp šiem lielumiem korelācija bija ļoti stipri pozitīva ($r=0.96$) un VIF arī ļoti augsts ($VIF=12.0$) – VIF lielāks par 10 liecina par stipru kolinearitāti (O'Brien, 2007). Tas nozīmē, ka abi koka diametri nevar atrasties vienā modelī no kolinearitātes izrietošo problēmu dēļ, kā pārlietu lielas standartklūdas, pazemināts regresoru koeficientu būtiskums, modeļa nestabilitāte. Lai izvērtētu, kurš no diametriem ir atbilstošāks, tika izveidoti līdzīgi modeļi, kur izmantots vai nu DBH, vai DRC, un visos gadījumos statistiskie rādītāji, lai arī minimāli un lielākoties nebūtiski, taču priekšroku deva krūšu augstuma diametram, tādēļ DRC tika atmests no tālākām analīzēm, un atstāts tikai DBH.

Tāpat mikrobiālās ekoloģijas analīzē pie ordinācijas grafiku izveides, lai parocīgi novērtētu stumbra diametra ietekmi, tie tika pārveidoti intervālu datos, sadalot tos trīs dažādās grupās: Tievs (DBH zem 21 cm), Vidējs (DBH no 21 līdz 29 cm neieskaitot) un Resns (29 cm un vairāk). Tas pats tika izdarīts ar mizas brūces izmēru, kur tas sadalīts četrās grupās: Maza (zem 10 cm²), Vidēji maza (no 10 līdz 25 cm² neieskaitot), Vidēji liela (no 25 līdz 40 cm² neieskaitot) un Liela (virs 40 cm²).

2.10. Induktīvās statistikas analīze

Lai noteiktu, vai pastāv atšķirības starp izolātu grupām to izraisītās infekcijas izpausmēs stumbra brūcēs un vertikālajā koksnes iekrāsojumā, tika izveidoti vispārinātie lineārie modeļi (GLM). Modeļi tika pielāgoti rezultējošā mainīgā statistiskajam sadalījumam. Stumbra brūču parametriem tas bija Gamma sadalījums, vispārināts ar log saistības funkciju. Jābilst, ka tika izmēģināti arī parastie lineārās regresijas modeļi (LM), taču gan to atlikuma vērtības neatbilda

Gausa sadalījumam (vai bija tālāk no tā nekā GLM modeļiem), gan to statistiskie rādītāji, kā AIC, BIC un Beiza faktors liecināja, ka GLM modeļiem ir lielākas priekšrocības.

Lai pārlicinātos, vai modelī izmantotajiem regresoriem ir būtiska nozīme datu variācijas skaidrošanā, tika izveidots tukšais jeb nulles modelis (t.i., kad atkarīgā mainīgā variāciju nosaka tikai intersepta vērtība), un nulles modelis salīdzināts ar interesējošo – tam izmantots LRT tests (angl. *likelihood ratio test*) no paketes 'lmtest' (v. 0.9.40) (Zeileis & Hothorn 2002). Ar šo metodi novērtēti primitīvākie no modeļiem, proti, ar vienu regresoru, jo pārējie sarežģītākie modeļi tika salīdzināti ar primitīvajiem modeļiem caur HĪ-kvadrāta testu, izmantojot R bāzes funkciju *anova* un norādot testa veidu "chisq" – tādā veidā noteikts, vai konkrētais modelis būtiski atšķiras no otra.

Lai padarītu stumbra brūces izmēra matemātisko modeli vēl precīzāku, tika izveidoti sarežģītāki, vispārinātie jauktā efekta modeļi (GLMM), izmantojot paketi 'lme4' (v. 1.1.32.) (Bates et al., 2015), tāpat pie sadalījuma saimes norādot Gamma sadalījumu ar logaritmisko saistības funkciju un par nejaušo efektu izmantojot atsevišķos kokus kā indivīdus. Šie un citi modeļi tika savstarpēji salīdzināti ar funkciju *model.comparison* no paketes 'flexplot', kura atbildē sniedza tādas kvalitātes kritērijus kā AIC, BIC un Beiza faktors.

Modeļu validitāte tika pārbaudīta ar vairākiem paņēmieniem. Statistiski – ja attiecīgo parametru skaidrojošais modelis deva atlikuma vērtības, kuras atbilda Gausa jeb normālajam sadalījumam, izmantojot Šapiro statistisko testu (Shapiro & Wilk, 1965), vai arī grafiski ar kvantiļu-kvantiļu testu novērtējot to izkārtojumu ap teorētisko Gausa sadalījuma slīpni – cik vienmērīgs un slīpnei līdzīgs ir atlikuma vērtību izkārtojums –, kā arī, ja histogrammā atlikuma vērtības veidoja tipisko zvanveida izkārtojumu, modelis tika uzskatīts par atbilstošu datu variācijas skaidrošanai. Bez atlikuma vērtību normalitātes tika pārbaudīta arī modeļa R^2 jeb izskaidrotā variācija, kas tika veikts ar funkciju *rsq* no paketes 'rsq' (v. 2.5).

Lai novērtētu, vai pastāv būtiskas atšķirības brūces Izmērā starp apstrādes grupām, tika veikts neparametriskais HĪ-kvadrāta tests ar R bāzes funkciju *anova*. Kad atrastas būtiskas atšķirības, tika veikts *post-hoc* tests izolātu savstarpējai pāru-veida salīdzināšanai. Tam izmantota funkcija *pairwise.wilcox.test* no R bāzes paketes 'stats', kas veica neparametrisko Vilkoksona ranku summu testu, kā p-vērtības pielāgojumu izvēloties Holma metodi, kas ir samērā konservatīva metode un labi kontrolē I tipa kļūdas pieļaušanu (Holm, 1979).

C. fuckeliana izolātu vertikālās izplatības modelēšanai netika izveidots Beta regresijas modelis, jo nav iespējams korekti prognozēt – vai arī tas ir ļoti sarežģīti un tikpat spekulatīvi – sēnes izplatību ārpus stumbra fragmentiem no esošajiem datiem. Taču, lai pārbaudītu, vai pastāv atšķirība starp apstrādes grupām to radītā koksnes iekrāsojuma garuma proporcijās, tika veikts HĪ-kvadrāta tests ar funkciju *chi.sq* no R bāzes paketes 'stats'.

2.11. Bioinformātikās analīzes

Tā kā egļu brūču koksnes serdeņu sekvencēšana notika divos atsevišķos piegājienos un abos tika izmantots tas pats adapteru-barkodu komplekts, tad arī bioinformātikās darbības līdz sekvenču sagrupēšanai paraugos solim sekvencēšanas piegājienam tika veiktas nošķirti.

Sākumā ar Seed2 programmu (Větrovský et al., 2018) tika atlasīti un paturēti tikai tie nolasījumi, kuros bija barkoda un praimera sekvenču gan sākumā, gan beigās. Sekvenču nolasījumi filtrēti pēc garuma (min=50n, max=800n). Turpmāk sekvenču datu apstrāde tika veikta programmā PipeCraft2 (Anslan et al., 2017), kur sekvenču sagrupēšanas paraugos ar "Cutadapt" rīku (minoverlap=15, mismatch=2) (Martin, 2011), ar to arī izgrieztas barkodu un praimeru sekvenču. Tālāk veikta *denovo* himēru meklēšana un to saturošo nolasījumu atmešana ar rīku "UCHIME" (Edgar et al., 2011). No iztīrītajiem nolasījumiem, izmantojot "ITS extractor" rīku (Bengtsson-Palme et al., 2013), tika atlasīts ITS2 reģions. Taksonomisko vienību klāsterus (OTU) tika veidots ar "vsearch" rīku (Rognes et al., 2016), veidoti OTU klāsteri (97% līdzības sliekšnis). Lai uzlabotu OTU kvalitāti un atbrīvotos no kļūdainiem OTU, tika veikta pēc-klāsterēšanas analīze ar algoritmu "LULU" (Frøslev et al., 2017) ar uzstādījumiem: minimālā sekvenču sakritība = 84%, minimālā relatīvā kopā-parādīšanās = 95%. OTU identificēšana tika veikta, izmantojot BLAST metodi un UNITE datubāzi (Abarenkov et al., 2010).

2.11.1. OTU un to taksonomiskās piederības un funkcionālo īpašību datu apstrāde

OTU saistīto ekoloģiski funkcionālo īpašību informācijas ieguvei tika izmantota FUNGuild programma (Nguyen et al., 2016).

R programmā, lai samazinātu zemas kvalitātes datu ietekmi datu kopā, no OTU tabulas tika izņemti tādi OTU, kuru sastopamības biežums datu kopā bija mazāks par 10 reizēm. Līdz ar tiem tika izņemtas arī sekvencēšanas (tehniskās) negatīvās kontroles. Taksonomiskās informācijas fails tika rediģēts ar R un MS Excel, lai tas saturētu informāciju tikai par atlasītajiem OTU, un tā formāts pielāgots optimālai operēšanai FUNGuild programmā. Līdz ar OTU tabulu, FUNGuild precizēto taksonomisko un funkcionālo īpašību tabulu R programmā tika ienesta arī paraugu metadatu tabula. Uz šīm datu tabulām tika balstīta tālākā šī maģistra darba OTU datu analīze, kas norisinājās R programmā.

2.11.2. Mikrobiālās ekoloģijas analīzes

Mikrobiālās ekoloģijas datu analīzei, kā alfa daudzveidība un vizualizācijai tika izmantota paketes 'phyloseq' (v. 1.42.0) (McMurdie & Holmes, 2013). Ekoloģiskās distances izveidei, ordinācijas grafikiem, mikrobiālās daudzveidības un statistiskajām analīzēm izmantota pakete 'vegan' (v. 2.6.4) (Oksanen et al., 2022).

Lai novērstu atšķirības starp paraugiem sekvencēšanas dziļumā, kas varētu būt saistītas ar tehnisku kļūmji radītām dažādu sekvenču nolasījumu skaita dēļ, OTU biežuma tabula tika normalizēta izmantojot kumulatīvās summas mērogošanu jeb CSS (angl. *cumulative sum scaling*) (Paulson et al., 2013). Visas analīzes tika balstītas uz normalizētajiem OTU datiem.

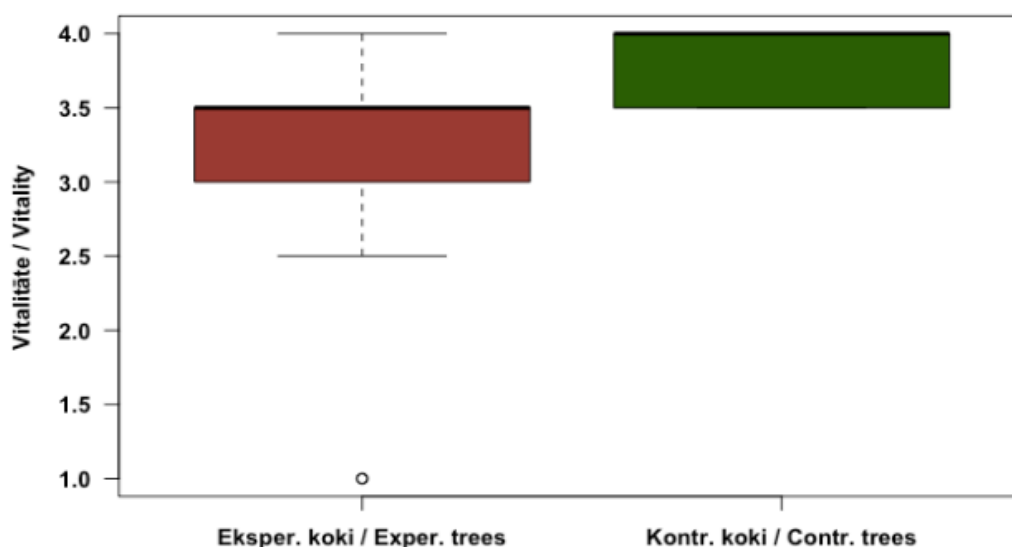
Paraugu alfa daudzveidības noteikšanai tika izvēlēti šādi rādītāji: novērotā OTU daudzveidība, Šenona koeficients un Inversais Simpsona koeficients. Lai novērtētu, vai starp paraugu apstrādes grupām pastāv būtiskas atšķirības alfa daudzveidībā, tika izmantots neparametriskais Kruskal-Wallis tests.

Lai aprakstītu beta daudzveidību starp dažādām paraugu grupām, kopējai OTU datu tabulai tika aprēķināta distanču matrice (funkcija 'vegdist'), izmantojot Breja-Kurtisa (angl. *Bray-Curtis*) metodi, kas tolerē 0 vērtības un ir atbilstoša normalizētiem datiem (Bray & Curtis, 1957). Tā tika izmantota ordinācijas grafika izveidei, lai reducētu paraugu multidimensionalitāti uz divām dimensijām un ērti to vizualizētu. Šim nolūkam tika izveidots nemetriskās multidimensionālās ranžēšanas ordinācijas grafiks (Non-metric Multidimensional Scaling, NMDS) ar funkciju 'metaMDS'. Lai tālāk statistiski novērtētu, vai grafikā datu punktu klāsteru atšķirības starp to centroīdiem ir būtiskas, tika veikta permutāciju multivariētā ANOVA (Permutational Multivariate Analysis of Variance, PERMANOVA) ar funkciju 'adonis2' no 'vegan' paketes. Pārbaudot paraugu Izolāta grupu atšķirības, šeit tika izmantots papildarguments 'strata', norādot paraugu saistību caur eksperimentālajiem kokiem, pārējos gadījumos tas netika izmantots. PERMANOVA testa rezultātiem tika arī novērtētas paraugu datu punktu atšķirības dispersijās. Tam tika izmantota funkcija 'betadisper' no 'vegan' paketes. Pēc būtiska PERMANOVA testa tika veikta klašu pāru salīdzināšana ar funkciju 'pairwise.adonis' no paketes 'pairwiseAdonis' (v. 0.4) (Arbizu 2020).

3. REZULTĀTI

3.1. Vispārējais audzes raksturojums un egļu vitalitāte

Egļu audzes vidējais augstums bija 24.6 ± 3.6 m. Salīdzinot eksperimenta koku vitalitāti ar blakusesošajiem neapstrādātajiem kokiem, novērotās atšķirības nebija pārāk lielas, taču pietiekami lielas, lai uzrādītos statistiski būtiska atšķirība starp eksperimenta koku grupu un neapstrādāto kontroles koku grupu ($p = 0.011$) (skat. 2. attēlu). Galvenokārt novērota skuju hloroze un skuju vainaga retināšanās, mizas atlupšana novērota pavisam retos gadījumos.



3. attēls. Vitalitātes atšķirības starp eksperimentālo koku un kontroles koku grupām.

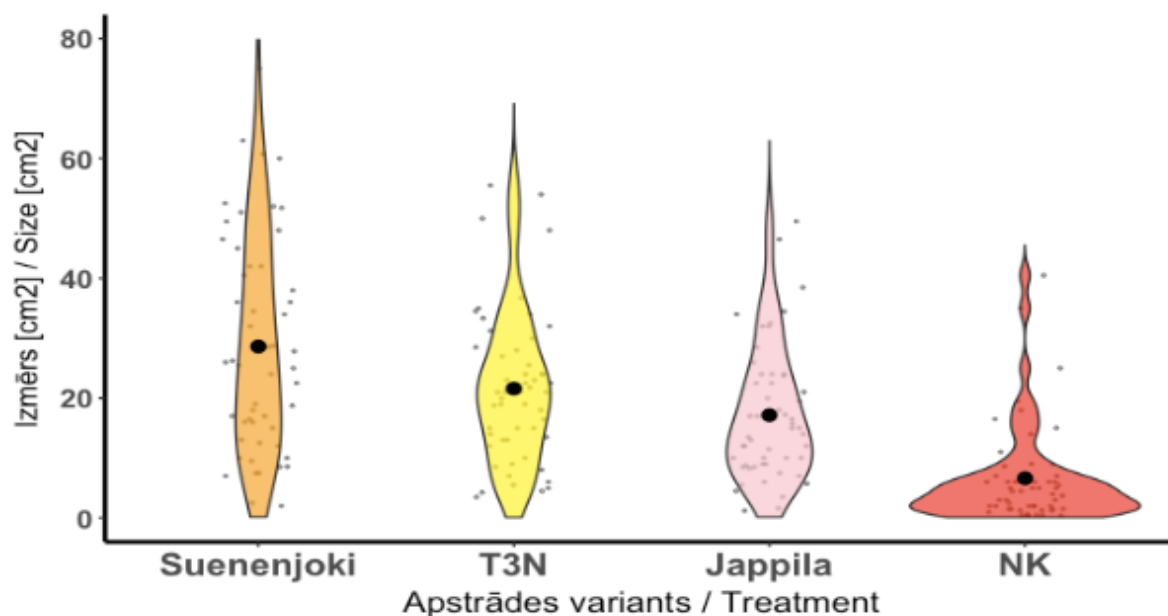
Figure 3. Differences in vitality between experimental tree and control tree groups.

3.2. Mizas brūču izmēri un koksnes vertikālās iekrāsošanās distances

10 gadus pēc inokulācijas brūces bija izveidojušās visiem 54 eksperimenta kokiem katrā apstrādes variantā ar sveķu izdalījumiem no brūces zonas. Salīdzinot mizas brūču izmērus starp apstrādes veidiem, tika noskaidrots, ka pastāv stipri būtiskas atšķirības starp negatīvo kontroli un pārējiem 3 izolātiem ($p < 0.0001$). Vienīgais izolātu pāris, kuri būtiski atšķīrās pēc izmēra bija Suenenjoki un Jappila ($p = 0.0015$) (skat. 4. attēlu).

Suenenjoki izolāta radīto mizas brūču laukuma izmēra vidējā vērtība bija 28.6 ± 17.8 cm², kas bija visaugstākā. Izolāts ar nākamo lielāko vidējo vērtību bija T3N ar 21.6 ± 12.5 cm, kam sekoja Jappila ar 17.2 ± 11.0 cm². Negatīvajai kontrolei brūces izmēra vidējā vērtība bija 6.6 ± 8.8 cm². Tomēr atsevišķos gadījumos viena koka ietvaros negatīvās kontroles brūces bija lielākas nekā ar *C. fuckeliana* izolātiem apstrādātajās, it īpaši Jappila izolātā, kur tas novērots 17% gadījumu (9/54), abiem pārējiem izolātiem tas bija 6% gadījumu (3/54). Brūču izmēriem

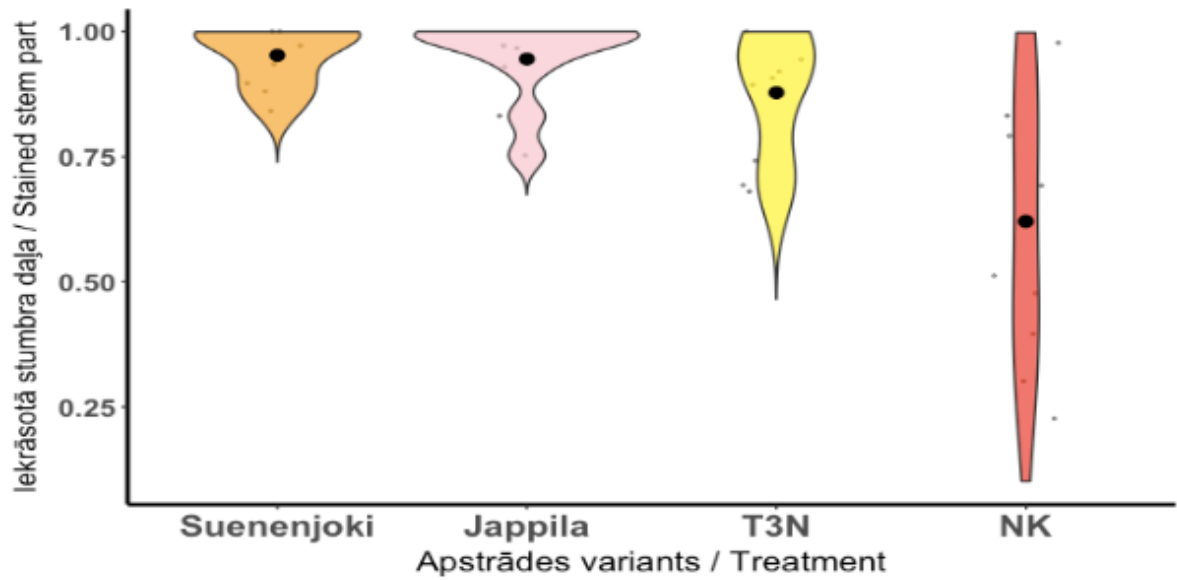
ir samērā lielas vērtību amplitūdas un to apmēri nav vienmērīgi apstrādes grupās. Suenenjoki izolāta radīto mizas brūču izmēriem bija vislielākā vērtību amplitūda – no 2.0 līdz 75.0 cm². Jappila un T3N izolātiem tā savukārt bija līdzīgāka: attiecīgi no 1.2 līdz 49.5 cm² un no 3.5 līdz 55.5 cm². Negatīvās kontroles grupā tā bija nedaudz mazāka: no 0.4 līdz 40.5 cm², kā arī kopumā izmēru vērtības ar uzskatāmi lielāku mazo vērtību īpatsvaru.



4. attēls. Apstrādes grupu izraisīto mizas brūču izmēru vijoļveida diagrammas.

Figure 4. Violin plots of wound size by treatment groups.

Vertikālās koksnes iekrāsošanās datus atšķirības starp izolātiem bija neskaidrākas, jo vairumā gadījumu iekrāsojums tika konstatēts viscaur stumbra fragmentam (5. attēls). Novērtējot stumbra šķērsriezumus, atkrāsojums bija novērojams būtībā virs inokulācijas brūces vietas, un visspilgtākais tas bija Suenenjoki un Jappila izolātiem (6. attēls). Interessants novērojums – pāris gadījumos stumbra ripās zonā virs inokulācijas vietas novērota aplievas koksnes sarūkšana uz kodolkoksnes rēķina (S14. attēls). Iekrāsojuma distances ziņā vismazākās iekrāsošanās pēdas uzrādīja negatīvās kontroles grupa, ko grafikā parāda garā mazo vērtību amplitūdas aste. Neatkarīgi no tā, arī negatīvās kontroles grupā bija gadījumi, kad iekrāsojums tika novērots visā stumbra fragmenta garumā. Augstākās vērtības, un savstarpēji ļoti līdzīgas, iekrāsotajā stumbra daļā bija Suenenjoki un Jappila izolātiem, tomēr Hī-kvadrāta testā netika atrasta būtiska atšķirība starp nevienu eksperimenta grupu šajā parametrā ($p = 0.41$).



5. attēls. Apstrādes grupu koksnes iekrāsošanās vertikālās distances vijoļveida diagrammas.
Figure 5. Violin plots of vertical colouration of woody tissues by treatment groups.



6. attēls. Skenētā ripa 7. kokam 24 cm zem inokulācijas vietas;
 oranžs – Suenenjoki, rozā – Jappila, dzeltens – T3N, sarkans – negatīvā kontrole.
Figure 6. Scanned trunk disc of tree 7, 24 cm under the inoculation point;
 orange – Suenenjoki, pink – Jappila, yellow – T3N, red – negative control.

3.3. Micēlija saglabāšanās koksnē un DNS izdalīšanas

Micēlija saglabāšanās koksnē bija visai nevienmērīga starp izolātiem (skat. 1. tabulu). No brūces izurbtā serdeņa vislielākā sekmība *C. fuckeliana* izdalīšanā bija Jappila izolātam (61%), kamēr pārējiem izolātiem un negatīvajai kontrolei tā bija līdzīga – no 32 līdz 39%. No brūces zonas stumbra fragmentu ripās augstākā sekmība izdalīšanā bija Suenenjoki izolātam (57%), ievērojami zemāka tā bija Jappila un T3N izolātiem, attiecīgi 43% un 29%, taču negatīvajai kontrolei tā bija krietni zemāka – 14%. No brūces zonas garengriezumos negatīvo kontroli izdalīt neizdevās, taču visiem pārējiem izolātiem izdalīšanas sekmība bija 25%, tomēr jābilst, ka šinī gadījumā izmantoto stumbru fragmentu skaits bija mazs, tikai 2 (no katra pa 2 – virs un zem brūces), tādēļ garengriezumu rezultāti nav pārāk uzticami.

1. tabula. *C. fuckeliana* micēlija izdalīšanas no koksnē audiem sekmība.

Table 1. Success of isolating *C. fuckeliana* mycelium from woody tissues.

Izolāts	No brūces serdeņa	No brūces zonas ripās	No brūces zonas gargriezumā	No pēdējās atkrās. vietas	No pēdējām koksnē izmaiņām
Suenenjoki	23%	57%	25%	0	12%
T3N	21%	29%	25%	0	24%
Jappila	39%	43%	25%	0	0
NK	21%	14%	0	8%	0

Tāpat no garengriežumiem neizdevās izdalīt micēliju ārpus brūces robežām, tomēr tas daļēji izdevās no ripām. Interesanti, ka sekmīgāka izdalīšana notika tieši no pēdējām vizuāli izmainītās koksnē zonām, nevis pēdējām skaidrā sēnes atkrāsojuma zonām. Vienīgais gadījums, kad izdevās izdalīt *C. fuckeliana* no pēdējā atkrāsojuma, bija ar negatīvo kontroli 24. kokā, 18 cm zem infekcijas vietas. Tomēr no vietas stumbra koksnē, kur novērotas pēdējās koksnē izmaiņas, *C. fuckeliana* kultūru izdevās izdalīt biežāk, un tas sanāca tikai ar Suenenjoki un T3N izolātiem. No 24. koka abus izdevās izdalīt 34 cm attālumā zem inokulācijas vietas. Abi minētie izolāti tika izdalīti arī no 7. koka 38 cm zem inokulācijas vietas un no 37. koka 17 cm virs izolācijas vietas. No T3N izolāta *C. fuckeliana* izdevās izolēt no 23. koka abos tā fragmenta galos – 17 cm zem infekcijas vietas un 45.5 cm virs tās.

DNS izdalīšana no brūces koksnē serdeņiem sanāca ar dažādu sekmību. No 176 paraugiem 14 bija tādi, kuriem DNS koncentrācija bija pāri 30 ng/μL, pārējiem tā bija pārsvarā līdz 10 ng/μL, mediāna paraugu DNS koncentrācijai – 6.6 ng/μL. Izdalītās DNS absorbcijas spektra 260/280 attiecība bija vienmērīgāka un vairumā gadījumu robežās no 1.04 līdz 1.71, no

visiem paraugiem divi bija zem un četri paraugi – virs šīm robežām. DNS 260/280 absorbcijas mediāna bija 1.34.

DNS izdalīšanas metodes optimizācija nedeva pārlicinošu sagaidāmo rezultātu – augstāku DNS koncentrāciju un labāku kvalitāti. Visās metodikas modifikāciju grupās bija liela mainība koncentrācijā – visās grupās, izņemot 2. grupu (48%), standartnovirzes bija >50% no vidējās vērtības, un to robežās, tāpat kā 260/280 absorbcijas attiecībai, metodes neatšķīrās (S2. un S3. attēli).

3.3.1. Mikroskopisko sēņu izolāti no serdeņiem

Heterobasidion ģints kultūras tika izdalītas no brūču serdeņiem samērā reti un tikai no Jappila un T3N izolātiem (2. tabula). Vēlākās taksonomiskajās analīzēs atklājās, ka visi paraugi pieder *H. parviporum* (S4. attēls). No brūces serdeņiem gandrīz visos no 8 gadījumiem, kad izdevās izdalīt *Heterobasidion*, no tā paša serdeņa izdevās izolēt arī *C. fuckeliana* kultūru, tikai divos gadījumos T3N izolātā *C. fuckeliana* kopā ar *H. parviporum* neizdevās.

Daudz biežāk par *H. parviporum* izdevās izdalīt *Trichoderma* ģints kultūras, kopumā zem 20% gadījumu un samērā līdzīgi starp apstrādes grupām, tomēr relatīvi mazāk no Jappila izolāta. Visbiežāk izdalītā ne-*Corinectria* sēņu ģints no brūču serdeņiem bija *Penicillium*, aptuveni ceturtajā daļā gadījumu (34 no 44 kokiem). Līdzīgi kā ar *Trichoderma* Jappila izolātam *Penicillium* izdalīšana bija ar zemāko sekmību, kamēr pārējiem izolātiem tā bija samērā līdzīga. *Ascocoryne* visbiežāk tika izdalīta tieši no T3N izolāta serdeņiem, pārējiem 2 izolātiem sekmība bija aptuveni uz pusi zemāka, un negatīvajai kontrolei vēl zemāka. *Sarea* ģints kultūras izdalītas samērā reti un visbiežāk Jappila izolātam, Suenenjoki un T3N sekmība līdzīga, taču zemāka, negatīvajā kontrolē to izdalīt nemaz neizdevās. Viszemākā izdalīšanas sekmība bija *Mucor* ģints sēnēm, un tikai vienā gadījumā no 44 Jappila izolātam un divos – negatīvajai kontrolei.

Atsevišķos gadījumos tika izdalītas arī *Umbelopsis isabellina*, *Phialocephala* sp., *Cladosporium* sp., kā arī dažas citas sugas, taču tikai vienu vai divas reizes.

2. tabula. Citu sēņu micēlija izdalīšanas no brūču serdeņiem sekmība.

Table 2. Success of isolating other fungi mycelium wound cores.

Izolāts	Heterobasidion	Trichoderma	Penicillium	Ascocoryne	Sarea	Mucor
Suenenjoki	0	18%	25%	11%	5%	0
T3N	9%	16%	27%	21%	5%	0
Jappila	9%	11%	18%	11%	9%	2%
NK	0	16%	23%	7%	0	5%

Gandrīz katrs ceturtais koks celma augstumā saturēja *Heterobasidion* (24%), dažu koku celmiem bija arī vizuāli novērojamas trupes pazīmes. *Trichoderma* tika izdalīta no 37% celmu, *Mucor* saturēja gandrīz puse no visiem celmiem (48%). *C. fuckeliana* izdevās izolēt no koku celmiem 19% gadījumos.

Katrā *Heterobasidion*-pozitīvā mizas brūces serdenī *Heterobasidion* tika novērots arī attiecīgā koka celmā. Tomēr celma augstumā *Heterobasidion* no viena un tā paša koka kopā ar *C. fuckeliana* tika izdalīts tikai vienu reizi.

3.4. Mizas brūces modeļi

Sākotnēji izveidotais vienkāršais GLM modelis pie regresoriem saturēja tikai apstrādes grupu, un tā izskaidrotā variācija bija samērā zema ($R^2=0.20$). Tad modelis tika papildināts ar koka stumbra diametru krūšu augstumā DBH, rezultātā izskaidrotā variācija nedaudz pieauga ($R^2=0.22$). Taču palielinot sarežģītības līmeni vēl vairāk un pievienojot vēl nejaušo efektu – koki kā indivīdi, kas principā nosaka, ka rezultējošā mainīgā brūces *izmērs* intersepta vērtība var mainīties starp atsevišķiem kokiem –, izskaidrotā variācija pieauga dramatiski. Klāt fiksēto efektu variācijai $R_{\text{fxd}}^2 = 0.22$ nāca arī nejaušo efektu $R_{\text{rnd}}^2 = 0.21$, kas rezultātā deva kopējo izskaidroto variāciju $R_{\text{tot}}^2 = 0.42$. No tā var secināt, ka 42.4% koka ārējo brūču izmēra mainības noteica izmantotais sēnes izolāts, stumbra diametrs krūšu augstumā un citas koka individuālās iezīmes.

Salīdzinot šo minēto trīs modeļu iekšējo balansu starp atbilstību datu variācijai (angl. *goodness-of-fit*) un sarežģītības pakāpi, nepārprotami labāks bija GLMM modelis ar nejaušo efektu, jo tā statistiskie kritēriji AIC, BIC un Beiza faktors bija uzskatāmi labāki par abu minēto modeļu statistiskajiem rādītājiem, tādēļ GLMM modelis, kurā pie fiksētajiem efektiem bija sēnes izolāts un koka stumbra diametrs krūšu augstumā, un ar individuālo koku kā nejaušo efektu, tika uzskatīts kā optimālais modelis. Kaut arī optimālā GLMM modeļa atlikuma vērtības grafiski bija mazliet ārpus kvantiļu-kvantiļu testa Gausa sadalījuma līknes tās abos galos, atlikuma vērtības visiem modeļiem atbilda Gausa sadalījumam (S4. un S5. attēli).

No apstrādes grupām gadījumos, kad apstrāde bija negatīvā kontrole GLMM modeļa regresoru līmeņu ietekmes ziņā tās ietekme bija negatīva, tādēļ tā tika izņemta no regresijas vienādojuma. Rezultātā formula, pēc kuras iespējams prognozēt brūces izmēru pēc 10 gadu ilgas sēnes augšanas inokulētā stumburā, ir sekojoša:

$$\text{Izmērs (cm}^2\text{)} \sim 1.37 \cdot \text{T3N} + 1.16 \cdot \text{Jappila} + 1.65 \cdot \text{Suenenjoki} + 0.04 \cdot \text{DBH} + z + \varepsilon, \quad (1)$$

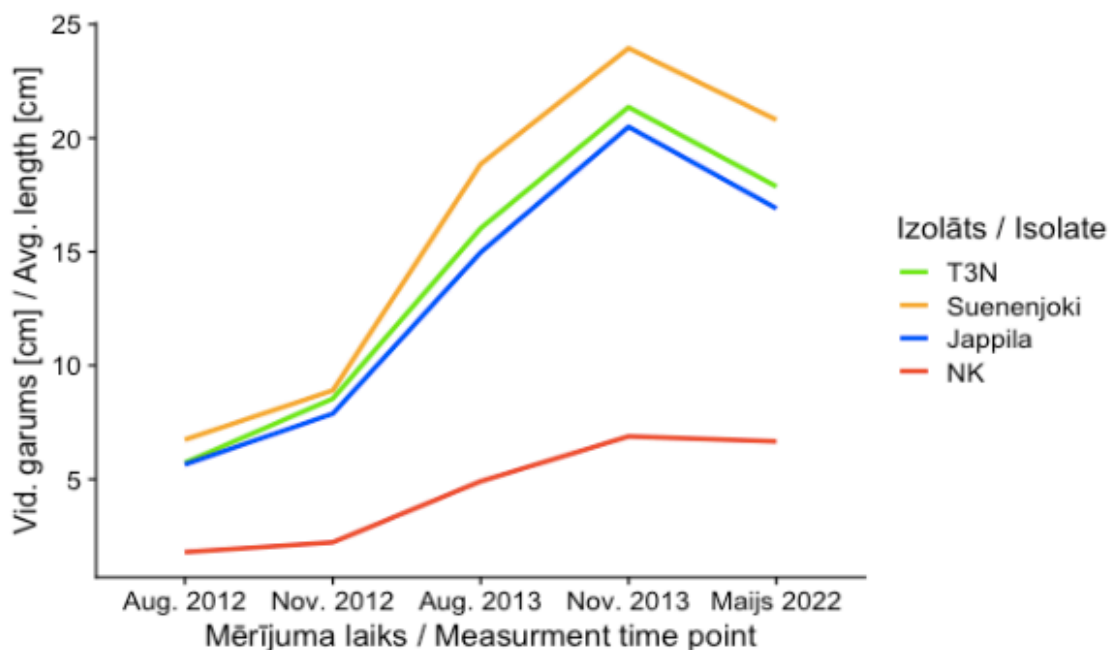
kur z ir nejaušais efekts (kokam individuāli) un ε ir kļūda.

Jāmin, ka tika mēģināts modelī iekļaut datus no koku celmu mikrobioloģiskajām kultūrām, proti, tādu sugu kā *Heterobasidion* sp., *Trichoderma* sp. un *Mucor* sp. klātbūtne, taču modelis atļāva izmantot tikai vienu sugu vienlaicīgi, un visos gadījumos, salīdzinot šos modeļus ar 1. formulā norādīto, to statistiskie rādītāji izmainījās minimāli un būtībā liecināja pret to izmantošanu.

3.5. Brūču attīstības dinamika

Pirmajā gadā pēc inokulācijas (2012. gada augustā) 11 kokiem nebija izveidojušās stumbra vēža pazīmes nevienā no apstrādes grupām. Divus mēnešus vēlāk, tā paša gada novembrī stumbra vēža pazīmes nebija izveidojušās tikai trijiem kokiem. Otrā gada beigās, augustā stumbra vēža simptomi bija sastopami uz visiem kokiem, taču 34 kokiem vēl nebija izveidojušies brūču simptomātika kādā no apstrādes variantiem; pārsvarā tās bija negatīvās kontroles, taču 5 kokos arī Jappila izolātam un pa vienam kokam Suenenjoki un T3N izolātiem. Trešā gada sākumā, 2013. gada novembrī stumbra vēža simptomu nebija tikai negatīvās kontroles grupā un divos kokos Jappila izolātam. Eksperimenta beigās stumbra vēža izpausmes tika novērotas visos kokos visām apstrādes grupām.

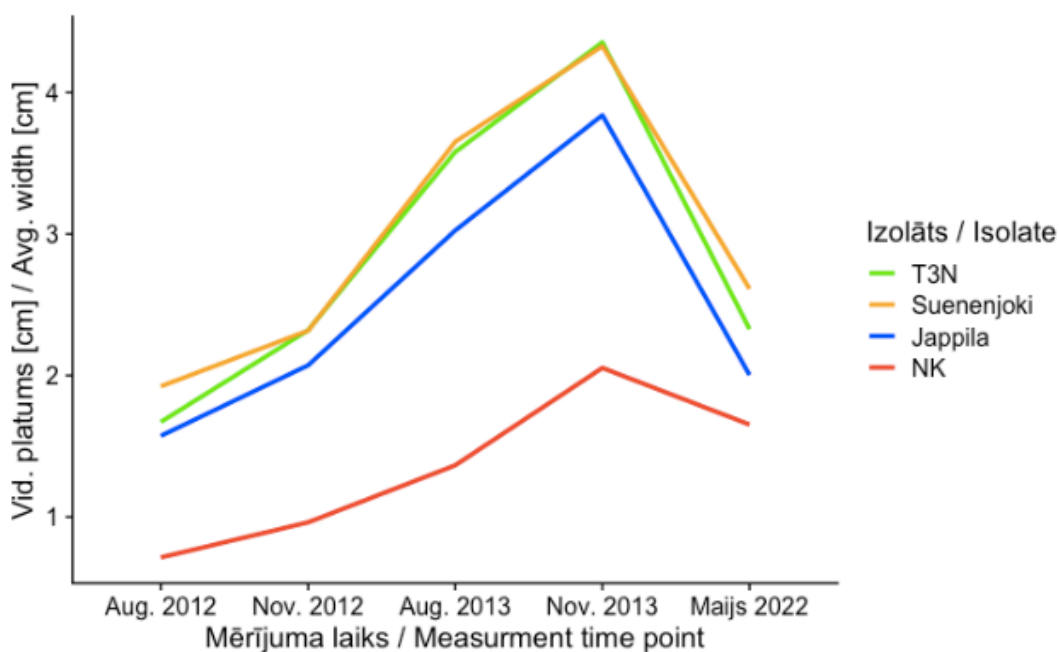
Gadu pēc egļu inokulēšanas (2012. gada augustā) stumbra brūču garums uzskatāmi atšķīrās negatīvajai kontrolei – tas bija vidēji 1.8 cm, taču vairumā gadījumu brūces attīstība nebija novērojama (mediāna 0 cm) – no pārējiem trim sēņu izolātiem, kuriem brūces garumā vidēji bija ap 5.6 – 6.7 cm. 2012. gada novembrī sēņu izolātiem garuma pieaugums bija līdzīgs par ~2.5 cm, kamēr negatīvai kontrolei tas bija ~0.5 cm un joprojām vairumā gadījumu nebija brūces simptomu (mediāna 0 cm). Savukārt pēc infekcijas otrā gada sākuma līdz trešā gada sākumam novērota visstraujākā attīstība brūces garumā, kur periodā no 2012. gada novembra līdz 2013. gada augustam: par aptuveni 7 – 10 cm sēņu izolātiem un 2.5 cm negatīvajai kontrolei, un arīdzan strauji no 2013. gada augusta līdz tā paša gada novembrim: par 5 – 5.5 cm visiem izolātiem un ~2 cm negatīvajai kontrolei. Eksperimenta beigās brūču garums visās grupās uzrādīja samazinājumu. Periodā no trešā gada sākuma līdz 10. gada beigām sēņu izolātu grupā brūces garums saruka par 3.5 – 4.0 cm (16 – 18%), un negatīvās kontroles grupā pavisam mazliet – par 0.2 cm (3%). Lai atvieglotu datu vizuālo uztveri, grafikam tika noņemti standartnoviržu stabiņi, jo datos bija liela variācija un stabiņi pārklājās viens ar otru. Vienīgā vieta, kur standartnovirzes robežās brūču izmēri bija atšķirīgi, bija 2022. gada maijā Suenenjoki izolātam un negatīvajai kontrolei.



7. attēls. Mizas brūču garuma dinamika pirmajos 3 gados un eksperimenta beigās.

Figure 7. Bark wound length dynamics during the first 3 years and at the end of experiment.

Samērā līdzīga aina tika novērota brūces platuma dinamikā – brūces platuma vērtības visstraujāk pieauga periodā pēc otrā gada sākuma (2012. gada novembris) līdz trešā gada sākumam (2013. gada novembris): 1.8 –2.0 cm *C. fuckeliana* izolātiem un 1.1 cm negatīvajai kontrolei (8. attēls). Tāpat arī negatīvajai kontrolei 2012. gada augustā un novembrī bija vismaz uz pusi zemākas brūces platuma vērtības, attiecīgi 0.7 cm un 1.0 cm, vairumā gadījumu brūču nebija nemaz (mediāna 0 cm). *C. fuckeliana* izolātiem 2012. gada augustā tās bija no 1.6 līdz 1.9 cm un novembrī – no 2.1 līdz 2.3 cm. Periodā no trešā gada sākuma līdz 10. gada beigām, līdzīgi kā ar brūces garumu, platums uzskatāmi saruka: par 1.7 – 2.0 cm (40 – 48%) *C. fuckeliana* izolātiem, taču atšķirībā no brūces garuma negatīvās kontroles brūces platums pēdējā posmā saruka ievērojami par 0.4 cm (20%). Brūces platuma vērtībās bija lielas standartnovirzes, tādēļ to stabiņi tika izņemti no grafika optimālai vizualizācijai. Visos laika punktos visām eksperimenta grupām standartnoviržu stabiņi pārklājās.



8. attēls. Mizas brūču platuma dinamika pirmajos 3 gados un eksperimenta beigās.

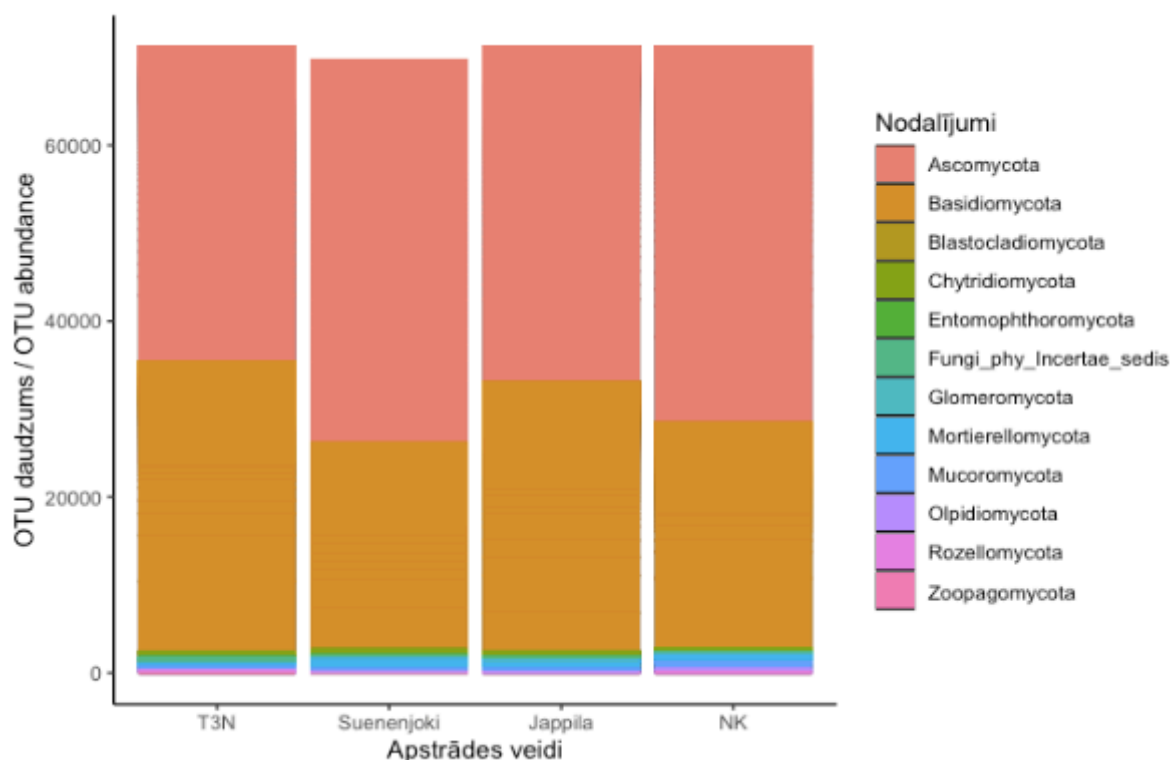
Figure 8. Bark wound width dynamics during the first 3 years and at the end of experiment.

3.6. Bioinformātiskās analīzes

Sākotnēji iegūtā OTU tabula saturēja 3398 dažādus OTU, taču pēc post-klāsterēšanas manipulācijas apkopotai vai atmeti tika 572, pāri paliekot 2826 dažādiem OTU. Tā kā vienam OTU 56. koka Jappila izolāta apstrādes brūcē bija neticami augsta vērtība, kas veidoja vairāk kā pusi no kopējā visas apstrādes grupas OTU daudzuma, tā OTU tabulā tika pārveidota par 0.

3.6.1. Taksonomisko nodalījumu sastāvs apstrādes grupās

Paraugos novēroto OTU taksonomiskā daudzveidība visās eksperimenta grupās liecināja par skaidru askusēņu un bazīdijsēņu nodalījumu dominanci, kur pirmo vietu ieņēma askusēnes (skat 9. attēlu un 3. tabulu). Pēc Ascomycota un Basidiomycota nodalījumiem, secībā nākamie nodalījumi katrs sastādīja mazāk par 2% un to relatīvais biežums bija atšķirīgs eksperimenta grupām: ar *C. fuckeliana* izolātu Suenenjoki vai Jappila inokulētajā koksne nākamo biežāko nodalījumu veidoja *Mortierellomycota* sēnes, turpretī T3N izolātam – tās bija sēnes ar neatpazītu nodalījumu; negatīvās kontroles grupā trešo vietu ieņēma *Mucoromycota* nodalījums. Ceturto biežāk izplatīto nodalījumu katrā no 3 izolāta grupām veidoja *Chytridiomycota*, kamēr negatīvās kontroles grupā ceturto vietu ieņēma *Mortierellomycota* (skat. 3. tabulu).



9. attēls. Normalizētais OTU skaits paraugos apstrādes grupās, iekrāsots pa OTU taksonomiskajiem nodalījumiem.

Figure 9. Normalized count of OTU in samples of experimental groups, coloured by the fungal phylum.

3. tabula. Sēņu nodalījumu relatīvais daudzums apstrādes grupās un kopumā.

Table 3. Relative abundance of fungal phyla in treatment groups and in total.

Nodalījums	Kopējais datos, %	T3N iz., %	Suonenjoki iz., %	Jappila iz., %	Negat. kontr., %
Ascomycota	56.72	50.32	62.41	54.31	59.97
Basidiomycota	39.63	46.34	33.80	42.20	36.04
Blastocladiomycota	0.02	0.00	0.01	0.08	0.01
Chytridiomycota	0.82	0.76	1.06	0.87	0.61
Entomophthoromycota	0.07	0.21	0.00	0.00	0.08
Fungi_phy_Incertae_sedis	0.55	0.84	0.42	0.58	0.37
Glomeromycota	0.04	0.00	0.00	0.00	0.14
Mortierellomycota	1.12	0.50	1.63	1.34	1.00
Mucoromycota	0.64	0.50	0.43	0.48	1.16
Olpidiomycota	0.26	0.21	0.18	0.07	0.56
Rozellomycota	0.12	0.33	0.03	0.08	0.04
Zoopagomycota	0.01	0.00	0.04	0.01	0.00

3.6.2. Izplatītākās ģintis apstrādes grupās

10 vispārstāvētākās ģintis katrā no apstrādes grupām ir attēlotas grafikos (attēli nr. 10.-13.). Ar oranžīgiem toņiem ir iekrāsotas tās ģintis, kurām ir saistība ar koksnes trupi. Ar dzeltenīgiem – tās ģintis, kurām nav tiešas saistības ar trupi, tomēr piemīt zināma patogenitāte uz augiem; ar zaļganiem toņiem – tās sugas, kurām nav zināma patogenitāte uz kokiem. Atstātas pelēkā krāsā ir tās ģintis, kuru saistība ar augiem nav pilnīgi skaidra vai to taksonomiskās identifikācijas līmenis ir nepietiekams, lai spriestu par to ekoloģisko nozīmi. Zilā tonī iekrāsotas tās ģintis, kurām ir zināma spēja iekrāsot koksni.

Kopumā 13 izplatītākās sēņu ģintis *P. abies* brūču koksne, veidoja no 55 līdz 61% apstrādes grupas OTU; to relatīvais biežums norādīts 4. tabulā.

4. tabula. Izplatītāko ģinšu relatīvais biežums apstrādes grupu *P. abies* brūču koksne.

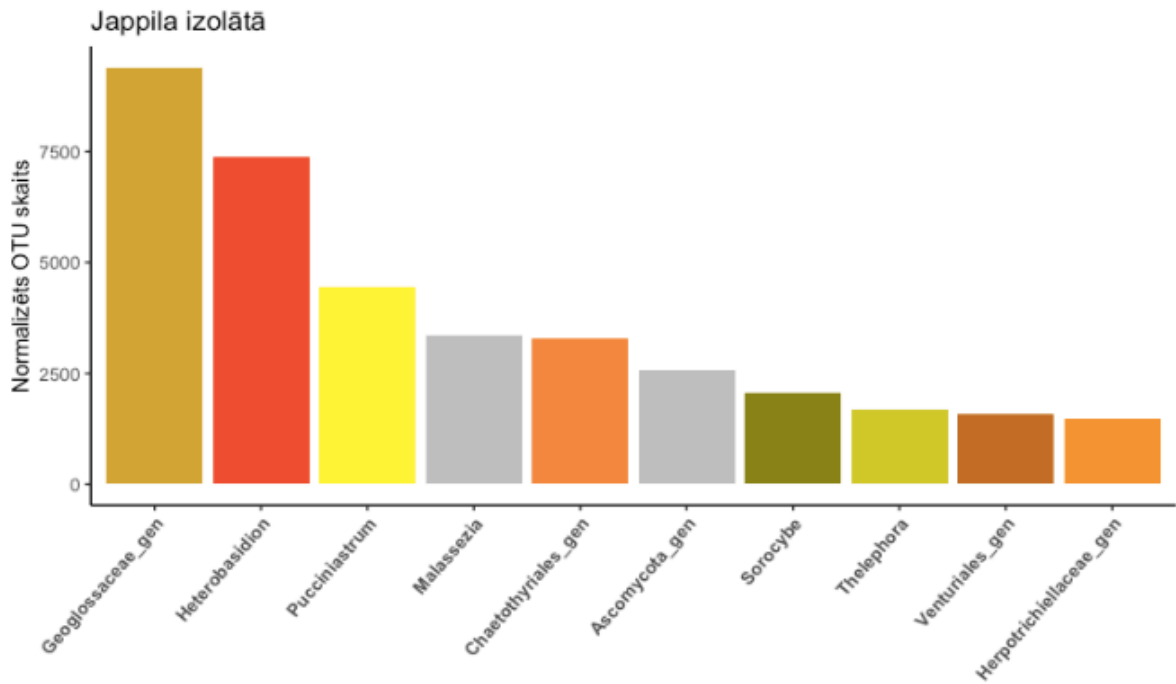
Table 4. Most abundant genera in treatment groups from the wood of *P. abies* wounds.

Ģintis	Trofiskais veids	T3N izolātā, %	Suonenjoki izolātā, %	Jappila izolātā, %	Negatīvajā kontrolē, %
Geoglossaceae_gen	Saprotrofs	10.6	10.0	13.4	13.7
Heterobasidion	Saprotrofs	15.1	8.6	10.5	12.8
Pucciniastrum	Patotrofs	4.6	4.6	6.3	4.5
Chaetothyriales_gen	NA	5.4	5.1	4.7	5.7
Sorocybe	Saprotrofs	3.3	5.5	2.9	2.9
Ascocoryne	Saprotrofs	3.2	2.6	1.6	5.3
Malassezia	Patotrofi-saprotrofs	4.8	4.8	4.8	4.0
Lophium	Saprotrofs	2.2	3.1	2.1	1.2
Herpotrichiellaceae_gen	Patotrofi-saprotrofs	2.4	2.6	2.1	2.4
Ophiostoma	Patotrofs	0.6	2.9	0.8	1.0
Venturiales_gen	NA	2.0	1.8	2.2	2.6
Thelephora	Saprotrofi-simbiotrofs	1.3	1.8	2.4	2.1
Neonectria	Patotrofs	2.0	3.2	1.0	2.7
Kopā:		57.5	56.6	54.8	60.9

Kopumā taksonomiskā aina bija visai līdzīga apstrādes grupu starpā: visās grupās divas pārstāvētākās ģintis bija neatpazīta ģintis no *Geoglossaceae* dzimtas un *Heterobasidion*, un visās grupās starp 10 izplatītākajām ģintīm bija tādas kā *Pucciniastrum*, *Sorocybe*, *Malassezia* un nenoteikta *Chaetothyriales* kārtas ģintis. Suonenjoki izolātā abas vispārstāvētākās ģintis veidoja mazāku vērtību atšķirību, salīdzinot ar nākamajām izplatītākajām ģintīm – tās sastādīja 18.6% no šīs apstrādes grupas OTU kopskaita. Negatīvajā kontrolē šī atšķirība bija visuzskatāmākā, tomēr statistiski līdzīga ar Jappila un T3N izolātiem, proti, visos pirmās divas ģintis veidoja 23.8-26.8% no katras apstrādes grupas OTU kopskaita. *Heterobasidion* veidoja

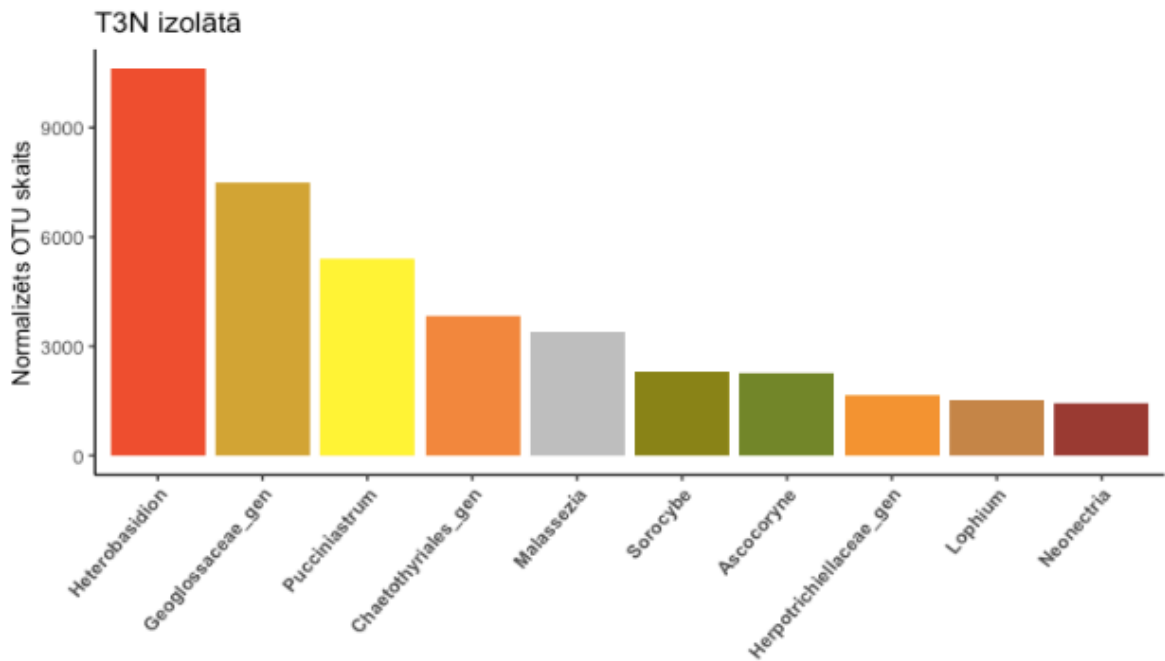
vislielāko īpatsvaru T3N izolātā ar 15.1% no visiem OTU, kam sekoja negatīvā kontrole ar 12.8%, *Pucciniastrum* ģints visizplatītākā bija T3N un Jappila izolātos, attiecīgi 7.6% un 6.3% no visiem OTU, kamēr Suenenjoki un negatīvajā kontrolē tā bija 4.5-4.6%. Interesanti, ka Suenenjoki izolāta grupā tika novērota visaugstākā *Sorocybe* ģints pārstāvētība – 5.5%, kamēr pārējās grupās tā bija 2.9-3.3% no apstrādes grupas OTU. Tāpat tikai Suenenjoki izolātā starp izplatītākajām ģintīm atrasta *Ophiostoma*, veidojot 2.9% OTU. Pārējās grupās *Ophiostoma* sastādīja 0.6-1.0% OTU. Nenoteiktā *Chaetothyriales* klases ģints apstrādes grupās bija līdzīgā īpatsvarā – no 4.7% līdz 5.7%. Suenenjoki un T3N apstrādes grupās starp izplatītākajām atrasta arī *Lophium* ģints, attiecīgi 3.1% un 2.2% OTU kopskaitā, arī Jappila izolātā, lai arī neparādījās starp izplatītākajām ģintīm, tā veidoja 2.1% no OTU kopskaita. Tomēr negatīvajā kontrolē *Lophium* bija mazāka pārstāvētība – 1.2%. T3N un Jappila izolātos starp izplatītākajām atrasta arī nenoteikta *Herpotrichiellaceae* dzimtas ģints, attiecīgi 2.4% un 2.1% OTU, līdzīgā apmērā tā bija negatīvajā kontrolē (2.4%) un Suenenjoki izolātā (2.6%), taču nav redzamas grafikos, jo ierindojās tieši ārpus 10 izplatītākajām ģintīm. Negatīvās kontroles grupā uzskatāmi augstākā skaitā bija *Ascocoryne* ģints, veidojot 5.3%, kamēr *C. fuckeliana* apstrādes grupās bija robežās no 1.6% līdz 3.2%, kur augstākā vērtība bija T3N izolātam, nedaudz zemāk tā bija Suenenjoki izolātā ar 2.6% un vismazākajā apmērā – Jappila izolātā, veidojot 1.6%. Mazākā apmērā, taču arī starp izplatītākajām ģintīm novērotas tika arī tādas kā nenoteikta *Venturiales* kārtas ģints un *Thelephora*. Nenoteiktā *Venturiales* kārtas ģints nedaudz augstākā relatīvajā biežumā novērota negatīvajā kontrolē nekā *C. fuckeliana* izolātos. Tikai Jappila izolātā starp izplatītākajām ģintīm ierindojās arī *Thelephora* ģints (2.4%), kam nedaudz zemākas vērtības bija negatīvajai kontrolei un Suenenjoki izolātam, attiecīgi 2.1% un 1.8%; viszemākā *Thelephora* izplatība novērota T3N grupā ar 1.3%.

Neonectria ģints starp izplatītākajām novērota visās apstrādes grupās, izņemot Jappila izolātā. Tomēr tās relatīvais daudzums nebija lielāks ar *C. fuckeliana* inokulētajās grupās, salīdzinot ar negatīvo kontroli.



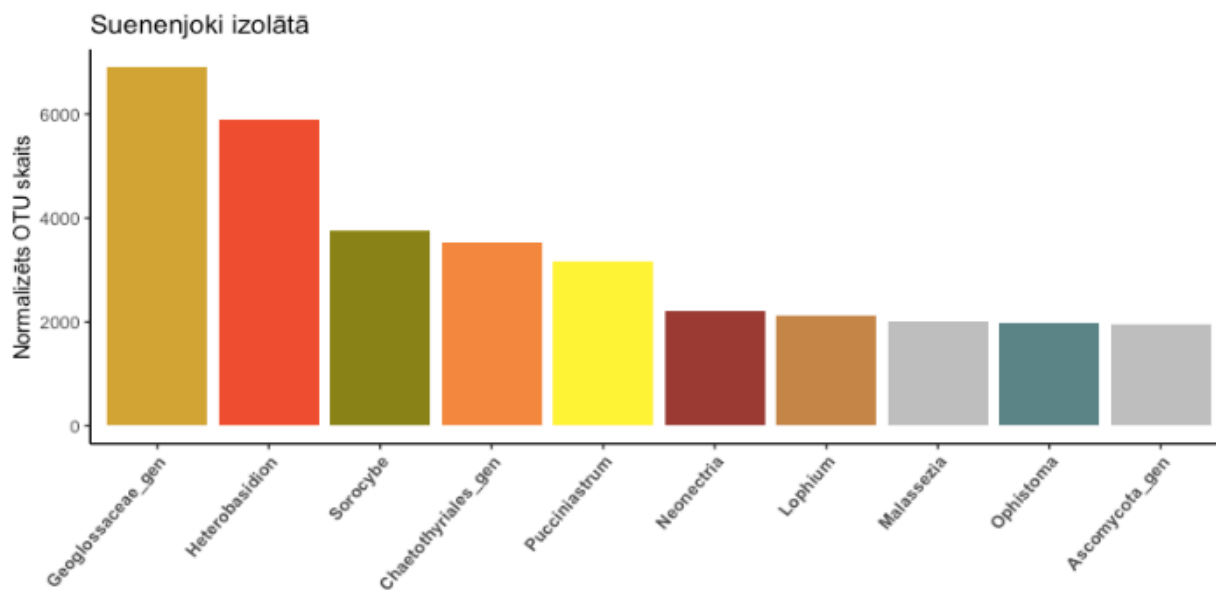
10. attēls. 10 izplatītākās ģintis un to OTU skaits Jappila izolāta brūču serdeņos.

Figure 10. 10 most represented genera and their OTU count in Jappila isolate wound cores.



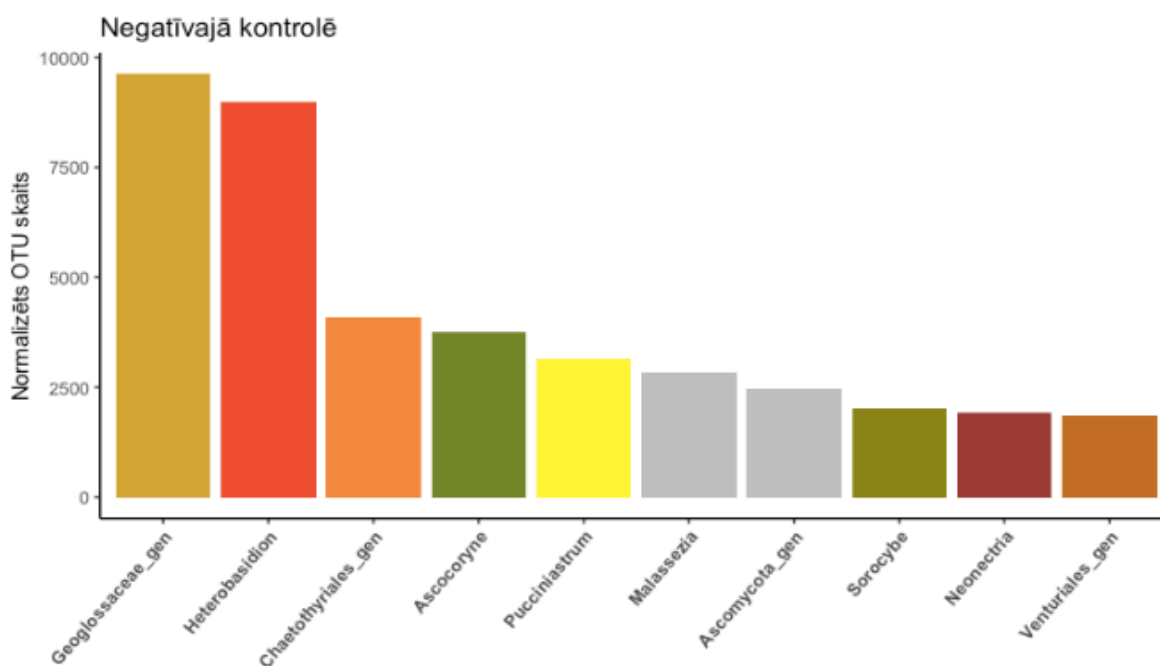
11. attēls. 10 izplatītākās ģintis un to OTU skaits T3N izolāta brūču serdeņos.

Figure 11. 10 most represented genera and their OTU count in T3N isolate wound cores.



12. attēls. 10 izplatītākās ģintis un to OTU skaits Suenenjoki izolāta brūču serdeņos.

Figure 12. 10 most represented genera and their OTU count in Suenenjoki isolate wound cores.

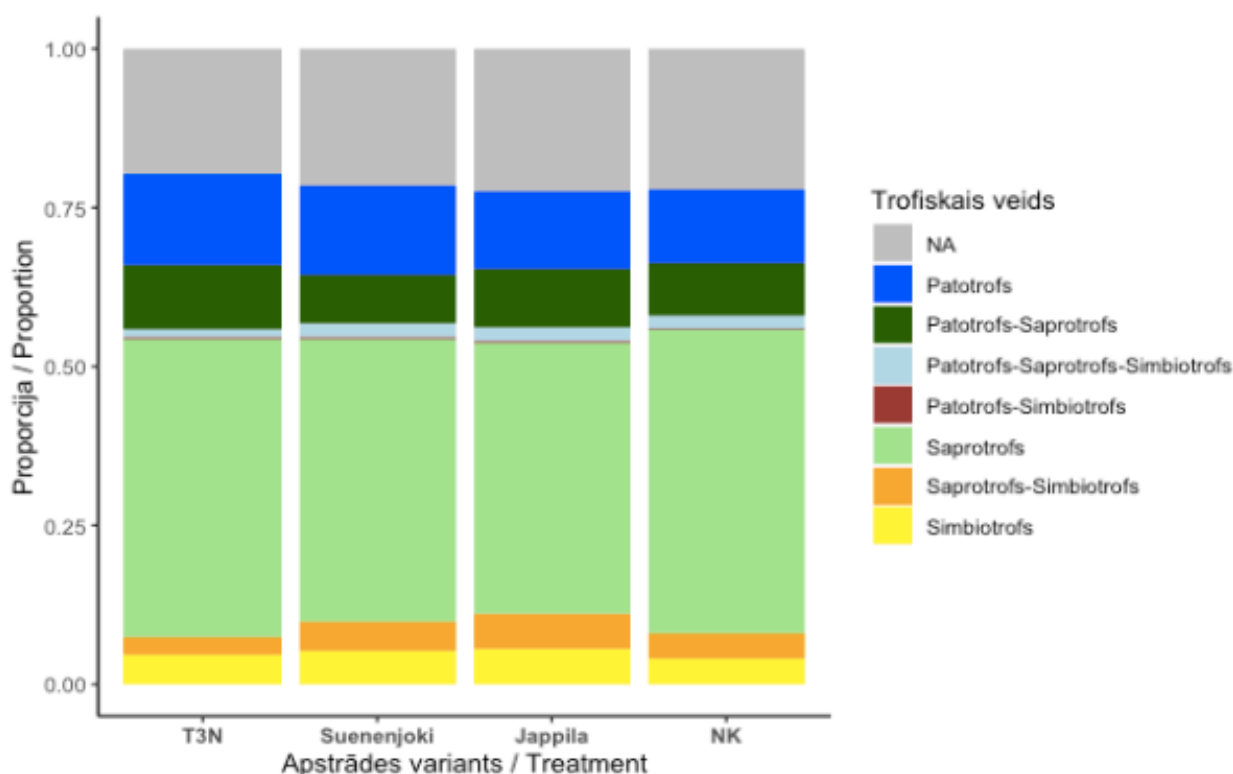


13. attēls. 10 izplatītākās ģintis un to OTU skaits negatīvās kontroles brūču serdeņos.

Figure 13. 10 most represented genera and their OTU count in negative control wound cores.

3.6.3. Apstrādes grupu taksonu trofiskās funkcijas

Taksonu sastāvs pēc to trofiskajām funkcijām apstrādes grupās ir samērā līdzīgs. Visos variantos vislielāko daļu – gandrīz pusi – sastādīja tīri saprotrofās sēnes (14. attēls): T3N izolātā un negatīvajā kontrolē tās veidoja attiecīgi 47.1% un 47.7%, mazāk Suenenjoki (43.6%) un Jappila (42.6%) izolātos. T3N izolātā dilstošā secībā sēņu ekoloģiski funkcionālās grupas bija šādas: nenoteiktās sēnes (19.7%), tīri patotrofās sēnes (14.4%), patotrofi saprotrofās sēnes (10.2%), tīri simbiotrofās (4.5%), saprotrofi simbiotrofās (2.8%), patotrofi saprotrofi simbiotrofās sēnes – 1.3% un patotrofi simbiotrofās – zem 0.5%. Pārējās eksperimenta grupās sēņu ekoloģisko grupu secība bija tāda pati. Suenenjoki, Jappila un negatīvajai kontrolei funkcionālo grupu sastāvs bija attiecīgi sekojošs: neatpazītās sēnes (21.1%, 22.3%, 22.0%), tīri patotrofās (13.8%, 12.4%, 11.7%), patotrofi-saprotrofās (7.5%, 9.3%, 8.4%), tīri simbiotrofās (5.2%, 5.7%, 4.0%), saprotrofi-simbiotrofās (4.3%, 5.4%, 4.0%) un patotrofi-saprotrofi-simbiotrofās sēnes (2.3%, 2.2%, 2.0%). Patotrofi-simbiotrofās sēnes arī šajās eksperimenta grupā bija 0.5%.

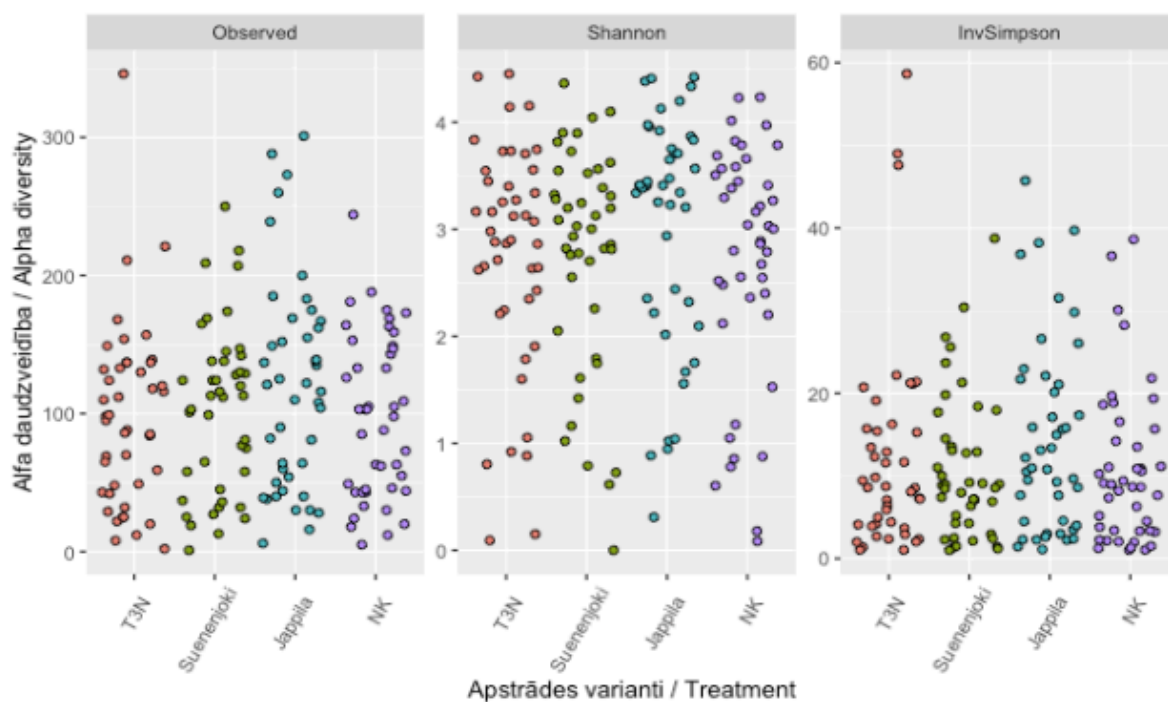


14. attēls. Katras apstrādes grupas relatīvais OTU sastāvs, pēc OTU ekoloģiskajām funkcijām (ar FUNGuild).

Figure 14. Relative OTU composition of each treatment group, by OTU ecological functions (with FUNGuild).

3.6.4. Alfa daudzveidība apstrādes grupās

Tika raksturota katra parauga alfa daudzveidība, izmantojot novēroto OTU daudzveidību, Šenona un Inversā Simpsona koeficientus (15. attēls).



15. attēls. Alfa daudzveidības rādītāji katram paraugam tā apstrādes grupā: (no kreisās) novērotā OTU daudzveidība, Šenona un Inversā Simpsona koeficienti.

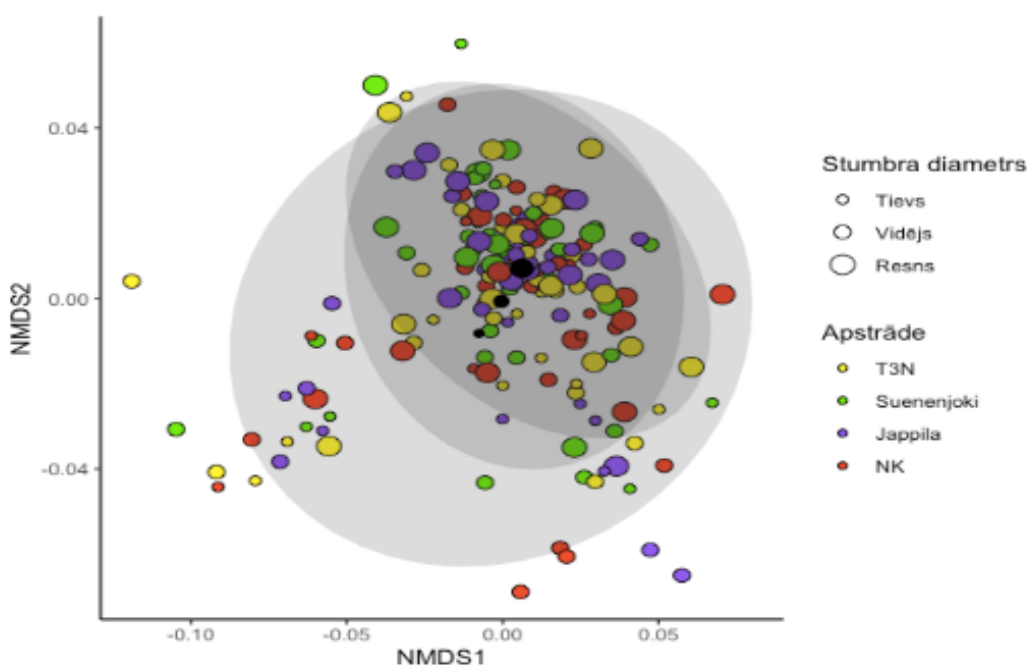
Figure 15. Alpha richness for each sample in its treatment group: (from the left) observed OTU richness, Shannon and Inverse Simpson coefficients.

Paraugu apstrādes grupās novērotā OTU daudzveidība bija samērā līdzīga, lielākā daļa paraugu saturēja līdz 200 dažādiem OTU. T3N izolāta vidējā vērtība un mediāna bija attiecīgi 98 un 97, Suenenjoki izolātam tās bija nedaudz lielākas, attiecīgi 103 un 113, Jappila izolātam vislielākās – attiecīgi 120 un 119, kā arī kopumā visai līdzīgi negatīvajai kontrolei – attiecīgi 97 un 101. Arī Šenona koeficienti bija līdzīgi apstrādes grupās, kur T3N vidējā vērtība un mediāna bija attiecīgi 2.8 un 2.9, Suenenjoki un negatīvajai kontrolei bija ļoti līdzīgs rezultāts un noapaļojot līdz 1 ciparam aiz komata vidējā vērtība un mediāna abiem bija attiecīgi 2.7 un 3.0, kamēr relatīvi augstākās vērtības bija Jappila variantam, attiecīgi 3.0 un 3.4. Inversā Simpsona koeficienta vidējā vērtība un mediāna T3N izolātam bija attiecīgi 12.2 un 8.6, Suenenjoki izolātam – attiecīgi 10.9 un 8.9, visaugstākās vērtības bija Jappila izolātam, kur vidējā vērtība un mediāna bija attiecīgi 14.5 un 11.6, un negatīvajai kontrolei šī koeficienta vidējā vērtība un mediāna, līdzīgi kā Šenona koeficients, bija pavisam tuvu Suenenjoki izolātam, tas ir, attiecīgi 10.7 un 8.8. Labākai vizualizācijai skatīt pielikumā S7.-S9. attēlus.

Lai arī ar minimālām atšķirībām, taču neviens no minētajiem koeficientiem un OTU daudzveidība neatšķīrās būtiski starp apstrādes grupām ($p > 0.25$).

3.6.5. Beta daudzveidība apstrādes grupās

NMDS stresa koeficients bija 0.1926789, kas ir pieņemams, jo ir zem 0.2 (Dexter et al., 2018). Lai izdarītu visaptverošus un savstarpējus secinājumus par pētījuma grupu atšķirībām OTU sastāvā, tika izveidota NMDS ordinācija, izmantojot Breja-Kurtisa distanci. Iekrāsotie poligoni norāda uz grupu paraugu daudzdimensionālo dispersiju jeb izkliedi, un centroīdi – uz attiecīgo klāsteru veidojošo punktu vidējo vērtību. Attēlā Nr.16. redzams grafiks, kurā attēlots, kā grupējas paraugi pēc egles stumbra diametra krūšu augstumā.

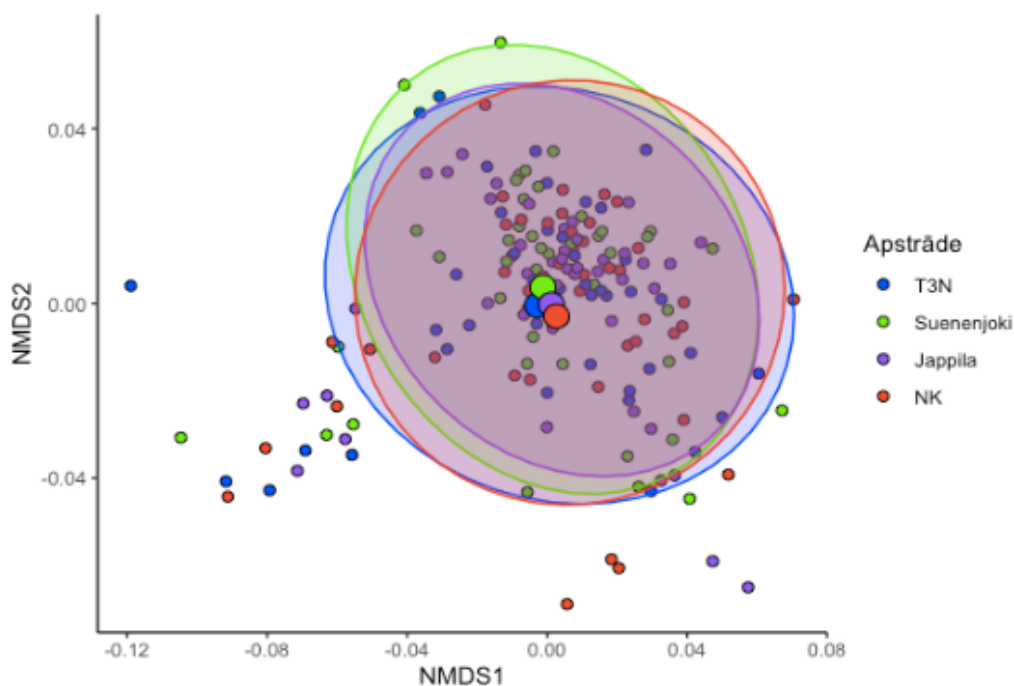


16. attēls. NMDS ordinācijas grafiks visiem paraugiem, punkti iekrāsoti pēc apstrādes grupām un punktu izmēri pēc egles stumbra diametra; centroīdi atbilst to diametra grupai.

Figure 16. NMDS ordination plot, points coloured according to treatment groups and point size – according to spruce stem diameter; centroids correspond to their diameter group.

Veicot PERMANOVA testu, stumbra diametra grupas uzrādīja būtisku atšķirību ($p = 0.006$), un secīgi post-hoc testā, vadoties pēc pielāgotās p vērtības, būtiskas atšķirības bija tikai starp vidējiem un resniem stumbriem ($p_{adj} = 0.036$). Salīdzinot diametra grupu multivariētās dispersijas, tika noskaidrots, ka tās ir homogēnas.

Ordinācijas grafiks apstrādes grupu klāsterēšanās attēlošanai atrodas zemāk (17. attēls). Redzams, ka centroīdu novietojums ir samērā līdzīgs. Veicot PERMANOVA testu, tika noskaidrots, ka starp grupām nepastāv būtiska atšķirība ($p = 0.132$).



16. attēls. NMDS ordinācijas grafiks visiem paraugiem, punkti iekrāsoti pēc apstrādes grupām; centroīdi atbilst to apstrādes grupai.

Figure 16. NMDS ordination plot, points coloured according to treatment groups; centroids correspond to the treatment group.

Tika izveidots ordinācijas grafiks arī sekvencēšanas piegājieniem (S10. attēls). Tanī PERMANOVA testa rezultāts uzrādīja būtiskas atšķirības starp piegājieniem ($p = 0.005$), tomēr abu klāsteru dispersijas bija stipri nehomogēnas ($p < 0.0001$). Lai noskaidrotu, vai bija kāda ietekme dažādajām DNS izdalīšanas metodēm uz paraugu OTU kompozīciju, NMDS ordinācija tika izveidota arī šim aspektam (S11. attēls). PERMANOVA tests izdeva būtisku atšķirību starp izdalīšanas metodēm ($p = 0.002$), bet klāsteru dispersijas uzrādījās nehomogēnas ($p = 0.029$), kā tas šķita arī vizuāli. Vienīgās būtiskās atšķirības paraugu OTU kompozīcijā atkarībā no DNS izdalīšanas metodikas bija starp metožu pāriem 2-4, un 2-5. Ordinācijas metode tika izmantota arī, lai noteiktu, vai ir nozīme brūces augšpusei vai apakšpusei, no kuras iegūts parauga serdenis, taču gan vizuāli, gan statistiski starp centroīdiem nebija atšķirības un grupu dispersijas bija stipri homogēnas (S12. attēls). Tāpat nebija statistiski būtisku atšķirību OTU kompozīcijā, paraugus grupējot pēc brūces izmēriem ($p = 0.234$), turklāt izveidotajiem klāsteriem dispersijas arī bija homogēnas (S13. attēls).

4. DISKUSIJA

4.1. Egļu vitalitāte un mizas brūces

Pazeminātā vitalitātes pakāpe eksperimentālajiem kokiem nav nekas pārsteidzošs, jo katram kokam tika veikts mehānisks urbums 4 vietās un inficēts ar stumbra vēzi izraisīt spējīgu *C. fuckeliana*. Rezultējošā simptomātika ar mizas brūču izveidi un sveķu izdalīšanos, skuju hlorozi un vainaga retināšanos saskan ar citiem pētījumiem, kuros mākslīgi izraisīta vai dabiski novērota *C. fuckeliana* infekcija (Crane et al. 2009; Talgø et al. 2012; Petterson et al. 2018 – visos minēta kā *Neonectria f.*). Citos pētījumos mākslīgi izveidoto aplievas koksnes brūču, kuras inokulētas ar *C. fuckeliana*, stumbra vēža attīstība notikusi 88% (Schultz et al. 1990 – minēta kā *Nectria f.*), 76% (Hopkins et al. 2012 – minēta kā *Neonectria f.*) inficēto skuju koku. Maģistra darba pētījumā stumbra slimības rašanās konstatēta visās inokulācijas vietās, taču par slimības izpausmi tika uzskatīta arī vismazākā plaša inokulācijas vietā, kas visdrīzāk nav uzskatāma par stumbra vēža simptomātiku. Ja no datiem atlasa brūces, kuru (pēc romba laukuma formulas) laukuma izmēri nepārsniedz 5 cm², zem sliekšņa paliek 37 paraugi, galvenokārt no negatīvās kontroles, tikai divi no T3N izolāta, trīs no Suenenjoki izolāta un četri no Jappila. Tātad, ja pieņemam, ka no visiem gadījumiem, kad apstrādes variants bija kāds no *C. fuckeliana* izolātiem (kopā 159), 6 gadījumos stumbra vēža pazīmes netika novērotas, tad stumbra vēža attīstība tika novērota 96% gadījumos, kas tāpat ir krietni vairāk nekā minētajos pētījumos.

Stumbra brūču garumi (rezultātos nav norādīti, taču to vidējās vērtības ranžējās tādā pašā secībā kā laukuma parametram: Suenenjoki – 20.8 ± 7.2 cm, T3N – 17.9 ± 5.8 cm, Jappila – 16.9 ± 6.8 cm, negatīvajai kontrolei – 6.7 ± 5.4 cm) bija līdzīgi, taču nedaudz mazāki par Hopkins et al. (2012) pētījumā iegūtajiem brūču garumiem, kur arī tiem bija liela standartnovirze un vidējā vērtība nedaudz virs 25 cm, tomēr tajā pētījumā izveidoto brūču vietas netika aizdarītas, kas palielina citu patogēnu iekļūšanu brūcē un iespējami lielāku brūču izmēru rašanos.

Vislielākās brūces tika novērotas Suenenjoki izolātā, taču jāmin, ka šim izolātam bija viena izteikti liela brūce (garumā 30 cm un platumā 5 cm), taču, izņemot to no datiem, būtiski atšķirīgo izolātu pāri saglabājās, tomēr statistiski tuvāk būtiskuma sliekšnim nokļuva T3N un Suenenjoki pāris (no $p = 0.10$ uz $p = 0.06$). Tā kā izmantota Holma metode p vērtības pielāgošanā vairāku paraugu pāru veida salīdzināšanā, ar drošu pārliecību var secināt, ka noteiktajās būtiskuma robežās ($\alpha = 0.05$) vienīgie izolāti, kuru brūču izmēri pēc 10 gadu perioda patiešām atšķiras ir Suenenjoki un Jappila, kur Suenenjoki izveidotās brūces ir lielākas.

Negatīvās kontroles gadījumos izveidojušās brūces varētu būt skaidrojamas ar to, ka iespējams, *C. fuckeliana* koksne jau bija atradusies pirms inokulācijas kā endofīts (González et al. 2013; Roll-Hansen & Roll-Hansen 1979 – minēta kā *Nectria f.* vai *Neonectria f.*), un koksnes mehāniska ievainošana izraisījusi sēnes un egles attiecību izmaiņas, vai arī tā imigrējusi no blakusesošajām stumbra zonām, kur bija *C. fuckeliana* izolāti, jo ir zināms, ka šo sēni var izdalīt arī no inokulētai brūcei pretējās stumbra puses (Roll-Hansen & Roll-Hansen 1979). Vēl viena iespēja ir – aizdarot apstrādātās brūces ar potvasku, sanāca nejauši pārnest inokulācijas materiālu no kādas ar *C. fuckeliana* inokulētas apstrādes vietas.

4.2. Brūču attīstības dinamika

Visstraujākais brūču izmēra pieaugums notika laika periodā no otrā eksperimenta gada sākuma (2012. gada novembris) līdz trešā gada sākumam (2013. gada novembris), kas nesaskan ar citiem pētījumiem (Schultz et al. 1990; Hopkins et al 2012).

Schultz et al. (1990) ziņo, ka apzināti inokulētos *Abies concolor* stumbros visstraujākais brūces izmēra pieaugums ticis novērots pirmajā gadā, otrajā joprojām pieauga, taču tas bija par aptuveni 70% mazāks, un trešajā bija pieaugums bija relatīvi pavisam sīks (par 80% mazāks nekā otrajā gadā); minētajā pētījumā *C. fuckeliana* inokulēto brūču vidējais pieaugums pirmajā gadā bija 6.7 cm.

Hopkins et al. (2012) pētījumā, kur apzināti izraisītās *Pinus radiata* brūces tika inokulētas ar *C. fuckeliana* sporu suspensiju, pēc 19 mēnešiem stumbra vēža attīstība tika novērota 76% koku, kuri inokulēti, izmantojot dziļas aplievas koksnes brūces (~3 cm). Tā kā maģistra darba pētījumā brūču apsekošana nenotika 19. mēnesī, tuvākais laika punkts, ar kuru salīdzināt ir 15. mēnesis kopš inokulācijas (2012. gada novembris) – tajā mirklī brūces netika novērotas 4 no 60 kokiem jeb brūces novērotas 93% koku. Zināma atšķirība šim maģistra darba pētījumam no Hopkins et al. (2012) pētījuma ir koka suga un inokulācijas brūces urbuma dziļums (maģistra darbā tas bija ~ 5 cm dziļumā), kā arī Hopkins et al. (2012) pētījumā brūces netika aizdarītas. Iespējams, *P. abies* ir uzņēmīgāka pret *C. fuckeliana* un tās izraisītajām biotiskajām pārmaiņām koksne, jo ir zināms, ka *P. abies* ir ievērojami nenoturīga pret biotisko stresu (Marčiulynas et al. 2022).

Skaidrojot, kādēļ straujākā attīstība notika minētajā laika periodā, var spekulēt, ka pirmajā gadā *C. fuckeliana* aklimatizējās jaunajiem apstākļiem, jo tās augšanas vide tika mainīta no agara barotnes uz dzīvu koku, kur sēnei vajadzēja pārvarēt *P. abies* strukturālos un ķīmiskos aizsargmehānismus, kā kallusa audu izveide mehāniski skartajā zonā, terpēnu un fenolisko savienojumu, aktīvo skābekļa formu izdalīšana, antimikrobiālo peptīdu sintezēšana u.c. (Arnerup 2011), kas ir enerģiju pieprasošs process un attiecīgi var rezultēties vājākā sēnes

augšanā. Pēdējā periodā novērota gan brūču garuma, gan platuma sarukšana, kas ir skaidrojama ir *P. abies* aizsardzības reakcijām – kallusa audu sintēzi atkailināto koksnes audu noslēgšanai no ārvides (Neely 1988).

Grūti veikt visaptverošus slēdzienus par sezonas ietekmi uz *C. fuckeliana* augšanu *P. abies* stumbrā, jo brūču izmēra izmaiņas reģistrētas vasaras beigās un rudens vidū. Tas ir uzlabojams aspekts nākotnes pētījumu dizainā. Taču var secināt, ka trešā gada sākumā rudens periodā vēl notika strauja augšana. To noteikti veicināja neraksturīgi siltie laikapstākļi, kādi 2013. gada rudenī novēroti – tas bijis trešais siltākais rudens 21. gadsimtā; turklāt arī no pavasara vidus līdz vasaras beigām mēneša vidējā gaisa temperatūra bijusi paaugstināta, konkrēti +8.2 °C (meteo.lv), un *C. fuckeliana* optimālā sporu dīgšanas un augšanas temperatūra ir no 18 līdz 25 °C (Crane & Dick 2006).

4.3. Brūču izmēra modeļi

Izveidotais brūces izmēra vispārinātais jauktā efekta modelis, kas raksturo brūces izmēru pēc 10 gadu ilgas *C. fuckeliana* iedarbības *P. abies* koksne kopš inokulācijas, pēc statistikas kritērijiem ir uzskatāms par ticamu un vērā ņemamu, jo tā atlikuma vērtības veidoja Gausa sadalījumu un izskaidrotā variācija (R^2) bija 41%, kas ir samērā augsta vērtība ekoloģiskiem fenomeniem (Møller & Jennions, 2002). Tomēr, lai pārliecinātos par modeļa koeficientu stabilitāti, būtu ieteicams veikt t.s. *bootstrapping* analīzi, kur paraugi tiek nejauši un atkārtoti paņemti no tās pašas datu kopas mazākas daļas (Shao, 1996). Lai arī modelis dod skaidru informāciju, kā katrs izolāts ietekmē brūces izmēru, koka diametrs to ietekmē pozitīvi, taču pavisam minimāli. Tas tika pārbaudīts arī manuāli, kur atklājās, ka lielākās brūces netika novērotas kokos ar lielākajiem diametriem krūšu augstumā un tāpat – kokiem ar lielākajiem diametriem krūšu augstumā to brūču izmēri bija viduvēji. Tas liek domāt, ka brūču izmēru nosaka citi faktori, kas nav saistīti ar diametru, kā piemēram individuālais koks ar savu unikālo fenotipu. Uz to norāda arī brūču izmēra datu kopas samērā lielā izkliede, kāda novērota arī citos *C. fuckeliana* izraisīto mizas brūču pētījumos (Pettersen et al. 2018; Hopkins et al. 2012).

Kopumā modelis sniedz noderīgu informāciju par to – kā izolāti atšķiras brūces izraisīšanā, ka diametram ir maza nozīme brūces izmēra ietekmēšanā, un ka liela nozīme ir kokam kā nejaušajam faktoram. Lai uzlabotu modeļa paredzēšanas kapacitāti, tanī ieteicams iesaistīt tādus sēnes fizioloģijā nozīmīgus faktorus kā temperatūra un mitrums, jo tie šajā maģistra darba pētījumā netika iekļauti kā mainīgie. Sprotams, ka dabiskos apstākļos temperatūras izpausmes ir plaša mēroga, tādēļ tās ietekmi varētu pētīt ierīkojot vairākus eksperimentālos parauglaukumus ar vienas sugas un vecuma kokiem, toties dažādos platuma grādos.

4.4. Vertikālā izplatība un micēlija saglabāšanās koksnē

Ticama vertikālās izplatības apmēra aplēšana no stumbru fragmentiem bija apgrūtināta, jo lielākajā daļā gadījumu vertikālā iekrāsošanās bija novērota tiem viscaur jeb iztrūka datu izplatības galos. No minētajiem datiem iespējams tikai secināt, ka sēne izplatījusies vismaz tik tālu, cik garš bijis fragments. Tomēr svarīgi piebilst – kaut arī zināms, ka *C. fuckeliana* koksnē rada pelēcīgu līdz brūnganu iekrāsojumu (González & Chaverri 2017), vizuāla iekrāsojuma konstatēšana nav pārliecinoša metode *C. fuckeliana* izplatības noteikšanai, jo krāsojumu var radīt arī citas sēnes. Turklāt gandrīz katrā piektajā eglē izdevās izolēt *C. fuckeliana* micēliju no celma (30 cm augstumā) pēc nozāģēšanas, kas nozīmē, ka no inokulācijas vietas virzienā uz leju sēne 10 gadu laikā spējusi ir izplatīties vismaz metru, iespējams, pat vēl vairāk, tomēr tā varētu tur būt bijusi arī no dabiskā eglu mikobioma. Neatkarīgi no tā, *C. fuckeliana* atradumu celma augstumā atbalsta cits pētījums, kurā *C. fuckeliana* vertikālā izplatība *P. abies* stumbra koksnē dabiskos apstākļos novērota 0 metru augstumā un līdz pat 8–20 m (Huse 1981 – minētā kā *Nectria f.*). Salīdzinot iegūtos rezultātus ar citiem pētījumiem, apstiprinās tēze, ka dzīvotspējīgs *C. fuckeliana* micēlijs atrodas arī tādā koksnē, kurā nav redzams uzskatāms iekrāsojums (Roll-Hansen & Roll-Hansen 1979; Huse 1980 – minēta kā *Nectria f.*; Schultz et al. 1990; Burneviča et al. 2016 – minēta kā *Neonectria f.*), jo no šīm zonām to izdevās izdalīt pat biežāk nekā no tādām (ārpus brūces), kurās vēl bija redzams koksnes iekrāsojums. Tas liek domāt, ka vietās, kur nav mehānisku koksnes bojājumu, *C. fuckeliana*, iespējams, veido pozitīvi simbiotiskas vai neitrālas attiecības ar *P. abies* vai vismaz eksistē ar izmainītu fizioloģiju, kas neizraisa iekrāsojošu sekundāro metabolītu izdalīšanos koksnes vidē. *P. abies* pēc mehāniska bojājuma palielinās izturība vai pretestība pret patogēniem (Christiansen et al., 1999), kas varētu izraisīt izmaiņas ekoloģiskajās attiecībās starp *P. abies* un *C. fuckeliana*, rezultējoties savstarpēji negatīvai mijiedarbībai. Šādu hipotēzi izvirzījuši arī citi pētnieki (Ramsfield et al. 2013). Jautājums par *C. fuckeliana* izmaiņām tās fizioloģijā vizuāli veselā koksnē un mehāniski bojātā ir noderīgs izpētes objekts nākamajos pētījumos.

Izdarīt izsmelošus secinājumus par izolātu atšķirībām izplatīšanās vertikālajā distancē koksnē no pieejamajiem datiem ir grūti, tomēr, izvērtējot *C. fuckeliana* micēlija saglabāšanos brūces zonā, Suenenjoki un Jappila izolātiem bija visaugstākās vērtības, turklāt arī, vizuāli novērtējot to radīto koksnes iekrāsojumu, minētajiem izolātiem tas bija vienlīdzīgs un spilgtāks par T3N izolātu (skat. 6. attēlu), kas vedina domāt, ka koksnē aktīvāks micēlijs ir tieši šiem diviem izolātiem. Tomēr micēliju izdalīt no vistālākajiem stumbru fragmentu punktiem izdevās no Suenenjoki un T3N izolātiem, kas arī saskan ar brūču izmēru ainu – tur šie abi izraisīja vislielākās brūces. Tādēļ, iespējams, šie izolāti *P. abies* stumbrā izplatās ātrāk nekā Jappila, taču ir nepieciešami papildu dati šo secinājumu apstiprināšanai. Novērojumam, ka no brūces

zonas un vienu reizi arī no vietas ar pēdējo uzskatāmo koksnes iekrāsojumu *C. fuckeliana* izdevās izdalīt no negatīvās kontroles grupā, skaidrojums varētu būt šāds: vai nu sēne tika izdalīta no koksnes dabiskā mikrobioma vai arī tā līdz parauga ņemšanas vietai izplatījies no cita izolāta brūces, visticamāk no blakusesošo brūču zonām, jo eksperimentāli pierādīts, ka *C. fuckeliana* izdalīšanas sekmība sarūk virzienā no aplievas uz serdi (Roll-Hansen & Roll-Hansen 1979), tomēr ir informācija arī par šīs sugas izdalīšanu no *P. abies* serdes (Huse 1981). Lai pārliecinātos par izdalītās *C. fuckeliana* piederību konkrētam izolātam, nepieciešama detalizēta informācija par konkrētā izolāta kultūras morfoloģiskajām vai metaboliskajām īpatnībām un kādiem ģenētiskajiem marķieriem, piemēram, repetitīvajām sekvencēm. Pagaidām iespējams paļauties tikai uz norobežotā vertikālā koksnes iekrāsojuma vizuālo saistību ar attiecīgās brūces inokulēšanai izmantoto sēnes izolātu.

4.5. Pārējās no *C. fuckeliana* infekcijas zonām izdalītās sēnes

Citas no brūcēm izdalīto sēņu kultūras ir tipiskas *P. abies* koksnei un tās mizas brūcēm, ar askusēnēm pārsvarā (Burneviča et al. 2016; Roll-Hansen & Roll-Hansen 1979), tomēr, šajā darbā no brūcēm tika salīdzinoši vairāk izdalītas *Penicillium* un *Trichoderma* ģinšu kultūras. Grantina-Ievina et al. (2013) pētījumā ziņots, ka *Penicillium* ģints sēnes augsnē novērotas daudz retāk ar *Heterobasidion annosum* inficētās kokaudzēs pretēji veselīgām audzēm. Tomēr mūsu pētījumā *Penicillium* kultūra tika izdalīta arī no uzskatāmi ar trupi inficētā 41. koka brūces, no kuras izdalīts *H. parviporum*, kā arī *C. fuckeliana*. Turpretī *C. fuckeliana* tika nereti izdalīta no vienas brūces kopā ar *Penicillium* ģints kultūrām, kas liek domāt par abu spēju pastāvēt kopējā ekoloģiskajā nišā. Kā arī izdalīšanas sekmība uzskatāmi neatšķīrās no izolātu apstrādes un negatīvās kontroles, norādot uz iespējamu *Penicillium* ģints neitralitāti pret *C. fuckeliana* parastās egles koksni. Līdzīgi secinājumi izdarāmi arī par *Trichoderma* ģinti, kur izdalīšanas sekmība bija vienlīdz liela starp *C. fuckeliana* izolātiem un negatīvo kontroli.

Turpretī *Sarea* ģints kultūrās, kaut vispārīgi minimālā daudzumā, taču izdalīšana no brūces izdevās tikai *C. fuckeliana* grupās. Tas visticamāk skaidrojams ar atšķirību sveķošanās apmērā – tas bija lielāks ar *C. fuckeliana* apstrādātajās brūcēs, jo kā zināms, *Sarea* ģints apdzīvo unikālu ekoloģisko nišu – koku sveķus (Mitchell et al., 2021). Arī Burneviča et al. (2016) pētījumā *Sarea* atrasta augstākā skaitā no brūcēm, kurās novērota arī *C. fuckeliana* klātbūtne.

Ascocoryne tika izdalīta gan no negatīvās kontroles, gan no *C. fuckeliana* inokulētās koksnes. Suenenjoki un Jappila izolātiem un negatīvajai kontrolei *Ascocoryne* sp. kultūras izdalīšanas sekmība bija līdzīga, taču T3N izolātam tā bija gandrīz uz pusi lielāka, taču katram no izolātiem bija gadījumi, kad *Ascocoryne* sp. atrasta vienā kokā tikai attiecīgajā izolātā, tādēļ spriest par T3N izolāta specifisku saistību ar šīs sēnes var tikai spekulatīvi. Pastāv zināma

saistība starp koksnes iekrāsojuma intensitāti un *Ascocoryne* sp. klātbūtni, proti, T3N no pārējiem izolātiem atšķīrās ar to, ka tam bija blāvāks krāsojums koksnē. Iespējams, šī izolāta fizioloģiskās īpatnības ir labvēlīgas *Ascocoryne* augšanai, tādēļ šīs problēmas kontekstā, un vispārīgi *C. fuckeliana* sugas kā tādas, sēnes fizioloģiskās īpatnības vēl jāpārbauda turpmākos pētījumos, jo pašreiz literatūrā par to informācija nav atrodamā.

Par *Mucor* ģints mijiedarbību ar *C. fuckeliana* ir grūti spriest, jo tās izdalīšanas sekmība bija vispārīgi ļoti zema. Minētais arī ir saskaņā ar daudziem pētījumiem par *C. fuckeliana*, kuros *Mucor* ģints netika atrasta vai nebija tādā daudzumā, lai būtu jēdzīgi to pieminēt.

4.6. DNS izdalīšana

DNS izdalīšana no inficētās koksnes un tās sekvencēšana bija nozīmīga pētījuma daļa, jo ļāva uzzināt informāciju par tām brūces apdzīvojošajām sēnēm, kuru kultūras laboratorijas apstākļos nav kultivējamas. Tā kā DNS izdalīšanai no koksnes nav specifiska laboratorijas komplekta, DNS izdalīšanā no koksnes audiem tika izmantota metodika, kas sākotnēji paredzēta DNS izdalīšanai no grūti sašķeļamiem, izturīgiem dzīvnieku audiem, kuras efektivitāte ir pārbaudīta un apstiprināta, un kura ir ekoloģiski labvēlīgāka nekā citas tradicionāli izmantotas metodes (Klavina et al., 2023).

Vienīgās ordinācijas analīzē atšķirīgās DNS izdalīšanas metodes paraugu grupas – otrā un ceturta – statistiskais nozīmīgums ir apšaubāms, jo tām bija stipri atšķirīgs paraugkopas izmērs (attiecīgi 48 un 12) un, tā kā grupām bija raksturīga liela iekšējā mainība DNS koncentrācijas un kvalitātes rādītājos, šis statistiski nozīmīgais spriedums nav pietiekami drošticams. Tomēr visām grupām 260/280 absorbcijas attiecība bija vidēji ap 1.32-1.36, kas liecina par potenciālu kontaminantu piejaukumu, kā arī iespējams šo vērtību pazemināja skābs vides pH, jo zināms, ka tas absorbcijas attiecību var pazemināt par 0.2-0.3 (Thermo Scientific, T123 – TECHNICAL BULLETIN), jo egles koksnei pH ir nedaudz zem 5 (Geffert et al., 2019). Tā kā tīrai DNS 260/280 ir ap 1.8, un ņemot vērā iepriekšminēto, paraugu reālā 260/280 varētu būt 1.5-1.7, kas ir krietni tuvāk ideālajai vērtībai. Tā kā koksne ir piesātināta ar dažādām fenoliskajām ekstraktvielām, no kurām ir grūti atbrīvoties, optimāla DNS izdalīšana var būt laikietilpīgs un dārgs process (Verbylaite et al. 2010). Mūsu pētījuma DNS izdalīšanas sekmība un kvalitāte bija pietiekama, lai veiktu PCR metabarkodīga analīzēm un nonāktu pie rezultātiem, taču optimizējot izdalīšanas metodi, varētu iegūt augstākas koncentrācija un kvalitātes ģenētisko materiālu precīzākām analīzēm.

4.7. Mikrobiālā ekoloģija

4.7.1. ITS un klāsterēšana

Pēc OTU tabulas izveides bija novērots daudz mazpārstāvētu OTU, kas varēja rasties no sekvenčēšanas vai klāsterēšanas kļūmēm, tādēļ post-klāsterēšanas manipulācija ar LULU algoritmu (Frøslev et al. 2017), stipri uzlaboja OTU pārstāvētības kopainu. Tiesa, joprojām bija gadījumi, kad vienam taksonam saglabājās pāris unikālu OTU, ko var izraisīt ne tikai sekvenčēšanas kļūdas, bet arī ITS rajona sekvenču mainība vienas sugas ietvaros vai nepilnības UNITE datubāzē, pret kuru notika taksonomijas veidošana (Abarenkov et al. 2010; Blaalid et al., 2013).

Ir aplēsts, ka publiski pieejamajās datubāzēs daudzas ITS sekvenču nav anotētas sugas līmenī, sevišķi no vides paraugiem (Schoch et al., 2012). Minētajā rakstā tika arī novērtēta ITS rajona kā sēņu identifikācijas barkoda pareizas identifikācijas iespējamība jeb PCI (angl. *probability of correct identification*), un ITS rajonam tā bija 0.73. Kā arī pastāv atšķirīga mainība ITS rajona sekvenču sugu ietvaros dažādām sēņu grupām, galvenokārt *Ascomycota*; (Schoch et al. 2012; Vainio & Hantula, 2000). Drošākai sēņu sugu noteikšanai ieteicams apvienot dažādus ģenētiskos marķierus, piemēram, ITS ar LSU (ribosomas lielās subvienības rDNS), vai SSU (ribosomas mazās subvienības rDNS), vai RPB1 (RNS polimerāzes II lielās subvienības kodējošais gēns) (Brown et al., 2014; Schoch et al., 2012; Vainio & Hantula, 2000). Tā kā bioinformātikajās analīzēs tika izmantots tikai ITS2 rajons, taksonu identificēšana līdz sugas līmenim nebūtu pavisam droša pieeja ITS rajona mainības sugu ietvaros dēļ (Vainio & Hantula, 2000), tādēļ bioinformātikās analīzes izšķirtspēja ierobežota līdz ģints līmenim, kas atļāva vispārīgu, pārskatāmu rezultātu iegūšanai par ar *C. fuckeliana* saistītajām sēņu sabiedrībām. Šo lēmumu apstiprina arī fakts, ka *Heterobasidion* ģints sēnes sākotnēji tika identificētas kā *H. occidentale*, kurai izplatības areāls ir galvenokārt Ziemeļamerikas rietumi, taču ar *Heterobasidion* sugām specifiskajiem praimeriem noteikts, ka visas atrastās sugas ļoti ticami ir *H. parviporum*, kuras izplatības areāls (liela daļa no Eirāzijas kontinenta) jau vairāk atbilst šī pētījuma lokācijai, turklāt šī suga ir krietni biežāk saistīta ar *P. abies* (Garbelotto & Gonthier, 2013).

4.7.2. Taksonomiskais sastāvs

Datos pirms normalizācijas salīdzinoši lielāks absolūtais OTU daudzums novērots ar *C. fuckeliana* apstrādātajos paraugos, kas varētu būt skaidrojams ar to, ka pie paaugstināta sēņu inokulāta ietekmes *P. abies* aizsargmehānismi tika novājināti un tas varētu atvieglot nišas pieejamību vairāk sēņu (Stone et al., 2004). Pēc datu normalizācijas joprojām galvenais

dominējošais nodalījums bija askusēnes, kam sekoja bazīdijsēnes, kas saskan ar citiem pētījumiem par parastās egles mikrobiomu (Roll-Hansen & Roll-Hansen 1979; Burņeviča et al. 2016; Klavina et al. 2023), taču šajā maģistra darba pētījumā novērots augstāks bazīdijsēņu īpatsvars. Tam par iemeslu visticamāk ir tas, ka paraugi tika ņemti no brūces zonas, kurā bija notikusi koksnes audu noārdīšanās. Basidiomycota nodalījums satur lielāko daļu koksni noārdošo sēņu (McCarthy & Fitzpatrick, 2017). T3N un Jappila izolātos novērotie pazeminātais *Ascomycota* un paaugstinātais *Basidiomycota* nodalījumi varētu būt skaidrojami ar to, ka šo izolātu radītajā sēņu sabiedrībā, iespējams, pastāv kādi atšķirīgi ekoloģisko mijiedarbību veidi. Abos izolātos augstākā pārstāvētībā tika novērota augu parazīta rūsas sēņu *Pucciniastrum* ģints klātbūtne, kuras sugu dzīves ciklam raksturīga saimniekauga maiņa no lapkoka uz skuju kokiem, kur viens no tiem ir *P. abies*; turklāt minētajai sēņu ģintij pastāv saistība ar *P. abies* mizas nekrozi (Hietala et al., 2008). Visās pētījuma grupās un lielākajā daļā paraugu novērota *Malassezia* ģints, kas ir plaši pazīstams dzīvnieku ādas un gļotādu mikrobioma pārstāvis (Theelen et al., 2018), tomēr, iespējams, tā pastāv arī citās ekoloģiskajās nišās, kas vēl nav aprakstīts literatūrā. *Malassezia* paaugstinātā klātbūtne *C. fuckeliana* apstrādes grupās varētu būt saistāma ar šīs ģints saprotrofo trofisko dzīvesveidu, tās klātbūtne novērota lielākajā daļā paraugu. Tomēr šī ģints paraugos varēja parādīties arī kontaminācijas dēļ.

Salīdzinot ar Klavina et al. (2023) pētījumu, kurā pētītas *P. abies* mikrobioma īpatnības atkarībā no egļu audžu apsaimniekošanas un iepriekšējās zemes izmantošanas, pēc *Ascomycota* un *Basidiomycota* tanī nākamais izplatītākais nodalījums bija *Chytridiomycota* – šajā maģistra darba pētījumā tas līdzīgi pārstāvēja vidēji zem 1%, taču sekoja pēc *Mortierellomycota* nodalījuma kā ceturtais izplatītākais un tikai *C. fuckeliana* apstrādes klasēs (skat. 3. tabulu); *Mucoromycota* nodalījums līdzīgi minētajam pētījumam bija nākamais pārstāvētākais, taču tikai negatīvās kontroles grupā. Ir zināms, ka *Mucoromycota* nodalījuma sēnes spēj pastāvēt arī kā endofīti (Dzurendova et al., 2022), tādēļ, iespējams, mazāk ekoloģiski traucētajā negatīvajā kontrolē tās veidoja daļu no normālā *P. abies* mikrobioma.

T3N izolātā tika novērots paaugstināts *Rozellomycota* un *Entomophthoromycota* nodalījumu īpatsvars. *Entomophthoromycota* nodalījums satur galvenokārt posmkāju un nematožu parazītus, taču dažas sugas ir atrodams augu atliekās kā saprobi (Gryganskyi et al., 2013), bet *Rozellomycota* nodalījuma sastāvā ir iekššūnas parazīti bez hitīnu saturoša šūnapvalka (Jones et al., 2011). Šo nodalījumu klātbūtne T3N izolātā varētu būt skaidrojama ar iespējamu koksnes kukaiņu klātbūtni kādā mirklī, kas varēja introducēt nematodes, piemēram, ievainotu skuju koku mizā novērotā mikroskopiskā nematode *Bursaphelenchus xylophilus* barojas ar sēnēm, bet reti rada būtisku kaitējumu kokam (ipm.ucanr.edu), taču, kādēļ koksnes kukainis un nematode izvēlētos tieši šī izolāta brūces, nav skaidrs. Iespējams, šī nodalījumu

īpatsvara atšķirība starp apstrādes grupām ir identifikācijas vai sekvenčēšanas kļūda, jo T3N apstrādes grupā bija arī visaugstākais nenoteiktā sēņu nodalījuma īpatsvars.

Nedaudz paaugstinātais *Chytridiomycota* nodalījuma īpatsvars ar *C. fuckeliana* apstrādātajās brūcēs skaidrojams ar neidentificēto *Spizellomycetales* klases ģinšu parādīšanos atsevišķos paraugos. Tā kā šī klase satur augu patogēnus, tās klātesamība varētu būt saistāma ar lielākiem brūču izmēriem, tomēr tās parādīšanās novērota lielākoties atsevišķos paraugos, turklāt salīdzinoši mazākās brūcēs.

Pretēji Suenenjoki un Jappila izolātiem negatīvās kontroles un T3N izolāta brūču koksnē starp izplatītākajām ģintīm novērota *Ascocoryne* klātbūtne. Tas ir saskaņā ar mikrobioloģisko kultūru rezultātiem, kuros no T3N izolāta serdeņiem *Ascocoryne* izdalīta divkārt biežāk. Ir zināms, ka *Ascocoryne* ģints ir *P. abies* dabiskā mikrobioma pārstāvis un bieži sastopams endofīts, kam piemīt antagonistiska aktivitāte pret trupi izraisošajām sēnēm (Roll-Hansen & Roll-Hansen, 1979; Klavina et al., 2023). Šie rezultāti varētu būt saistīti ar T3N izolātā un negatīvajā kontrolē novēroto mazāko koksnes iekrāsojumu, kur, iespējams, *Ascocoryne* ģints nodrošina tādus vides vai biotiskos apstākļus koksnē, kuros tiek izmainīta koksni iekrāsojošo sēņu fizioloģija. Ir zināma *Ascocoryne* sugu antagonistiskā aktivitāte pret trupes sēnēm un citiem augu patogēniem (Mann 2013). *Ascocoryne* ģints pastiprinātā klātbūtne un vājākais koksnes iekrāsojums T3N izolātā liek domāt par šī izolāta mazāk patogēno raksturu, salīdzinot ar abiem pārējiem.

Ophiostoma ģints parādīšanās pie 10 pārstāvētajākajām Suenenjoki izolātā skaidrojama ar to, ka 57. koka Suenenjoki apstrādes paraugā šī ģints sastādīja teju visu OTU skaitu, un pat ar OTU skaita normalizēšanu šī viena parauga dominance veidoja aptuveni 80% no *Ophiostoma* ģints paraugu skaita šajā izolātā, jo OTU kopskaits šai ģintij bija samērā zems. Šī iemesla dēļ nevar uzskatīt, ka Suenenjoki izolāta sēņu sabiedrība patiesi atšķiras šīs ģints daudzumā no pārējām apstrādes grupām.

Heterobasidion vairākos gadījumos sastādīja gandrīz visu no paraugu OTU, tā tas bija, piemēram, 1., 41. un 51. kokiem, kas redzams arī S16. attēlā, kur *Agaricomycetes* klasi šajos kokos sastādīja būtībā tikai *Heterobasidion* ģints (pēc manuālas OTU tabulas pārbaudes). Bija gadījumi, kad ļoti lielā skaitā *Heterobasidion* attiecīgajā kokā novērots tikai T3N variantā – konkrēti 18., 29. un 55. kokos, kamēr pārējos apstrādes variantos minētajos kokos *Heterobasidion* OTU skaits bija praktiski nulle, turpretī Jappila izolātam un negatīvajai kontrolei atsevišķi, attiecīgi 12. un 31. kokos vienīgajiem bija stipri paaugstināta *Heterobasidion* klātbūtne. Minētais novērojums varētu būt skaidrojams ar traucēkliem koksnes struktūrā, kas novirzītu sēnes kolonizācijas ceļu, vai arī kļūdainu izdalītās DNS paraugu PCR amplifikāciju. Ir zināms, ka *Heterobasidion* inficē dzīvus kokus galvenokārt caur sakņu

kontakta un izplatās augšup uz stumbru (Vasiliauskas & Stenlid, 1998) – tas arī saskan ar mikrobioloģiskās izdalīšanas datiem, kur *H. parviporum* tika izdalīta no visu šīs sugas pozitīvo serdeņu koku celmiem. Skaidrojot paaugstināto *Heterobasidion* daudzumu, T3N *C. fuckeliana* izolātā, iespējams tas ir uzņēmīgāks pret *H. parviporum* nekā pārējie izolāti un negatīvā kontrole, tomēr pastāv iespējamība, ka atšķirības *Heterobasidion* biežumā starp pārējām apstrādes grupām radušās sekvenču kļūmju dēļ.

Apstrādes grupu savstarpējās atšķirības ir pārāk mazas un pretrunīgas, lai izdarītu drošticamus secinājumus par *C. fuckeliana* un to izolātu specifiskām ietekmēm uz *H. parviporum* izplatību *P. abies* koksne. Turpretī vizuālu ieskatu iespējamajā sēņu mijiedarbībā sniedz stipri satrupējušā 41. koka ripas (S15. attēls), kurās bija skaidri novērojamas reakcijas zonas starp *H. parviporum* un vertikāli izplatījušajiem *C. fuckeliana*. Šī parādība liecina par ekoloģiski negatīvu šo sēņu mijiedarbību, un, ņemot vērā stipro *H. parviporum* dominanci DNS paraugos, var secināt, ka *C. fuckeliana* nav pietiekama antagonistiskā potenciāla pret *H. parviporum* *P. abies* koksne *in vivo*.

Geoglossaceae dzimtas neidentificētā ģints bija būtībā visizplatītākā visos paraugos, ar pārliecinošu un vienmērīgu relatīvo daudzumu viscaur paraugiem, neliecinot par sekvenču kļūmēm. Tā arī sastāvēja tikai no viena OTU, tādēļ uzskatāma par informatīvu atradumu. Ekoloģiskā informācija par *Geoglossaceae* dzimtas pārstāvjiem ir ierobežota, taču zināms, ka tiem raksturīgs saprotrofs dzīvesveids trūdošā veģetācijā, parasti mazietekmētos zālajos (Cannon & Kirk, 2007). No iegūtajiem datiem, var secināt, ka, iespējams, šīs dzimtas sēņu ekoloģija ir papildināma ar jaunu nišu – *P. abies* brūču sēnes.

Visās apstrādes grupās bija novērojama *Sorocybe* ģints. Tās relatīvi augstākais biežums visās apstrādes grupās ir saistāms ar šīs ģints ekoloģiju, proti, tā apdzīvo skuju koku sveķus un mirušus zarus (Pratibha et al., 2005), jo *P. abies* brūcēs tika novērota sveķošanās. Suenenjoki izolāta paaugstinātais šīs ģints īpatsvars varētu būt saistīts ar lielāku sveķošanos, taču uzskatāmi lielāka sveķošanās šajā izolātā netika novērota, kas tomēr neizslēdz iespējamību par lielāku sveķošanos koksnes audos šajā izolātā. Šīs ģints palielināto īpatsvaru ietekmēja 35. koks, kurā Suenenjoki izolāts saturēja *Sorocybe* 50% īpatsvarā, kas ievērojami augstāk nekā pārējos paraugos.

Chaetothyriales klases neidentificētā ģints arī bija vienlīdz izplatīta visās apstrādes grupās. Jāatzīmē, ka šo taksonu veidoja 14 dažādi OTU ar neatpazītu ģinti, tādēļ visticamāk tie satur dažādas ģintis, iespējams, no dažādām dzimtām vai pat kārtām, tādēļ šī taksona relatīvi augstais īpatsvars nav uzskatāms par kādas konkrētas ģints klātbūtni. Vispārīgi *Chaetothyriales* kārtā satur daudzveidīgas vides un ekoloģiskās nišas apdzīvojošas sēnes, tostarp ķērpjus veidojošo sēnes, kā arī augu patogēnus, kā *Phialophora*; visas sugas ir melanizētas (Lücking &

Nelsen, 2018); Quan et al., 2020). *Chaetothyriales* kārtā satur arī *Herpotrichiellaceae* dzimtu, kuru veido dažādas sēnes, kas apdzīvo augus, kukaiņus, augsni, iežus, veido ķērpjus un dažas dzimtas sugas spēj izturēt ekstrēmās vides apstākļus, t. s. melnie raugi (Thitla et al., 2023). Arī *Herpotrichiellaceae* neidentificētā ģints saturēja 13 dažādus OTU, iespējams, ietverot sevī vairākas dažādas ģintis. *Chaetothyriales* kārtas taksonomija nav pavisam stabila ierobežotās DNS sekvenču pieejamības un nepietiekami aprakstīto taksonu dēļ (Quan et al. 2020). Rezultātā minētie taksoni *P. abies* brūces varētu apdzīvot kā augu vai sēņu patogēni, vai pat endofīti, kuri citās vidēs aizņem dažādas ekoloģiskajās nišas. Taksoniskās neprecizitātes dēļ *Chaetothyriales* un *Herpotrichiellaceae* neidentificētās ģintis nav vērā ņemamas, lai raksturotu *P. abies* brūču koksnes sēņu sabiedrību. Turpretī *Venturiales* kārtas neidentificētā ģints saturēja tikai divus OTU, tādēļ šim atradumam ir lielāka vērtība taksoniskās precizitātes dēļ. *Venturiales* kārtai raksturīgs saprotrofs vai parazitisks dzīvesveids uz ziedaugu, galvenokārt divdīgļlapju stumbriem un lapām (Zhang et al., 2011). Tā kā šīs kārtas pārstāvji atrasti *P. abies* brūču koksne, pastāv iespēja, ka *Venturiales* sēnes spēj apdzīvot arī *P. abies* vai skuju koku stumbru brūces.

Lophium ģints vislielākajā skaitā bija Suenenjoki izolāta brūcēs un mazākā – T3N izolātā, kam līdzīgā daudzumā tā bija arī Jappila izolātā, tomēr krietni zemākā daudzumā tā bija negatīvajā kontrolē. *Lophium* ģints ir zināma kā nobiru saprotrofs un ir novērota lapegles *Larix decidua* stumbra vēža brūcēs, vispārīgi bieži saistīta ar skuju kokiem (Hernández-Restrepo et al., 2016). Iespējams, mazāks koksnes audu bojājums negatīvās kontroles brūcēs radīja mazāk piemērotu nišu šai sēnei. Šis ģints klātesamība un daudzums *P. abies* koksne saskan ar Kļaviņa et al. (2023) pētījuma grupu, kas sastāvēja no apsaimniekotiem, retinātiem mežiem.

Thelephora ģints sēnēm raksturīga ektomikorizāla ekoloģija, dažām sugām piemīt vāja patogenitāte un saprotrofija (Colpaert, 1999). Iespējams, šis ģints sugas spēj apdzīvot arī *P. abies* vai citu skuju koku stumbra brūcēs kā nekrotisko audu saprotrofs.

Neonectria ģints šajā pētījumā arī ierindojās starp izplatītākajām ģintīm. Kā iepriekš minēts, daļa šīs ģints pēc filoģenētiskajām un morfoloģiskajām analīzēm ir pārklasificēta kā *Corinectria gen. nov.* (González & Chaverri 2017). UNITE datubāzē gan nav izmantota atjaunotā nomenklatūra, kā rezultātā ģenētiskā identifikācija ir aptuvena. Starp identificētajām *Neonectria* sugām nebija sugas ar epitetu *fuckeliana*, ne UNITE datubāzē, ne 10 labākajos BLAST hitos *Neonectria* OTU netika atrastas sugas ar minēto epitetu. Tādēļ nav informācijas, vai atrastie *Neonectria* taksoni ir *C. fuckeliana*. Pastāv iespēja, ka UNITE datubāzē publicētās sekvences vai to taksonomija ir neprecīzas. Tomēr var secināt, ka *Corinectria* vai *Neonectria* ģints 10 gadus pēc inokulācijas nerada ekoloģisku dominanci pār pārējām brūci apdzīvojošajām sēnēm, kā arī tās īpatsvars bija līdzīgs ar *C. fuckeliana* inokulētajās brūcēs un negatīvās

kontroles brūcēs, norādot uz tās iepriekš literatūrā aprakstīto vājo patogenitāti un *P. abies* endofītisko lomu (Roll-Hansen & Roll-Hansen 1979; Huse 1981; Crane et al. 2009; Hopkins et al. 2012).

Svarīgi pieminēt, ka paraugu taksonomiskajā sastāvā bija liela nozīme bija piederībai pie sava koka (S16. attēls). Ir skaidri redzams, ka nav vienveidības starp kokiem. Šo atklājumu atbalsta arī citi pētījumi, kuros secināts, ka apsēs un bērzos saimniekauga genotips ir noteicošais faktors endofītiskajām sabiedrībām (Lamit et al. 2014 un Albrechtsen et al. 2018 cit. pēc Romeralo et al., 2022). Meža, tostarp egļu kokaudzes sastāv no daudziem ģenētiskajiem variantiem, kas kopā ar vides faktoriem nosaka koka fenotipu (Ruņģis et al., 2019).

4.7.3. Brūces sēņu trofiskie veidi un alfa un beta daudzveidības

Tīri saprotrofo sēņu trofiskā veida dominance atšķiras no ar Klavina et al. (2023) pētījuma, kurā *P. abies* koksnē dominēja patogēnās sēnes. Maģistra darba pētījumā abām izplatītākajām sēņu ģintīm piemīt saprotrofs trofiskais veids, kā arī tāds tas ir *Sorocybe* un *Ascocoryne* ģintīm. Tāpat vairākas ar patotrofu un ar patotrofi-saprotrofu trofisko veidu pastāvošas sēņu ģintis novērotas starp izplatītākajām. Tas pamato šo trofisko veidu lielo īpatsvaru apstrādes grupās. Pastāv uzskats, ka endofītiskajām sēnēm ir loma koksnē noārdīšanās agrīno posmu iniciācijā (Sieber 2007), kā arī neskaidrā robeža starp patogēniem un endofītiem (Collinge et al. 2022) skaidro lielo saprotrofu un patotrofu īpatsvaru *P. abies* brūču koksnē. *C. fuckeliana* apstrādes grupās novērota nedaudz augstāka simbiotrofo sēņu klātbūtne, salīdzinot ar negatīvo kontroli. Daļa simbiotrofo sēņu pēc sava ekoloģiskā dzīvesveida FUNGuild anotācijā atzīmētas kā endofīti. Iespējams, ka *C. fuckeliana* infekcija palielina endofītu skaitu koksnē, taču vēlreiz ir jāmin – pašreizējā izpratne par to, kas ir uzskatāms par endofītu, ir neskaidra, tādēļ šādi spriedumi ir stipri spekulatīvi, lai izdarītu pārliecinošus spriedumus šajā sakarā; tikpat labi arī saprotrofā *Ascocoryne* ir atrodama vizuāli neizmainītā koksnē un uzskatīta par *P. abies* endofītu (Huse 1981).

Tomēr no izplatītāko ģinšu un trofisko grupu kopainas var secināt vienu – *P. abies* sākotnējā endofītiskā sabiedrība ir stabila, jo tanī lokāli kopīgi eksistējošie taksoni ir šķietami pastāvīgi un izturīgi pret citas sugas kolonizāciju. Jāmin, ka arī negatīvajā kontrolē tika radīta stumbra brūce, kas neapšaubāmi rada ekoloģisku traucējumu un var izraisīt sabiedrību pārveidošanos (Fukami 2015), līdzīgi kā *C. fuckeliana* apstrādes grupās. Lai spētu drošāk salīdzināt egles koksnē apdzīvojošo sēņu sabiedrības izmaiņas, vajadzētu kontrolēt arī mehāniskā bojājuma aspektu, proti, iegūt paraugus arī no neskartu egļu stumbriem. Šī atziņa nākusi par vēlu, kad jau parauglaukumā eksperimentālie koki tikuši aizvākti.

Taksonomisko līdzību starp apstrādes grupām apstiprina alfa un beta daudzveidības testu rezultāti. Novērotā OTU bagātīguma vērtības bija līdzīgas visām grupām, kā tas bija arī ar Šēnona koeficientu un Inverso Simpsona koeficientu. Salīdzinot ar Klavina et al. (2023) pētījumu, kur *P. abies* koksnes sēņu vidējā OTU bagātīguma vērtība bija 172, šajā maģistra darba pētījumā bija mazāks *P. abies* koksne novērotais sēņu OTU skaits apstrādes grupās, t.i., robežās no 98 līdz 120. Iespējams, infekcijas vai mehāniskā bojājuma radītās izmaiņas sēņu sabiedrībā nosliecās uz lielāku konkurenci, kam ir zināma koksnes sēņu daudzveidību samazinoša ietekme (Fukasawa & Matsukura, 2021). Jappila izolātam visi alfa daudzveidības rādītāji bija nedaudz augstāki par pārējām grupām, kas liecina par lielāku sugu bagātīgumu un vienmērīgumu šī izolāta veidotajās sēņu sabiedrībās (Thukral, 2017). Iespējams, Jappila izolāts veido nedaudz labvēlīgākus apstākļus simbiotiskām sēņu sugu attiecībām koksne.

Beta daudzveidības analīzes arī ticami apstiprināja apstrādes grupu savstarpējo taksonomisko līdzību, jo NMDS ordinācijā grafiski grupu centroīdi atradās tuvu viens otram, kā arī PERMANOVA tests, arī ņemot vērā koku kā nejaušo faktoru, uzrādīja nebūtisku rezultātu, turklāt arī pastāvēja grupu dispersiju homogenitāte. Tomēr vienīgā būtiskā atšķirība OTU kompozīcijā tika novērota starp vidēja resnuma un resniem egļu stumbriem, un tā ir ticama, jo stumbru caurmēra grupu dispersijas bija homogēnas. Ir zināms, ka pastāv būtiskas atšķirības sēņu sugu sastāvā starp koksnes pārpalikumu izmēriem (Juutilainen et al., 2014); un endofītiskās sēnes spēlē zināmu lomu agrīnajos koksnes noārdīšanās procesos (Collinge et al. 2022), kas rod iespējamu skaidrojumu novērotajai beta daudzveidības atšķirībai starp egļu stumbru caurmēriem.

Brūču izmēra PERMANOVA tests norādīja, ka nepastāv statistiski būtiskas atšķirības starp paraugiem OTU kompozīcijā. Tas skaidrojams ar to, ka kokaugiem piemīt genotipiskā daudzveidība, kas var stipri izmainīt endofītu sabiedrību sastāvu (Pan et al., 2008 un Arnold, 2007 cit. pēc Newcombe, 2011; Ruņģis et al., 2019). Egļu stumbra brūču izmēra saistība ar paraugu taksonomisko kompozīciju nebija viennozīmīga. Piemēram, 20. kokā, kur negatīvajā kontrolē bija izveidojusies samērā liela brūce (20.0 cm²), dominējošā ģints bija *Ascocoryne* (69%), taču 60. kokā, kur negatīvajai kontrolei bija maza brūce (4.5 cm²), arī dominējošā ģints bija *Ascocoryne* (90%). Līdzīgi neidentificētā *Geoglossaceae* dzimtas ģints bija dominējošā daudzos paraugos, bieži veidojot līdz 50% no parauga OTU, novērota paraugos ar krasi atšķirīgiem brūču izmēriem. Tomēr vairākos paraugos, konkrēti, 50. un 52. koku Suenenjoki izolātos, 20. un 26. koku Jappila izolātos, kā arī 20. koka negatīvajā kontrolē un 15. koka T3N izolātā novērota saistība starp lielāku brūces izmēru un taksonomisko sastāvu. Kad dominējošā ģints bija neidentificētā *Geoglossaceae*, kurai sekoja (mainīgā secībā) *Pucciniastrum*, neidentificētā *Venturiales* un *Sorocybe* ģintis, šiem paraugiem brūces bija lielākās to koku

ietvaros. *Geoglossaceae* dzimtas sēnēm ir saprofitisks dzīvesveids trūdošā veģetācijā (Cannon & Kirk, 2007), *Venturiales* ir uz augiem parazitisks dzīvesveids (Zhang et al. 2011), *Pucciniastrum* ir patogēns, kas saistīts ar *P. abies* mizas nekrozi (Hietala et al., 2007) un *Sorocybe* apdzīvo skuju koku sveķus un mirušus zarus (Pratibha et al., 2005). Iespējams, ka šo taksonu mijiedarbība veido tādu endofītisko sabiedrību, kas izraisa pastiprinātu brūču veidošanos *P. abies*. Bija arī gadījumi, kad liels brūces izmērs novērots paraugā, kas nesaturēja šos taksonus, vai saturēja daļu no tiem mazākā īpatsvarā. Liela nozīme augu apdzīvojošo sēņu sabiedrību struktūrā un rezultējošajā ietekmē ir secība, kādā tie ienāk saimniekaugā un to koncentrācija, turklāt svarīgs ir arī saimniekauga genotips (Newcombe, 2011; Fukami, 2015; Hardoim et al., 2015; Romeralo et al., 2022). Tādēļ būtu noderīgi noskaidrot minēto egļu genotipus, lai varētu apstiprināt novērotās saistības kauzalitāti.

Sarežģīto un neviennozīmīgo ietekmi uz brūces izmēra saistību ar brūci apdzīvojošo sēņu sabiedrību apstiprina arī PERMANOVA tests. Tajā netika novērotas būtiskas atšķirības starp paraugu OTU kompozīciju atkarībā no brūces izmēra, norādot uz citiem faktoriem, kuri varētu būt nozīmīgi brūču izmēru atšķirībās, piemēram, koka genotips. Vēl tika novērota atšķirība beta daudzveidībā starp sekvencēšanas piegājieniem un DNS izdales metodēm. Abos gadījumos bija uzskatāmi atšķirīgas grupu multivariētās dispersijas un DNS izdales metodēs – arī atšķirīgs paraugkopu izmērs, kas palielina I tipa kļūdas (neīstas atšķirības) pieļaušanas iespēju PERMANOVA testā (Hamidi et al., 2019). Brūces augšpusei vai apakšpusei nebija nozīmes paraugu OTU sastāvā, kas bija sagaidāms iznākums mazās attāluma atšķirības dēļ un vertikālā koksnes iekrāsojuma augšupējās un lejupējās izplatības dēļ.

4.7.4. Mikrobiālās ekoloģijas sadaļas kopsavilkums

Parastās egles brūces apdzīvojošo sēņu taksonomiskā kompozīcija bija lielā mērā līdzīga starp visiem apstrādes variantiem. To galvenokārt veidoja askusēnes un bazīdijšēnes un pārējo nodalījumu īpatsvars bija relatīvi mazs un atšķirības tajos veidoja atsevišķi paraugi (9. attēls un 3. tabula). Arī novērtējot sēņu trofisko veidu sastāvu, varēja secināt, ka apstrādes grupas lielā mērā ir līdzīgas, tās sastāvēja galvenokārt no saprotrofajām, patotrofajām un saprotrofi patotrofajām sēnēm. Nelielās izmaiņas paraugu taksonomiskajā kompozīcijā izraisīja tikai atsevišķi paraugi. Šos slēdzienus pamato apstrādes grupu alfa daudzveidība (15. attēls) un tās statistiskais salīdzinājums, kurā atšķirības starp grupām nebija būtiskas. Arī beta daudzveidības analīzē (16. attēls) PERMANOVA tests uzrādīja nebūtiskas atšķirības starp apstrādes grupām to OTU kompozīcijā.

P. abies brūču koksnes paraugos dominējošās ģintis bija nenoteiktā *Geoglossaceae* dzimtas ģints, *Heterobasidion*, *Pucciniastrum*, *Sorocybe*, *Ascocoryne*, *Malassezia*, *Lophium*, neidentificēta *Venturiales* klases ģints, *Thelephora* un *Neonectria* (4. tabula). Neidentificētās *Chaetothyriales* klases un *Herpotrichiellaceae* dzimtas ģintis saturēja līdz 14 dažādu OTU, kas varētu būt no dažādiem taksonomiskajiem līmeņiem. Tas varētu radīt kumulatīvu īpatsvaru un viest maldīgu priekšstatu par izplatītākajām ģintīm paraugos. Šī iemesla dēļ to klātbūtne netika ņemta vērā. Kad paraugos novērota paraugos *Heterobasidion* klātbūtne, tā veidoja gandrīz 100% parauga OTU, ko izraisīja egles sakņu trupe.

PERMANOVA analīzē netika atrastas būtiskas atšķirības paraugu OTU kompozīcijā atkarībā no brūces izmēra, tomēr tika novērota konkrētu taksonu sastāva iespējama nozīme brūču izmēra skaidrošanā. Paraugiem, kuriem dominējošajā ģints bija neidentificēta *Geoglossaceae*, un tai sekoja (mainīgā secībā) *Pucciniastrum*, neidentificēta *Venturiales* un *Sorocybe* ģintis, brūces bija lielākās to koku ietvaros. Tomēr vairumā gadījumu brūču lielums nebija atkarīgs no kādas konkrētas ģints vai to kombinācijām. To drīzāk noteica citi faktori, visticamāk, egles genotips, jo arī taksonomiskā kompozīcija bieži atšķīrās koku ietvaros (S16. attēls).

5. SECINĀJUMI

Visi *C. fuckeliana* izolāti radīja stumbra vēža simptomus *in vivo* eglēs, kuru izmērs statistiski būtiski atšķīrās no brūcēm, kuras izveidojās negatīvajā kontrolē ($p < 0.00$). Pārbaudīto izolātu patogenitāte būtiski atšķīrās – Suenenjoki brūce jo tas radīja vislielākās stumbra brūces ($28.6 \pm 17.8 \text{ cm}^2$), kam sekoja T3N ($21.6 \pm 12.5 \text{ cm}^2$) un Jappila ($17.2 \pm 11.0 \text{ cm}^2$), tomēr būtiski brūces izmērā Suenenjoki atšķīrās tikai no Jappila izolāta. Izveidotais vispārinātais lineārais jauktā efekta modelis ar apstrādes veidu un koka diametru kā regresoriem spēja izskaidrot 42.4% brūces izmēra mainības pēc 10 gadu infekcijas attīstības, kur nejaušo efektu 20.7% veidoja koka individuālās iezīmes.

Vislielākais brūču garuma un platuma pieaugums notika periodā pēc otrā gada sākuma līdz trešā gada sākumam: *C. fuckeliana* izolātiem garums un platums palielinājās attiecīgi par 152–169% un 86–87%, un negatīvajai kontrolei attiecīgi par 214% un 114%. Visās grupās turpmākajos septiņos gados brūču garums un platums saruka: vislielākais relatīvais sarukums bija *C. fuckeliana* brūcēm gan garumā, gan platumā, attiecīgi 16–18% un 46–48%, un negatīvajai kontrolei tas bija attiecīgi 3% un 20%. *C. fuckeliana* izolātu radīto brūču garuma un platuma izmaiņas bija stipri līdzīgas un tās sakrita kļūdu robežās arī ar negatīvo kontroli, kam par iemeslu ir plašais vērtību diapazons, ko noteica koku individuālās īpašības.

Visstiprāko krāsojumu koksne radīja Suenenjoki un Jappila izolāti, tomēr iekrāsojuma distances atšķirības starp apstrādes grupām nebija būtiskas, jo vairumā gadījumu krāsojums aizņēma visu analizēto stumbra fragmentu.

Suenenjoki un Jappila izolātiem bija augstākā micēlija saglabāšanās koksne brūces zonā. Turpretī visbiežāk no tālākajiem punktiem izdalīts T3N izolāts, kas vedina domāt uz tā spēju aktīvāk izplatīties par Suenenjoki un Jappila izolātiem.

Lielāks stumbra brūces izmērs tika novērots, kad paraugā dominējošā ģints bija neidentificētā *Geoglossaceae*, kurai sekoja (mainīgā secībā) *Pucciniastrum*, neidentificētā *Venturiales* un *Sorocybe* ģintis. Tomēr vairumā gadījumu *C. fuckeliana* brūču attīstību neietekmēja konkrētas sēņu sugas, bet gan koka individuālās īpatnības. T3N izolātam bija vislielākā saistība ar augu patogēnu antagonistu *Ascocoryne* ģinti – gan T3N izolāta kultūrās, gan ģenētiski no koksnes tā tika biežāk izdalīta kopā. T3N izolātam bija arī visvājākais koksnes krāsojums, tādēļ tas uzskatāms par vismazāk patogēno no analizētajiem *C. fuckeliana* izolātiem.

BIBLIOGRĀFIJA

Abarenkov, K., Henrik Nilsson, R., Larsson, K., Alexander, I. J., Eberhardt, U., Erland, S., Høiland, K., Kjøller, R., Larsson, E., Pennanen, T., Sen, R., Taylor, A. F. S., Tedersoo, L., Ursing, B. M., Vrålstad, T., Liimatainen, K., Peintner, U., & Kõljalg, U. (2010). The UNITE database for molecular identification of fungi – recent updates and future perspectives. *New Phytologist*, *186*(2), 281–285. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03160.x>

Abrams, P. A., & Rueffler, C. (2009). Coexistence and limiting similarity of consumer species competing for a linear array of resources. *Ecology*, *90*(3), 812–822. <https://doi.org/10.1890/08-0446.1>

Anslan, S., Bahram, M., Hiiesalu, I., & Tedersoo, L. (2017). PipeCraft: Flexible open-source toolkit for bioinformatics analysis of custom high-throughput amplicon sequencing data. *Molecular Ecology Resources*, *17*(6). <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12692>

Arbizu, M. P. 2020. pairwiseAdonis: Pairwise multilevel comparison using adonis. R package version 0.4

Arnerup, J. 2011. Induced defence responses in *Picea abies* triggered by *Heterobasidion annosum* s.l. Doktora disertācija, Upsala, Zviedrijas Lauksaimniecības universitāte, 54 lpp.

Barriuso, J., Hogan, D. A., Keshavarz, T., & Martínez, M. J. (2018). Role of quorum sensing and chemical communication in fungal biotechnology and pathogenesis. *FEMS Microbiology Reviews*, *42*(5), 627–638. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy022>

Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2015). Fitting Linear Mixed-Effects Models Using **lme4**. *Journal of Statistical Software*, *67*(1). <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>

Bebber, D. P., Ramotowski, M. A. T., & Gurr, S. J. (2013). Crop pests and pathogens move polewards in a warming world. *Nature Climate Change*, *3*(11), 985–988. <https://doi.org/10.1038/nclimate1990>

Bengtsson-Palme, J., Ryberg, M., Hartmann, M., Branco, S., Wang, Z., Godhe, A., De Wit, P., Sánchez-García, M., Ebersberger, I., de Sousa, F., Amend, A., Jumpponen, A., Unterseher, M., Kristiansson, E., Abarenkov, K., Bertrand, Y. J. K., Sanli, K., Eriksson, K. M., Vik, U., ... Nilsson, R. H. (2013). Improved software detection and extraction of ITS1 and <sc>ITS</sc> 2 from ribosomal <sc>ITS</sc> sequences of fungi and

other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data. *Methods in Ecology and Evolution*, 4(10), 914–919. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12073>

Bigeard, J., Colcombet, J., & Hirt, H. (2015). Signaling Mechanisms in Pattern-Triggered Immunity (PTI). *Molecular Plant*, 8(4), 521–539. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.022>

Blaalid, R., Kumar, S., Nilsson, R. H., Abarenkov, K., Kirk, P. M., & Kausrud, H. (2013). ITS1 versus ITS2 as DNA metabarcodes for fungi. *Molecular Ecology Resources*, 13(2), 218–224. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12065>

Booth, C. 1959. Studies of Pyrenomycetes. IV. Nectria (part 1). *Mycol Pap* 73:115.

Bray, J. R., & Curtis, J. T. (1957). An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs*, 27(4), 325–349. <https://doi.org/10.2307/1942268>

Brown, S. P., Rigdon-Huss, A. R., & Jumpponen, A. (2014). Analyses of ITS and LSU gene regions provide congruent results on fungal community responses. *Fungal Ecology*, 9, 65–68. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2014.02.002>

Burņeviča, N., Jansons, A., Zaluma, A., Klavina, D., Jansons, J., & Gaitnieks, T. (2016). Fungi Inhabiting Bark Stripping Wounds Made by Large Game on Stems of *Picea abies* (L.) Karst. in Latvia. *Baltic Forestry*, 22(1), 2–7.

Caudullo, G., Tinner, W., de Rigo, D. 2016. *Picea abies* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In: San-Miguel-Ayanz, J.; de Rigo, D.; Caudullo, G.; Houston Durrant, T.; Mauri, A. (eds.) *European Atlas of Forest Tree Species* (pp. 114-116). Luxembourg: Publication Office of the European Union

Christiansen, E., Krokene, P., Berryman, A. A., Franceschi, V. R., Krekling, T., Lieutier, F., Lonneborg, A., & Solheim, H. (1999). Mechanical injury and fungal infection induce acquired resistance in Norway spruce. *Tree Physiology*, 19(6), 399–403. <https://doi.org/10.1093/treephys/19.6.399>

Collinge, D. B., Jensen, B., & Jørgensen, H. J. (2022). Fungal endophytes in plants and their relationship to plant disease. *Current Opinion in Microbiology*, 69, 102177. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2022.102177>

Colpaert, J. V. (1999). *Thelephora*. In *Ectomycorrhizal Fungi Key Genera in Profile* (pp. 325–345). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-06827-4_14

Crane, P. E., Dick, M. A. 2006. Epidemiology of *Nectria fuckeliana* in *Pinus radiata*. New Zealand Plant Protection Society, Poster Abstracts, 369.

Crane, P. E., Hopkins, A. J. M., Dick, M. A., & Bulman, L. S. (2009). Behaviour of *Neonectria fuckeliana* causing a pine canker disease in New Zealand. *Canadian Journal of Forest Research*, 39(11), 2119–2128. <https://doi.org/10.1139/X09-133>

Delignette-Muller, M. L., & Dutang, C. (2015). fitdistrplus : An R Package for Fitting Distributions. *Journal of Statistical Software*, 64(4). <https://doi.org/10.18637/jss.v064.i04>

Dexter, E., Rollwagen-Bollens, G., & Bollens, S. M. (2018). The trouble with stress: A flexible method for the evaluation of nonmetric multidimensional scaling. *Limnology and Oceanography: Methods*, 16(7), 434–443. <https://doi.org/10.1002/lom3.10257>

Dick, M. A., & Crane, P. E. (2009). *Neonectria fuckeliana* is pathogenic to *Pinus radiata* in New Zealand. *Australasian Plant Disease Notes*, 4(1), 12–14. <https://doi.org/10.1071/DN09005>

Dzurendova, S., Losada, C. B., Dupuy-Galet, B. X., Fjær, K., & Shapaval, V. (2022). Mucoromycota fungi as powerful cell factories for modern biorefinery. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(1), 101–115. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11720-1>

Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., & Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27(16), 2194–2200. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381>

Fife, D. (2022). Flexplot: Graphically-based data analysis. *Psychological Methods*, 27(4), 477–496. <https://doi.org/10.1037/met0000424>

Flor, H. H. (1971). Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annual Review of Phytopathology*, 9(1), 275–296. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.09.090171.001423>

Frøslev, T. G., Kjølner, R., Bruun, H. H., Ejrnæs, R., Brunbjerg, A. K., Pietroni, C., & Hansen, A. J. (2017). Algorithm for post-clustering curation of DNA amplicon data yields reliable biodiversity estimates. *Nature Communications*, 8(1), 1188. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01312-x>

Fukami, T. (2015). Historical Contingency in Community Assembly: Integrating Niches, Species Pools, and Priority Effects. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 46(1), 1–23. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110411-160340>

Fukasawa, Y., & Matsukura, K. (2021). Decay stages of wood and associated fungal communities characterise diversity–decomposition relationships. *Scientific Reports*, 11(1), 8972. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88580-2>

Gaitnieks, T., Brūna, L., Burņeviča, N., Kenigšvalde, K., Kļaviņa, D., Zaļuma, A. 2019. Sakņu trupe egļu audzēs: saimnieciskie zaudējumi, trupi izraisošo sēņu bioloģija un

izplatības ierobežošana, Grām: Jansons J., Vienvecuma egļu meži Latvijā, Salaspils, Daugavpils universitātes akadēmiskais apgāds "Saule", Salaspils, 119-138.

Garbelotto, M., & Gonthier, P. (2013). Biology, Epidemiology, and Control of Heterobasidion Species Worldwide. *Annual Review of Phytopathology*, 51(1), 39–59. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102225>

Geffert, A., Geffertova, J., & Dudiak, M. (2019). Direct Method of Measuring the pH Value of Wood. *Forests*, 10(10), 852. <https://doi.org/10.3390/f10100852>

Global Biodiversity Information Facility. 2022. *Corinectria fuckeliana* (C.Booth) <https://www.gbif.org/occurrence/map?q=nectria%20fuckeliana> Skatīts 14.01.2023.

González, C. D., & Chaverri, P. (2017). *Corinectria*, a new genus to accommodate *Neonectria fuckeliana* and *C. constricta* sp. nov. from *Pinus radiata* in Chile. *Mycological Progress*, 16(11–12), 1015–1027. <https://doi.org/10.1007/s11557-017-1343-8>

González, C. D., Morales, R. A., & Chaverri, P. (2020). Life cycle and in vitro sporulation dynamics of *Corinectria constricta*, the causal agent of *Pinus radiata* stem canker, in Chile. *Forest Pathology*, 50(3). <https://doi.org/10.1111/efp.12594>

Gryganskyi, A. P., Humber, R. A., Smith, M. E., Hodge, K., Huang, B., Voigt, K., & Vilgalys, R. (2013). Phylogenetic lineages in <I>Entomophthoromycota</I> *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 30(1), 94–105. <https://doi.org/10.3767/003158513X666330>

Hamidi, B., Wallace, K., Vasu, C., & Alekseyenko, A. V. (2019). Wd-test: robust distance-based multivariate analysis of variance. *Microbiome*, 7(1), 51. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0659-9>

Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., Döring, M., & Sessitsch, A. (2015). The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3), 293–320. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00050-14>

Hietala, A. M., Solheim, H., & Fossdal, C. G. (2008). Real-Time PCR-Based Monitoring of DNA Pools in the Tri-Trophic Interaction Between Norway Spruce, the Rust *Thekopsora areolata*, and an Opportunistic Ascomycetous *Phomopsis* sp. *Phytopathology*, 98(1), 51–58. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-1-0051>

Holm, S. (1979). A Simple Sequentially Rejective Multiple Test Procedure. *Scandinavian Journal of Statistics*, 6(2), 65–70. <http://www.jstor.org/stable/4615733>

Hopkins, A. J. M., Dick, M. A., Carlson, C. A., & Crane, P. E. (2012). Early investigations into the infection courts used by *Neonectria fuckeliana* to enter *Pinus radiata*

stems. *European Journal of Plant Pathology*, 132(4), 537–548.
<https://doi.org/10.1007/s10658-011-9899-7>

Huse, K. J. (1981). The distribution of fungi in sound-looking stems of *Picea abies* in Norway. *European Journal of Forest Pathology*, 11(1–2), 1–6.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.1981.tb00063.x>

Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>

Jones, M. D. M., Richards, T. A., Hawksworth, D. L., & Bass, D. (2011). Validation and justification of the phylum name Cryptomycota phyl. nov. *IMA Fungus*, 2(2), 173–175. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2011.02.02.08>

Juutilainen, K., Mönkkönen, M., Kotiranta, H., & Halme, P. (2014). The effects of forest management on wood-inhabiting fungi occupying dead wood of different diameter fractions. *Forest Ecology and Management*, 313, 283–291.
<https://doi.org/10.1016/j.foreco.2013.11.019>

Klavina, D., Tedersoo, L., Agan, A., Adamson, K., Bitenieks, K., Gaitnieks, T., & Drenkhan, R. (2022). Soil fungal communities in young Norway spruce-dominant stands: footprints of former land use and selective thinning. *European Journal of Forest Research*, 141(3), 503–516. <https://doi.org/10.1007/s10342-022-01454-8>

Klavina, D., Tedersoo, L., Agan, A., Zaluma, A., Bitenieks, K., Polmanis, K., Daugaviete, M., Gaitnieks, T., & Drenkhan, R. (2023). Effect of stand thinning, former land use and individual tree parameters on wood inhabiting fungal community composition in young living Norway spruce. *Fungal Ecology*, 65, 101281.
<https://doi.org/10.1016/j.funeco.2023.101281>

Korlach, J., Bjornson, K. P., Chaudhuri, B. P., Cicero, R. L., Flusberg, B. A., Gray, J. J., Holden, D., Saxena, R., Wegener, J., & Turner, S. W. (2010). *Real-Time DNA Sequencing from Single Polymerase Molecules* (pp. 431–455).
[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(10\)72001-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)72001-2)

Krišāns, O. 2020. Parastās egles (*Picea abies* (L.) H. Karst.) vēja noturības izmaiņas sakņu trupes un stumbra mizas bojājumu ietekmē. Promocijas darbs, Salaspils, LVMI Silava 72 lpp.

Krokene, P., Solheim, H., & Christiansen, E. (2001). Induction of disease resistance in Norway spruce (*Picea abies*) by necrotizing fungi. *Plant Pathology*, 50(2), 230–233.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00559.x>

Kubiak, K., Żółciak, A., Damszel, M., Lech, P., & Sierota, Z. (2017). Armillaria Pathogenesis under Climate Changes. *Forests*, 8(4), 100. <https://doi.org/10.3390/f8040100>

Küngas, K., Bahram, M., & Pöldmaa, K. (2020). Host tree organ is the primary driver of endophytic fungal community structure in a hemiboreal forest. *FEMS Microbiology Ecology*, 96(2). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz199>

Lee, M. R., Powell, J. R., Oberle, B., Cornwell, W. K., Lyons, M., Rigg, J. L., & Zanne, A. E. (2019). Good neighbors aplenty: fungal endophytes rarely exhibit competitive exclusion patterns across a span of woody habitats. *Ecology*, 100(9). <https://doi.org/10.1002/ecy.2790>

Lelde Grantina-Ievina, Raimonds Kasparinskis, Guntis Tabors, & Vizma Nikolajeva. (2013). Features of saprophytic soil microorganism communities in conifer stands with or without *Heterobasidion annosum* sensu lato infection: a special emphasis on *Penicillium* spp. *Environmental and Experimental Biology*, 11, 23–28.

Lo Presti, L., Lanver, D., Schweizer, G., Tanaka, S., Liang, L., Tollot, M., Zuccaro, A., Reissmann, S., & Kahmann, R. (2015). Fungal Effectors and Plant Susceptibility. *Annual Review of Plant Biology*, 66(1), 513–545. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-114623>

Lücking, R., & Nelsen, M. P. (2018). Ediacarans, Protolichens, and Lichen-Derived *Penicillium*. In *Transformative Paleobotany* (pp. 551–590). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813012-4.00023-1>

LVĢMC 2013. Laikapstākļu gada pārskats. <https://web.archive.org/web/20160618024711/http://meteo.lv/lapas/laika-apstakli/klimatiska-informacija/laika-apstaklu-raksturojums/2013/?nid=784> Skatīts 10.11.2023.

LVMI Silava. 2022. Nacionālais meža monitorings <https://www.silava.lv/petnieciba/nacionalais-meza-monitorings> Skatīts 22.10.2023.

Mann, R. 2013. Genomic and Metabolomic Diversity of the Native Bioprotectant Endophytes, *Nodulisporium* and *Ascocoryne*. Doktora disertācija, Bundoora, La Trobe universitāte, 279 lpp.

Manzotti, A., Bergna, A., Burow, M., Jørgensen, H. J. L., Cernava, T., Berg, G., Collinge, D. B., & Jensen, B. (2020). Insights into the community structure and lifestyle of the fungal root endophytes of tomato by combining amplicon sequencing and isolation approaches with phytohormone profiling. *FEMS Microbiology Ecology*, 96(5). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa052>

Marčiulynas, A., Marčiulygienė, D., Mishcherikova, V., Franić, I., Lynikienė, J., Gedminas, A., & Menkis, A. (2022). High Variability of Fungal Communities Associated with the Functional Tissues and Rhizosphere Soil of *Picea abies* in the Southern Baltics. *Forests*, *13*(7), 1103. <https://doi.org/10.3390/f13071103>

Margarita Hernández-Restrepo, René K. Schumacher, Michael J. Wingfield, Ishtiaq Ahmad, Lei Cai, Tuan A. Duong, Jacqueline Edwards, Josepa Gené, Johannes Z. Groenewald, Sana Jabeen, Abdul Nasir Khalid, Lorenzo Lombard, Hugo Madrid, Yasmina Marin-Felix, Seonju Marincowitz, Andrew N. Miller, Kunhiraman C. Rajeshkumar, Abdul Rashid, Samina Sarwar, ... Pedro W. Crous. (2016). Fungal systematics and evolution: FUSE 2. *Sydowia*, *68*, 193–230. <https://doi.org/10.12905/0380.sydowia68-2016-0193>

Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.Journal*, *17*(1), 10. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>

McCarthy, C. G. P., & Fitzpatrick, D. A. (2017). *Multiple Approaches to Phylogenomic Reconstruction of the Fungal Kingdom* (pp. 211–266). <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2017.09.006>

McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, *8*(4), e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>

Mishra, S., Bhattacharjee, A., & Sharma, S. (2021). An Ecological Insight into the Multifaceted World of Plant-Endophyte Association. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *40*(2), 127–146. <https://doi.org/10.1080/07352689.2021.1901044>

Mitchell, J. K., Garrido-Benavent, I., Quijada, L., & Pfister, D. H. (2021). Sareomycetes: more diverse than meets the eye. *IMA Fungus*, *12*(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s43008-021-00056-0>

Møller, A., & Jennions, M. D. (2002). How much variance can be explained by ecologists and evolutionary biologists? *Oecologia*, *132*(4), 492–500. <https://doi.org/10.1007/s00442-002-0952-2>

Neely, D. 1988. Tree wound closure. *Journal of Arboriculture*, *14*(6), 148-152.

Newcombe, G. (2011). *Endophytes in Forest Management: Four Challenges* (pp. 251–262). https://doi.org/10.1007/978-94-007-1599-8_16

Nguyen, N. H., Song, Z., Bates, S. T., Branco, S., Tedersoo, L., Menke, J., Schilling, J. S., & Kennedy, P. G. (2016). FUNGuild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecology*, *20*, 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.06.006>

- O'Brien, R. M. (2007). A Caution Regarding Rules of Thumb for Variance Inflation Factors. *Quality & Quantity*, *41*(5), 673–690. <https://doi.org/10.1007/s11135-006-9018-6>
- Oksanen J, Simpson G, Blanchet F, Kindt R, Legendre P, Minchin P, O'Hara R, Solymos P, Stevens M, Szoecs E, Wagner H, Barbour M, Bedward M, Bolker B, Borcard D, Carvalho G, Chirico M, De Caceres M, Durand S, ... Weedon J. (2022). *vegan: Community Ecology Package* (R package version 2.6-4). <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- P. F. Cannon, & P. M. Kirk. (2007). *Fungal Families of the World*. CABI.
- Paulson, J. N., Stine, O. C., Bravo, H. C., & Pop, M. (2013). Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys. *Nature Methods*, *10*(12), 1200–1202. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2658>
- Pautasso, M., Döring, T. F., Garbelotto, M., Pellis, L., & Jeger, M. J. (2012). Impacts of climate change on plant diseases—opinions and trends. *European Journal of Plant Pathology*, *133*(1), 295–313. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-9936-1>
- Pavlov, I. N., Vasaitis, R., Litovka, Y. A., Stenlid, J., Jankovsky, L., Timofeev, A. A., & Menkis, A. (2020). Occurrence and pathogenicity of *Corinectria* spp. – an emerging canker disease of *Abies sibirica* in Central Siberia. *Scientific Reports*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62566-y>
- Pettersson, M., Talgø, V., Frampton, J., Karlsson, B., & Rönnerberg, J. (2018). Pathogenicity of *Neonectria fuckeliana* on Norway spruce clones in Sweden and potential management strategies. *Forests*, *9*(3). <https://doi.org/10.3390/f9030105>
- Quan, Y., Muggia, L., Moreno, L. F., Wang, M., Al-Hatmi, A. M. S., da Silva Menezes, N., Shi, D., Deng, S., Ahmed, S., Hyde, K. D., Vicente, V. A., Kang, Y., Stielow, J. B., & de Hoog, S. (2020). A re-evaluation of the Chaetothyriales using criteria of comparative biology. *Fungal Diversity*, *103*(1), 47–85. <https://doi.org/10.1007/s13225-020-00452-8>
- R Core Team. (2022). *R: A language and environment for statistical computing* (4.2.1. "Funny-Looking Kid"). <https://www.R-project.org/>
- Ramsfield, T. D., Power, M. W., & Kimberley, M. O. (2013). The relationship between pruning and the incidence of *Neonectria fuckeliana* in *Pinus radiata*. *New Zealand Journal of Forestry Science*, *43*(1), 13. <https://doi.org/10.1186/1179-5395-43-13>
- Rodriguez, R. J., White Jr, J. F., Arnold, A. E., & Redman, R. S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, *182*(2), 314–330. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x>

Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., & Mahé, F. (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4, e2584. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>

Roll-Hansen F, & Roll-Hansen Helga. (1979). Microflora of sound-looking wood in *Picea abies* stems. *Forest Pathology*, 9, 308–316.

Romeralo, C., Martín-García, J., Martínez-Álvarez, P., Muñoz-Adalia, E. J., Gonçalves, D. R., Torres, E., Witzell, J., & Diez, J. J. (2022). Pine species determine fungal microbiome composition in a common garden experiment. *Fungal Ecology*, 56, 101137. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2021.101137>

Ruņģis, D. E., Gaile, A., Veinberga, I. 2019. Ģenētiskie faktori vienvecuma egļu audzēs, Grām: Jansons J., Vienvecuma egļu meži Latvijā, Salaspils, Daugavpils universitātes akadēmiskais apgāds "Saule", Salaspils, 119-138.

Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Bolchacova, E., Voigt, K., Crous, P. W., Miller, A. N., Wingfield, M. J., Aime, M. C., An, K.-D., Bai, F.-Y., Barreto, R. W., Begerow, D., Bergeron, M.-J., Blackwell, M., ... Schindel, D. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>

Schultz M. E., & Parmeter J. R. Jr. (1990). A Canker Disease of *Abies Concolor* Caused by *Nectria Fuckeliana*. *Plant Disease*, 74(2), 178–180.

Shao, J. (1996). Bootstrap Model Selection. *Journal of the American Statistical Association*, 91(434), 655–665. <https://doi.org/10.1080/01621459.1996.10476934>

Shapiro, S. S., & Wilk, M. B. (1965). An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). *Biometrika*, 52(3/4), 591. <https://doi.org/10.2307/2333709>

Sieber, T. N. (2007). Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? *Fungal Biology Reviews*, 21(2–3), 75–89. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.05.004>

S.J. PRATIBHA, P. GAWAS, B.D. SHENOY, K.D. HYDE, & D.J. BHATA. (2005). *Chalara indica* sp nov. and *Sorocybe indicus* sp. nov. from India. *Cryptogamie, Mycologie*, 26(2), 97–103.

Stone, J. K., Polishook, J. D., & White, J. F. (2004). ENDOPHYTIC FUNGI. In *Biodiversity of Fungi* (pp. 241–270). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012509551-8/50015-5>

Stone, J., & Petrini, O. (1997). Endophytes of Forest Trees: a Model for Fungus-Plant Interactions. In *Plant Relationships Part B* (pp. 129–140). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-60647-2_8

Sturrock, R. N., Frankel, S. J., Brown, A. V., Hennon, P. E., Kliejunas, J. T., Lewis, K. J., Worrall, J. J., & Woods, A. J. (2011). Climate change and forest diseases. *Plant Pathology*, *60*(1), 133–149. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02406.x>

Sun, X., Ding, Q., Hyde, K. D., & Guo, L. D. (2012). Community structure and preference of endophytic fungi of three woody plants in a mixed forest. *Fungal Ecology*, *5*(5), 624–632. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2012.04.001>

Tanaka, S., & Kahmann, R. (2021). Cell wall-associated effectors of plant-colonizing fungi. *Mycologia*, *113*(2), 247–260. <https://doi.org/10.1080/00275514.2020.1831293>

Theelen, B., Cafarchia, C., Gaitanis, G., Bassukas, I. D., Boekhout, T., & Dawson, T. L. (2018). *Malassezia* ecology, pathophysiology, and treatment. *Medical Mycology*, *56*(suppl_1), S10–S25. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx134>

Thermo Scientific 2012. T123 – TECHNICAL BULLETIN. <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/T123-NanoDrop-Lite-Interpretation-of-Nucleic-Acid-260-280-Ratios.pdf> Skatīts 18.10.2023.

Thitla, T., Kumla, J., Hongsanan, S., Senwana, C., Khuna, S., Lumyong, S., & Suwannarach, N. (2023). Exploring diversity rock-inhabiting fungi from northern Thailand: a new genus and three new species belonged to the family Herpotrichiellaceae. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1252482>

Thukral, A. K. (2017). A review on measurement of Alpha diversity in biology. *Agricultural Research Journal*, *54*(1), 1. <https://doi.org/10.5958/2395-146X.2017.00001.1>

Tian, X., Ding, H., Ke, W., & Wang, L. (2021). Quorum Sensing in Fungal Species. *Annual Review of Microbiology*, *75*(1), 449–469. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-060321-045510>

Uimari Anne, Poteri Marja, & Vuorinen Martti. (2018). *Neonectria* canker on Norway spruce in Finland. In Talgø Venche & Børve Jorunn (Eds.), *Neonectria cankers on trees – Abstract book, SNS/NKJ network meeting*.

University of California Agriculture & Natural Resources. 2022. Pine wilt nematode. <https://ipm.ucanr.edu/PMG/GARDEN/PLANTS/INVERT/pinewdnem.html> Skatīts 20.11.2023.

Vainio, E. J., & Hantula, J. (2000). Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycological Research*, *104*(8), 927–936. <https://doi.org/10.1017/S0953756200002471>

Vasiliauskas, R., & Stenlid, J. (1998). Fungi inhabiting stems of *Picea abies* in a managed stand in Lithuania. *Forest Ecology and Management*, *109*, 119–126.

Vasiliauskas, R., Stenlid, J., & Johansson, M. (1996). Fungi in bark peeling wounds of *Picea abies* in central Sweden. *Forest Pathology*, *26*(6), 285–296. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.1996.tb01074.x>

Venche Talgø, May Bente Brurberg, & Arne Stensvand. (2012). Neonectria-canker on trees in Norway. *Journal of Agricultural Extension and Rural Development*, *4*(9). <https://doi.org/10.5897/jaerd12.062>

Verbylaite, R., Beišys, P., Rimas, V., Kuusiene, S. 2010. Comparison of Ten DNA Extraction Protocols from Wood of European Aspen (*Populus tremula* L.). *Baltic Forestry*. *16*, 35-42.

Větrovský, T., Baldrian, P., & Morais, D. (2018). SEED 2: a user-friendly platform for amplicon high-throughput sequencing data analyses. *Bioinformatics*, *34*(13), 2292–2294. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty071>

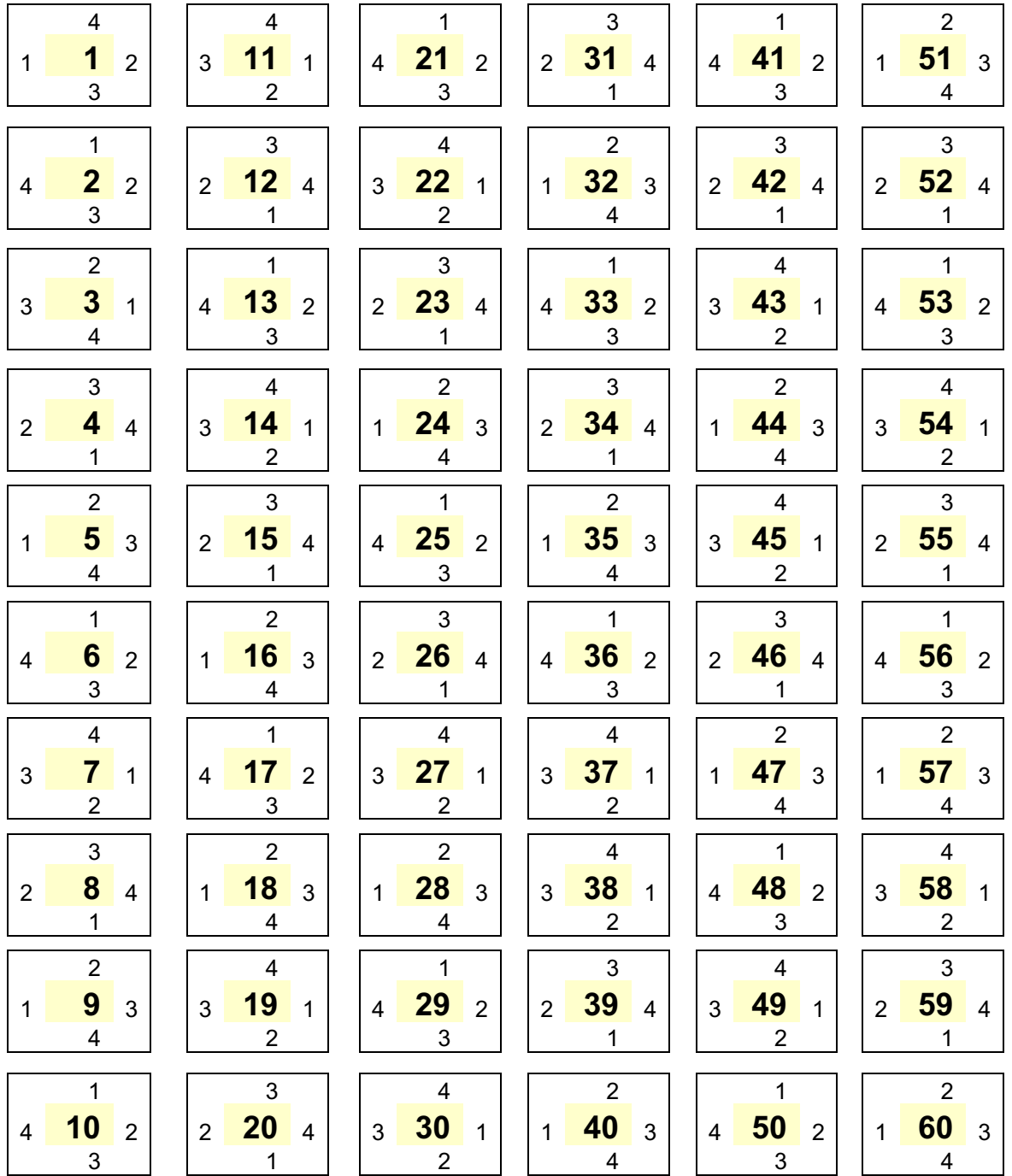
Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., McGowan, L., François, R., Grolemund, G., Hayes, A., Henry, L., Hester, J., Kuhn, M., Pedersen, T., Miller, E., Bache, S., Müller, K., Ooms, J., Robinson, D., Seidel, D., Spinu, V., ... Yutani, H. (2019). Welcome to the Tidyverse. *Journal of Open Source Software*, *4*(43), 1686. <https://doi.org/10.21105/joss.01686>

Zeileis, A., Hothorn T. 2002. Diagnostic Checking in Regression Relationships. *R News*, *2*(3), 7–10.

Zhang, Y., Crous, P. W., Schoch, C. L., Bahkali, A. H., Guo, L. D., & Hyde, K. D. (2011). A molecular, morphological and ecological re-appraisal of Venturiales—a new order of Dothideomycetes. *Fungal Diversity*, *51*(1), 249–277. <https://doi.org/10.1007/s13225-011-0141-x>

PIELIKUMI

CEĻŠ



Koka numurs

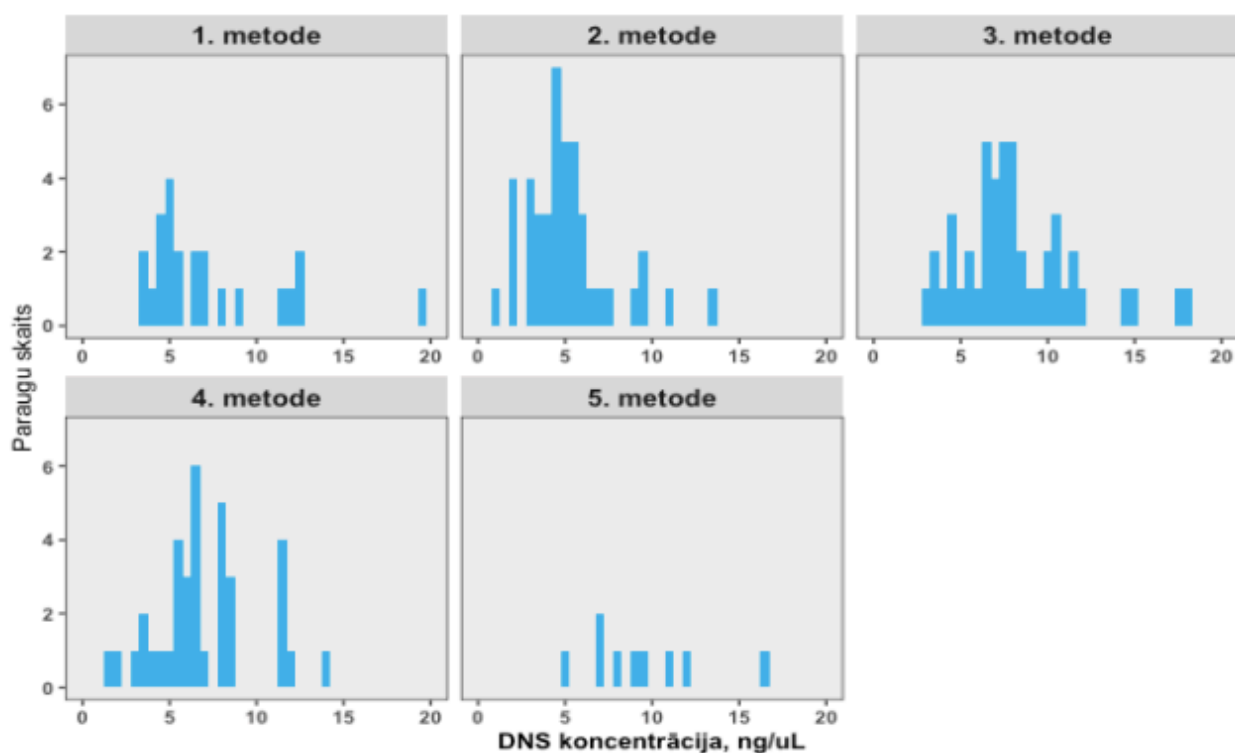
Apstrāde/Krāsa

- 1 Suenējoki
- 2 Jappila
- 3 T3N
- 4 NK

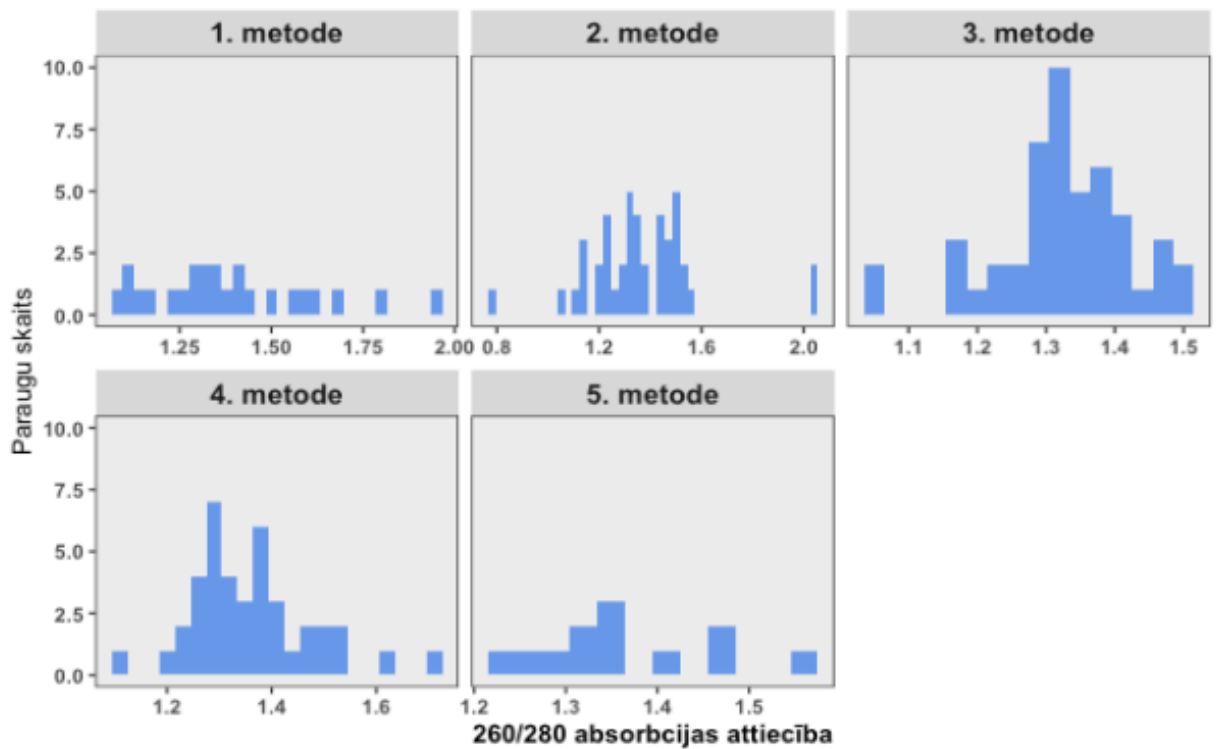
S1. attēls. Parauglaukuma shēma.
Figure S1. Scheme of sample plot.

S1. tabula. DNS izdalīšanas metožu atšķirīgie soļi.
Table S1. Steps of the various DNA isolation methods.

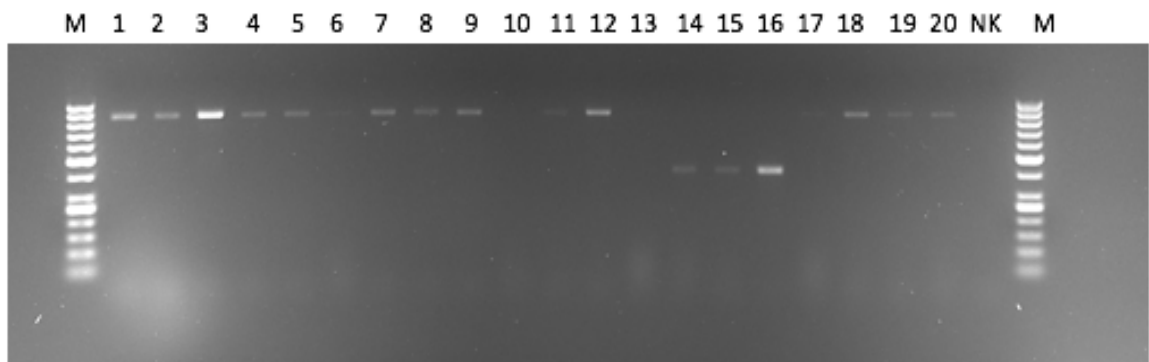
Soļi	1.metode	2. metode	3. metode	4. metode	5. metode
Homogenizācija, ar Noārdīšanas šķīdumu	1. 2 min/ 29 Hz ar 160uL	1. 2 min/ 29 Hz ar 160uL	1. 2 min/ 29 Hz ar 160uL	1. 2 min/ 29 Hz ar 160uL	1. 2 min/ 29 Hz ar 160uL
Noārdīšanas šķīdums/ Proteināze K (uL)	2. 210/20	2. 400/44	2. 300/33	2. 300/33	2. 0/30
Ūdens vanna pie 56 oC	3. 2h	3. 2h	3. 2h	3. 2h	3. 2h
RNāze A (uL)	4. 20	4. 20	4. 33	4. 20	4. 20
Līzes šķīdums (uL)	5. 200	5. 300	5. 333	5. 200	5. 200
50% etanols (uL)	6. 400	6. 600	6. 666	6. 400	6. 400



S2. attēls. DNS izdalīšanas metodes ietekme uz DNS koncentrāciju.
Figure S2. Effect of DNA extraction method on DNA concentration

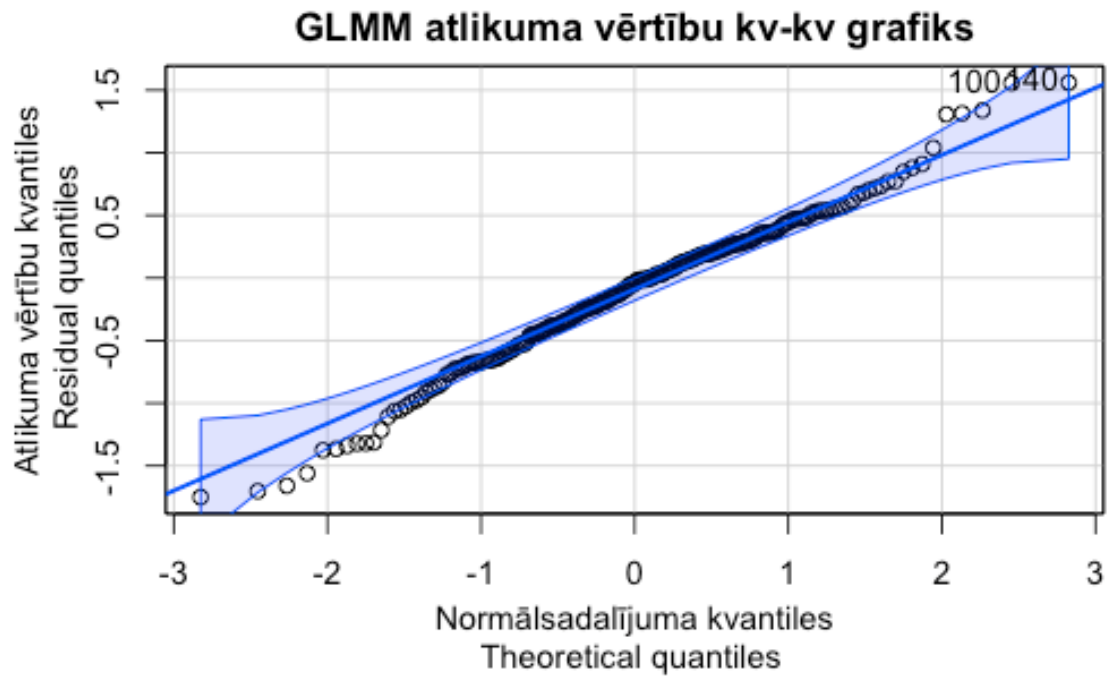


S3. attēls. DNS izdalīšanas metodes ietekme uz 260/280 absorbcijas attiecību.
Figure S3. Effect of DNA extraction method on 260/280 absorption ratio.

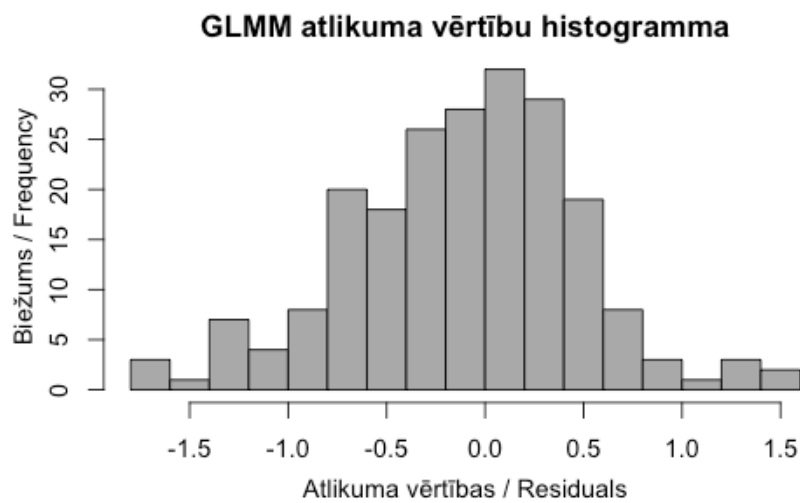


S4. attēls. Gēla elektroforēze ar specifiskajiem praimeriem amplificētiem *Heterobasidion* kultūru DNS paraugiem; šī pētījuma paraugi ir bedrītēs 1-12, pēc migrācijas līnijas identificēti kā *H. parviporum*.

Figure S4. Gel electrophoresis with cultured *Heterobasidion* DNA sequenced with specific primers; 1-12 are samples from this study, and according to the migration line identified as *H. parviporum*.



S4. attēls. Brūces izmēra optimal GLMM no sēnes izolāta un stumbra diametra atlikuma vērtību kvantiļu-kvantiļu grafiks
Figure S4. Wound size optimal GLMM by fungal isolate and stem diameter residuals QQ-plot



S5. attēls. Brūces izmēra optimālā GLMM no sēnes izolāta un stumbra diametra atlikuma vērtību histogramma.
Figure S5. Wound size optimal GLMM by fungal isolate and stem diameter residuals histogram.

```

Generalized linear mixed model fit by maximum likelihood (Laplace
Approximation) [glmerMod]
Family: Gamma ( log )
Formula: Size ~ Isolate.S.ref + DBH + (1 | Tree)
Data: combined

      AIC      BIC  logLik deviance df.resid
1530.3  1553.8  -758.1  1516.3    205

Scaled residuals:
      Min       1Q   Median       3Q      Max
-1.4451 -0.6110 -0.0603  0.4708  3.8885

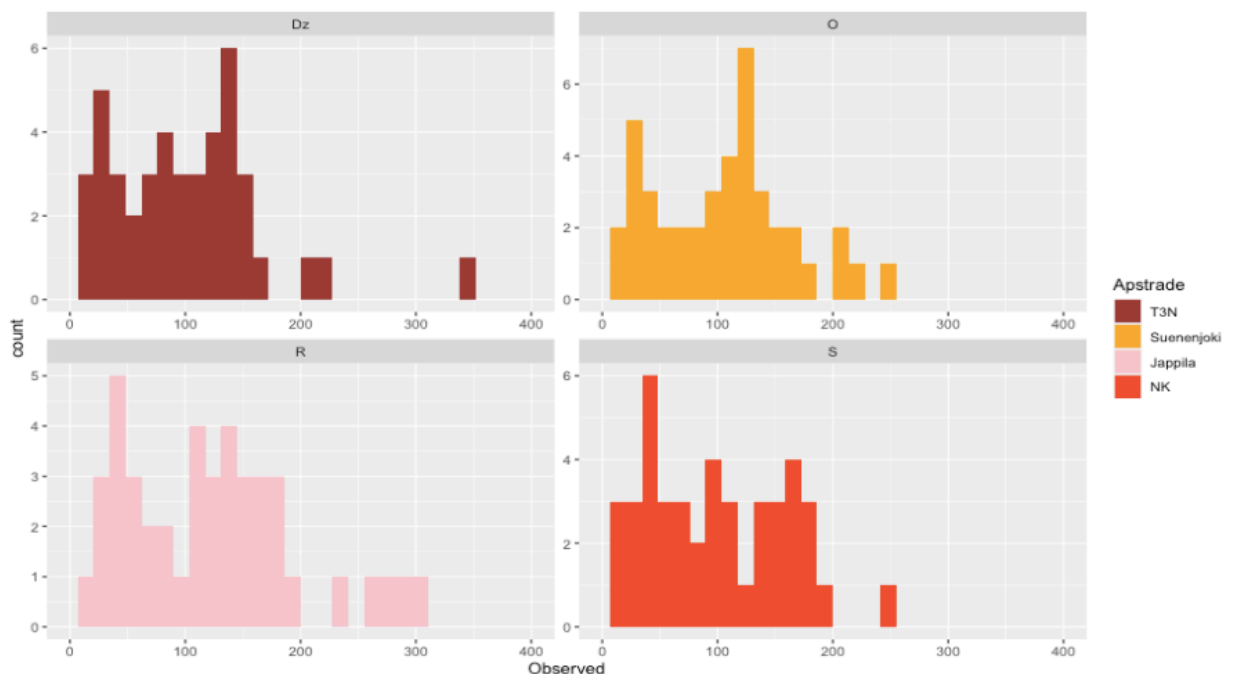
Random effects:
      Groups  Name          Variance Std.Dev.
      Tree   (Intercept)  0.1761  0.4197
      Residual              0.3994  0.6320
Number of obs: 212, groups: Tree, 53

Fixed effects:
              Estimate Std. Error t value Pr(>|z|)
(Intercept)    0.48312    0.41888   1.153  0.24876
Isolate.S.refDZ 1.36994    0.11961  11.454 < 2e-16 ***
Isolate.S.refR  1.16092    0.12107   9.589 < 2e-16 ***
Isolate.S.ref0  1.64447    0.11955  13.755 < 2e-16 ***
DBH             0.04280    0.01564   2.736  0.00621 **
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

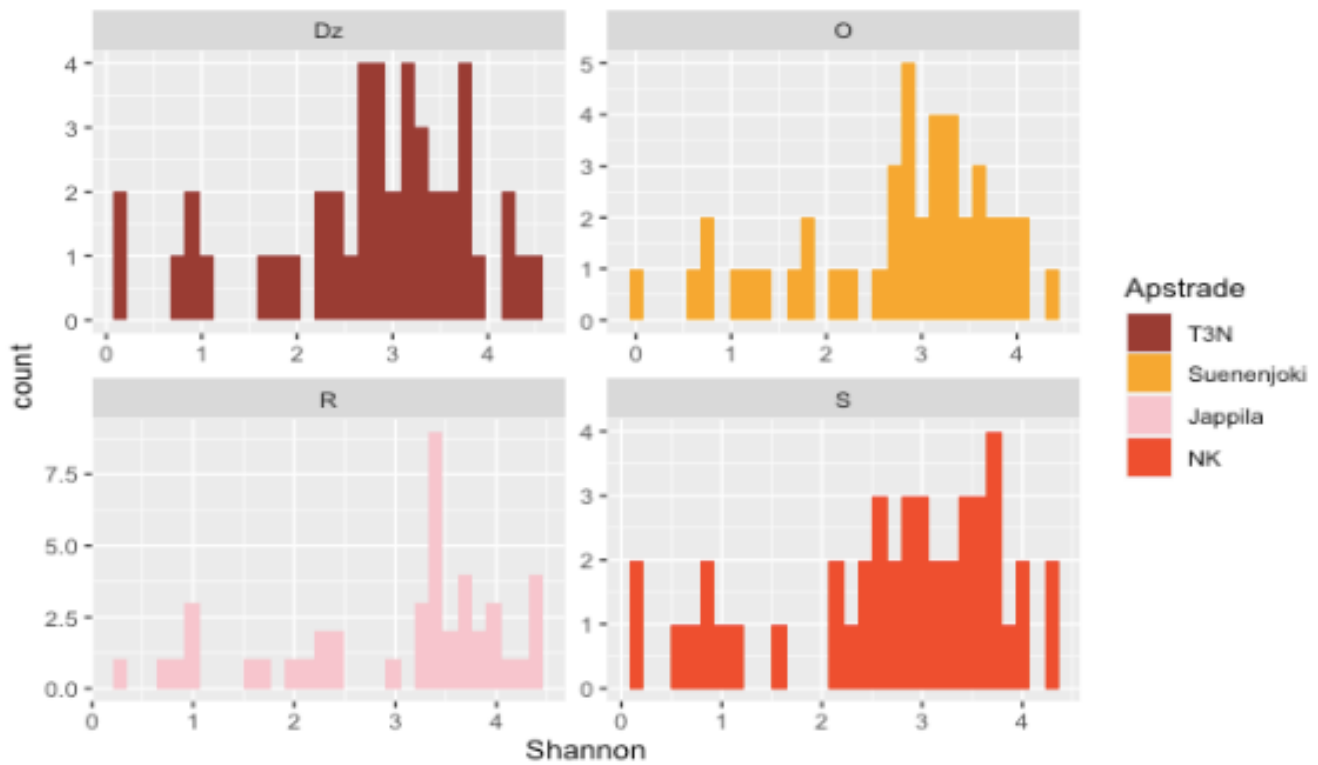
Correlation of Fixed Effects:
      (Intr) I.S.DZ Is.S.R Is.S.0
Islt.S.rfDZ -0.160
Isolt.S.rfR -0.157  0.538
Isolt.S.rf0 -0.173  0.530  0.527
DBH         -0.961  0.010  0.005  0.025

```

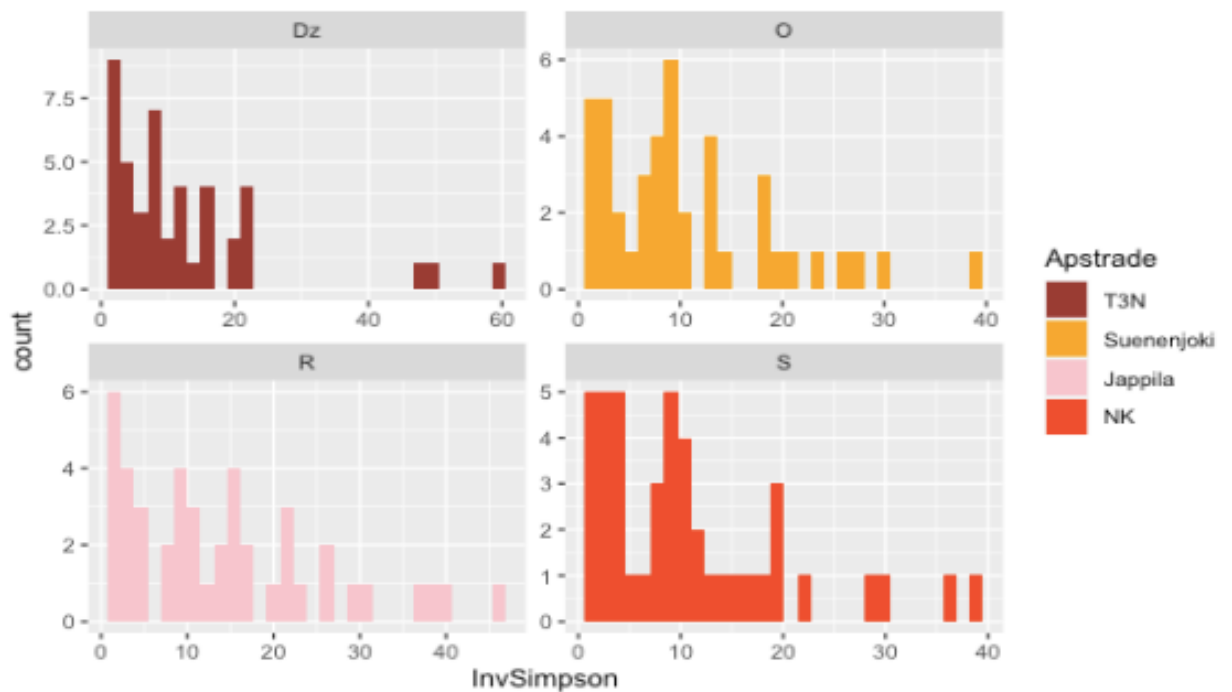
S6. attēls. Izveidotā optimālā GLMM modeļa outputs R programmā.
Figure S6. Output of the optimal GLMM model in R.



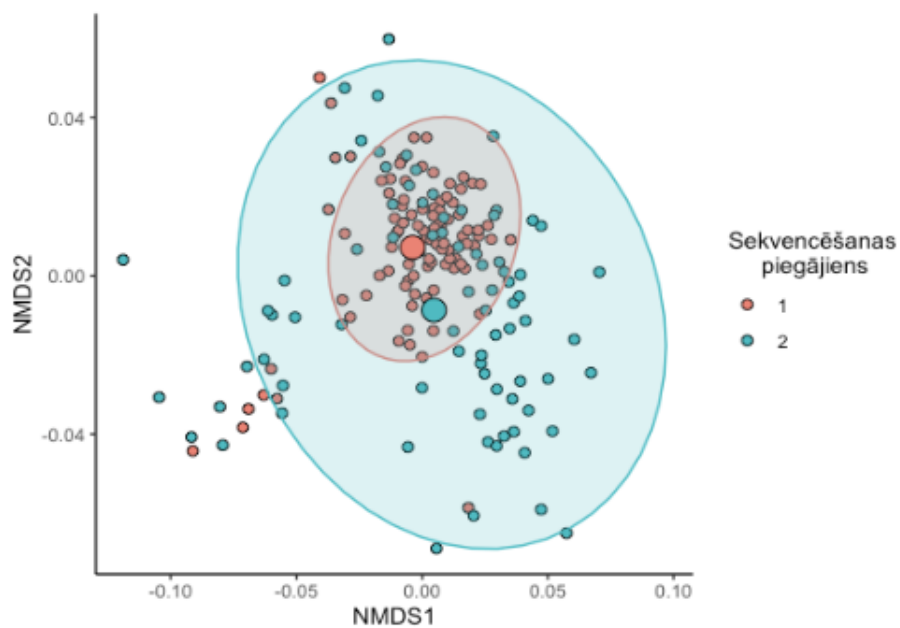
S7. attēls. Novērotās OTU daudzveidības katrā apstrādes grupā histogrammas
Figure S7. Histograms of observed OTU richness in treatment groups.



S8. attēls. Šēnona koeficientu pa apstrādes grupām histogrammas
Figure S8. Histograms of Shannon coefficients in treatment groups.

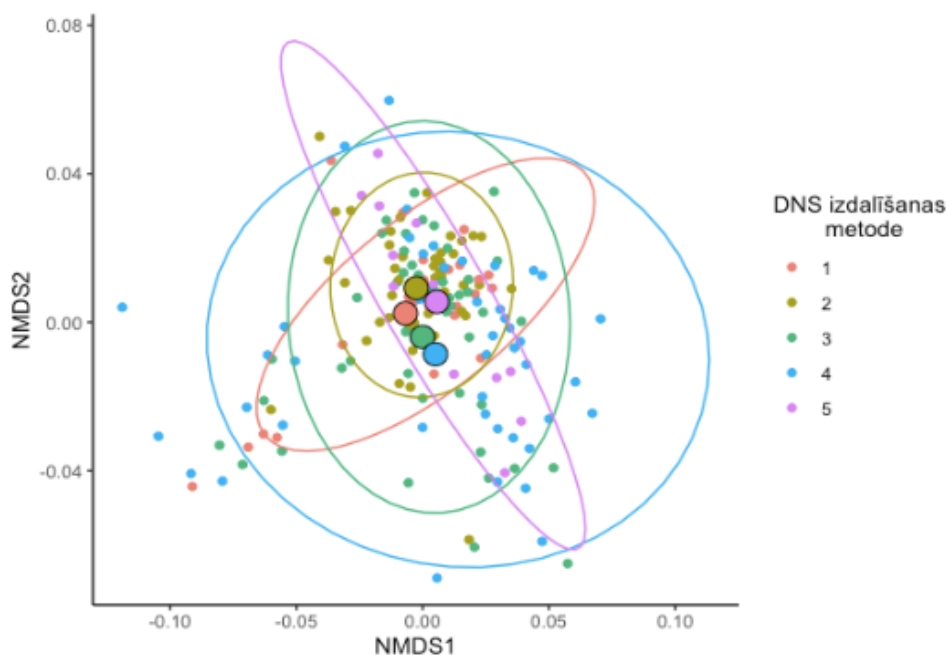


S9. attēls. Inversā Simpsona koeficientu pa apstrādes grupām histogrammas
Figure S9. Histograms of Inverse Simpson coefficients in treatment groups.



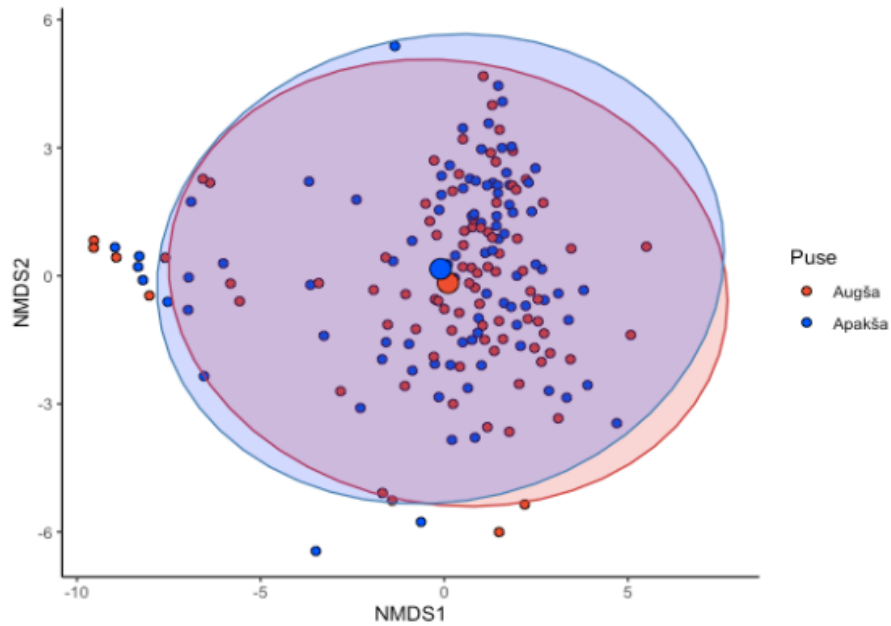
S10. attēls. NMDS ordinācijas grafiks visiem paraugiem, punkti iekrāsoti pēc sekvenčēšanas piegājiena; centroīdi atbilst piegājiena grupai

Figure S10. NMDS ordination plot for all samples, points coloured according to the sequencing run; centroids correspond to the respective run.



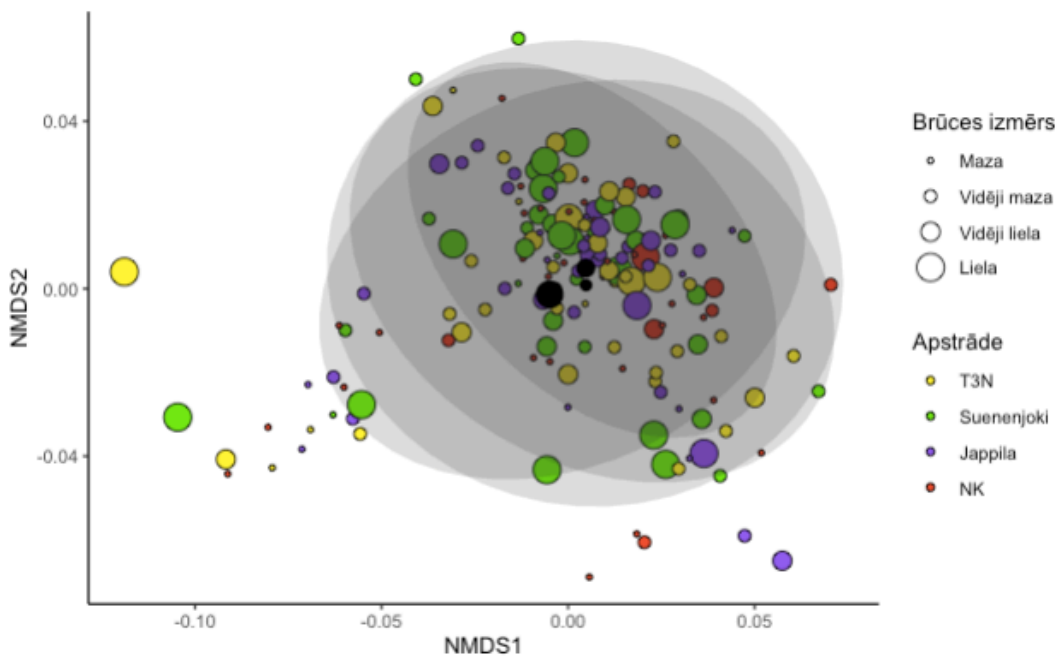
S11. attēls. NMDS ordinācijas grafiks visiem paraugiem, punkti iekrāsoti pēc DNS izdalīšanas metodes; centroīdi atbilst izdalīšanas metodei

Figure S11. NMDS ordination plot for all samples, points coloured according to the DNA isolation method; centroids correspond to the isolation method.



S12. attēls. NMDS ordinācijas grafiks visiem paraugiem, punkti iekrāsoti pēc parauga iegūšanas puses mizas brūcē; centroīdi atbilst attiecīgajai pusei.

Figure S12. NMDS ordination plot for all samples, points coloured according to the side of wound from where sample was obtained; centroids correspond to the respective side of wound.



S13. attēls. NMDS ordinācijas grafiks visiem paraugiem, punkti iekrāsoti pēc apstrādes grupām un punktu izmēri pēc mizas brūču izmēra; centroīdi atbilst to izmēra grupai.

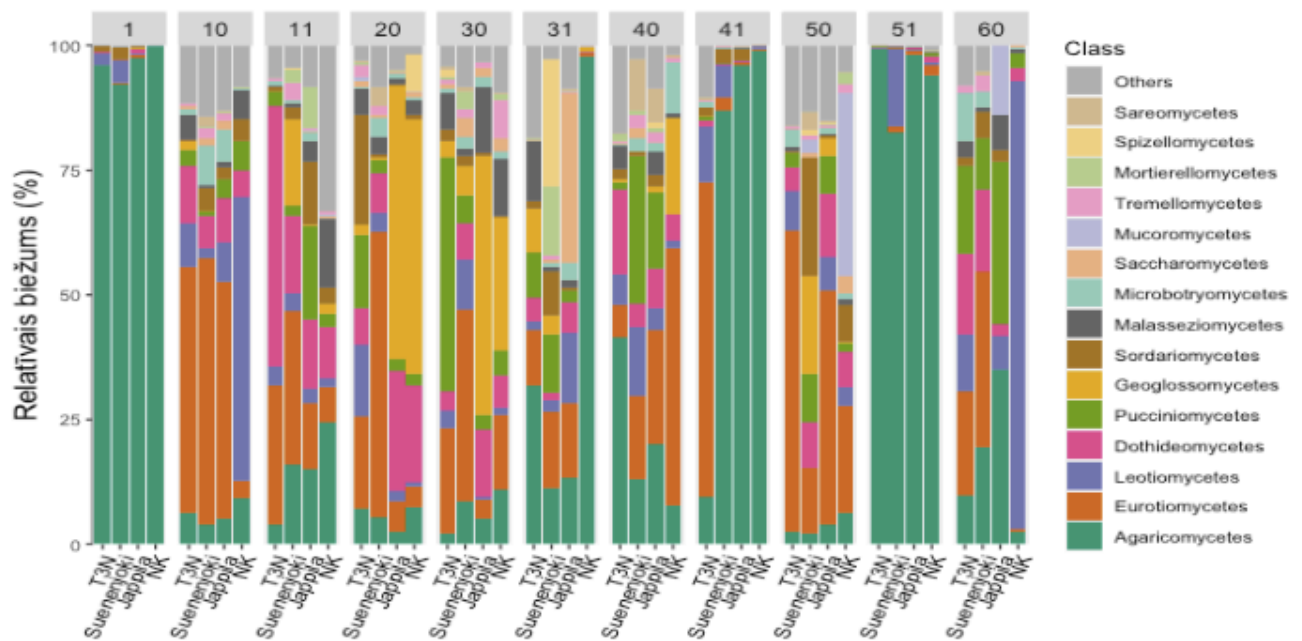
Figure S13. NMDS ordination plot, points coloured according to treatment groups and point size – according to stem wound size; centroids correspond to their size group.



S14 attēls. Ripa 37. kokam 17 cm virs inokulācijas vietas;
 O – Suenenjoki, R – Jappila, Dz – T3N, S – negatīvā kontrole.
Figure S14. Trunk disc of tree 24, 39 cm under the inoculation point;
 O – Suenenjoki, R – Jappila, Dz – T3N, S – negative control.

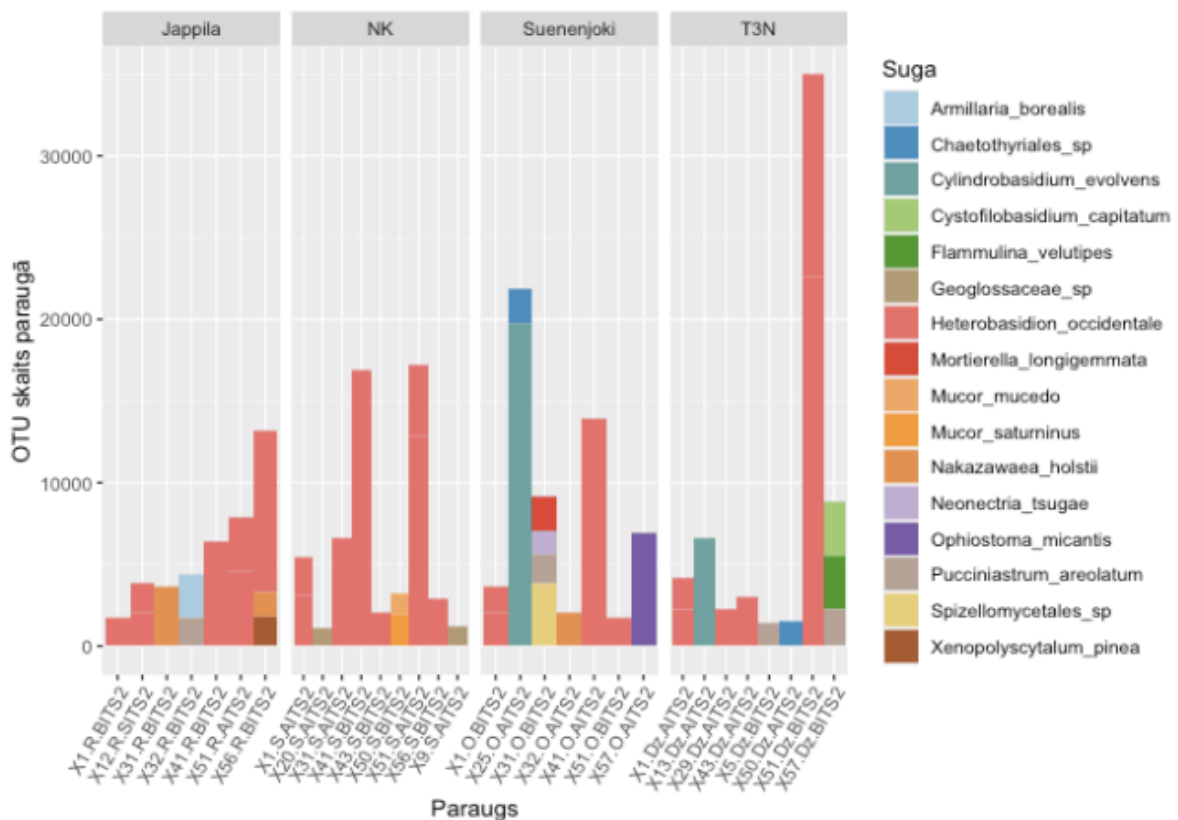


S15. attēls. Skenētā ripa 41. kokam 25 cm zem inokulācijas vietas;
 oranžs – Suenenjoki, rozā – Jappila, dzeltens – T3N, sarkans – negatīvā kontrole.
Figure S15. Scanned trunk disc of tree 41, 25 cm under the inoculation point;
 orange – Suenenjoki, pink – Jappila, yellow – T3N, red – negative control.



S16. attēls. 15 izplatītāko OTU taksonomisko klašu sastāvs atlasītos kokos.

Figure S16. 15 most abundant OTU taxonomic classes in selected trees.



S17. attēls. Stabiņu diagramma ar OTU pirms normalizācijas, kuriem atsevišķā paraugā ir lielākais skaits savā attiecīgajā apstrādes grupā.

Figure S17. Barplot with OTUs that have the highest abundance in single separate samples before normalization, in their respective treatment groups.

Maģistra darbs „*Corinectria fuckeliana* attīstība parastās egles *Picea abies* koksnē” izstrādāts LU Bioloģijas fakultātē un LVMI "Silava" Meža mikoloģijas laboratorijā.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un LUISā iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai un/vai e-studijās iesniegtai darba elektroniskai versijai.

Autors: Gustavs Daniels Loris *paraksts* 28.11.2023.

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītāja: Dr. biol. Dārta Kļaviņa *paraksts* *datums*

Recenzents: *paraksts*

Darbs iesniegts LU Bioloģijas fakultātē *datums*

Studiju metodiķe: *paraksts*

Darbs aizstāvēts Bioloģijas maģistra gala pārbaudījuma komisijas sēdē

prot. Nr. , vērtējums

Komisijas sekretārs/e: