



Pārskats par pētījuma
(Līgums Nr. L-KC-11-0004)

Metodes un tehnoloģijas meža kapitālvērtības palielināšanai

virziena

**Bērza koksnes iekrāsojuma izpēte molekulāri
ģenētiskā līmenī**

trešā etapa darba uzdevumu izpildi

Virziena vadītājs _____ Dainis Ruņģis

2014. gada janvāris

Bērza koksnes iekrāsojuma izpēte molekulāri ģenētiskā līmenī.

Bērzs ir izplatītākā lapu koku suga Latvijā, kas aizņem gandrīz 30% no kopējās mežu platības. Latvijā, strauji attīstoties saplākšņa ražošanai, pieauga arī pieprasījums pēc bērza koksnes. Tā kā saplākšņa kvalitāte ir tieši saistīta ar izejmateriāla - bērza koksnes, īpašībām - koksnes stiprību, iekrāsojumu, krāsu, kā arī bērza stumbra taisnumu un zarainību, tad, atlasot bērza klonus sēklu ieguves plantāciju izveidošanai ar ģenētiski determinētām augstvērtīgām koksnes īpašībām, būtu iespējams palielināt saplākšņa ražošanas pievienoto vērtību, kas ļautu ar saplākšņa kvalitāti sekmīgi konkurēt ārējā tirgū. Lielu pievienoto vērtību saplākšņim piešķir tā krāsa. Jo tā ir gaišāka, jo lielāks saplākšņa pielietojums mēbeļu ražošanā. Saplākšņa ražošanā bērza koksnes iekrāsojums pazemina saplākšņa pievienoto vērtību.

Citām lapu koku sugām, piemēram, dižskābardim, noskaidrots, ka koksnes iekrāsojumu varētu izraisīt dažādas sēņu sugas. Tomēr, šī problēma nav pētīta ar modernākām molekulāri ģenētiskajām metodēm, arī Latvijas bērzu audzēs koksnes iekrāsojuma sastopamība un molekulārā analīze nav veikta, nav arī noskaidroti koksnes iekrāsojuma iespējamie ģenētiskie faktori.

Projekta īstenošanas komandā tika iesaistīti dažādu zinātņu pārstāvji - meža selekcionāri, molekulārās ģenētikas, augu fitopatoloģijas speciālisti, kuru zināšanas un prasmes ir starptautiski atzītas – laba citējamība datu bāzēs. Projekta īstenošanā piedalījās arī SIA Latvijas Finieris „Mežs” pārstāvis.

Projekta izpildei ievākti koksnes paraugi no iekrāsotas un neiekrāsotas bērza koksnes. Pārsvārā, paraugi ievākti no pieaugušiem bērza kokiem ciršanas laikā, sadarbībā ar „Latvijas Finieris” pārstāvi. Paraugi ievākti dažādos Latvijas reģionos, pārsvārā Kurzemē un Latgalē. Sadarbībā ar LVMI „Silava” selekcionāru A. Gaili apsekoti arī 14 gadus veci bērzu koki ģimeņu stādījumā Rembatē. Bērzu stādu ekperimentālai pārbaudei izmantota sēklu partija no zemplēves bērzu plantācijas Kalsnavā. Augošu koku mākslīgai inficēšanai ar sēņu tīrkulturām izmantoti bērzi no privātā īpašuma „Kārlēni” Ikšķiles novadā, pie Tinūžiem. Kopumā ievākti un analizēti aptuveni 1250 bērza koksnes paraugi, ieskaitot pieaugušus kokus, jaunus kokus, kā arī bērzu stādus no stādaudzētavas.

1. tabula

Paraugu ievākšanas vietas.

Vieta	Koordinātes	Koku vecums
Liepājas novads, Mazgramzda	56,618672 21,606766	~20-50 gadi
Rēzeknes novads, Bikava	56,620219 27,613792 56,440007 27,442474 56,784755 27,232189 56,806517 27,060626	~10-30 gadi
Ikšķiles novads, Tinūži	56,878985 24,590315	~10 gadi
Ķeguma novads, Rembate	56,769754 24,799232	~10 gadi

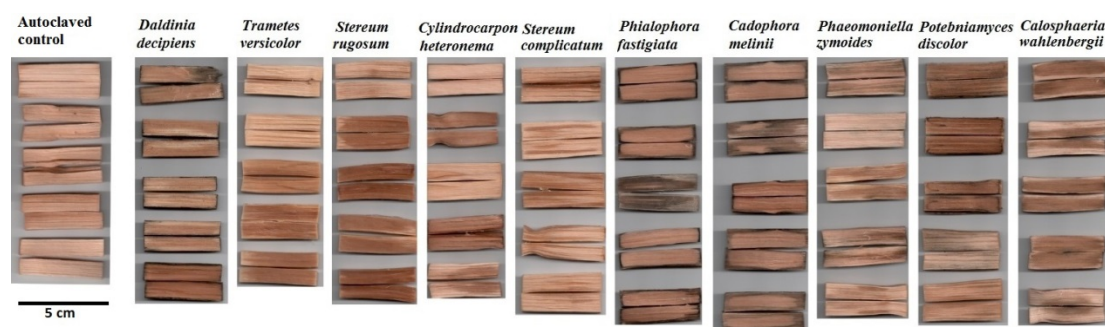
Sēņu identificēšana iekrāsotā bērza koksnē, izmantojot mikrobioloģiskās metodes

Viens no pirmajiem darba posmiem bija mikroorganismu izdalīšana no iekrāsotās bērza koksnē un to identificēšana, izmantojot mikrobioloģiskās metodes. No 63 bojātiem un 5 nebojātiem kokiem ar Preslera urbi ievāca paraugus, no kuriem tālāk apstrādāja tikai daļu – 10 sterilizēja un novietoja uz agarizētas iesala ekstrakta barotnes un no 24 bērza koksnē paraugiem izdalīja kopējo DNS. Paraugus līdz apstrādāšanai uzglabāja 4°C temperatūrā. Paraugi sēņu identificēšanai sastāvēja no diviem atkārtojumiem – viens DNS izdalīšanai, otrs micēlija kultivēšanai.

Kopumā no dažādiem bērza koksnē paraugiem (no Liepājas un Rēzeknes rajoniem) tika izdalītas 18 sēņu kultūras un 46 baktēriju kultūras. Ļoti iespējams, ka daļa no šīm kultūrām ir viena un tā pati vai tuvradniecīga suga. To noskaidrojot, būtu iespējams novērtēt kādas noteiktas sugas vai sugu sabiedrības saistību ar koksnē iekrāsošanos. Tīrkultūras mikroskopējot tika konstatētas šādas sēņu ģintis: *Mucorales*, *Alternaria*, *Cladosporium* (vairākos paraugos). Baktēriju identifikācijai tika izmantoti BBL Crystal komplekti. Rezultātā identificēja šādas sugas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pantoea agglomerans*, *Bacillus brevis*, *Kulyvera cryocrescens*, *Yokenella regensburgei*, *Burkholderia cepacia* (x3), *Klebsiella pneumoniae* spp *ozanae*, *Enterobacter cloacae*, *Kulyvera ascorbata*, *Leifsonia aquatica*. Rezultātu ticamība variē no 79% līdz 99%.

Bērza koksnē klucīšu inokulēšana ar mikroorganismu tīrkultūrām

Balstoties uz iegūtajiem rezultātiem un literatūras analīzi, kā arī no iekrāsotās bērza koksnē izdalītās sēņu tīrkultūras, bērza koksnē klucīšu inokulācijai izmantoja no mikroorganismu kolekcijas *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS, Utrehta, Nīderlande) pasūtītas 10 sēņu tīrkultūras. Sterilus bērza koksnē klucīšus novietoja Petri platē uz 1% ūdens-agara slāņa. No katras izdalītās sēņu tīrkultūras, kā arī no 10 pasūtīto sēņu tīrkultūrām izgriezta divus nelielus agara gabalus (4×4×4 mm), no kuriem vienu novietoja uz klucīša, bet otru – sānā uz agara. Pēc 8 nedēļu ilgas sēņu audzēšanas ieguva vizuālu pārskatu par šo sugu ietekmi uz bērza koka klucīšiem pāršķeļot klucīšus un ripas gareniski uz pusēm un novērtējot iekrāsojumu (1. attēls, 2. tabula).



1. attēls. Bērza klucīšu iekrāsojums pēc inokulēšanas ar sēņu tīrkultūrām.

2. tabula.

Bērza koksnes iekrāsojums un micēlija izplatība pēc inokulēšanas ar sēņu tīrkultūrām.

Suga	Iekrāsojums						Micēlijs (ballēs no 1 līdz 5)						Micēlijs (cm no urbuma malas)		
	Apdedzinātiem k.			Autoklāvētiem k.			Apdedz. k.		Autokl. k.				Autokl. ripām		
<i>1078. Daldinia decipiens</i>	-	-		? ? ?	-	+	2	2	3	3	3	2	2	1	0.8
<i>1079. Trametes versicolor</i>	-	-		-	-	-	2	1	3	2	1	3	3	2.5	2.5
<i>1080. Stereum rugosum</i>	-	-		+	+	+	1	1	3	4	3	3	2	0.9	1
<i>1081. Cyllindrocarpon heteronema</i>	-	-		-	-	-	1	1	-	-	1	2	2	1.5	1.5
<i>1082. Stereum complicatum</i>	-	-		+	-	-	1	-	4	4	4	3	3	1.5	1.5
<i>1083. Phialophora fastigiata</i>	-	-		+	+	+	-	-	1	2	1	1	1	0.5	0.4
<i>1084. Cadophora melinii</i>	-	-		+	+	+	-	-	2	1	1	1	1	0.5	0.8
<i>1085. Phaeoconiella zymoides</i>	-	-		-	+	-	-	-	1	1	1	1	1	0.1	0.1
<i>1086. Potebniomyces discolor</i>	-	-		-	-	-	1	-	1	1	1	1	1	0.3	0.4
<i>1087. Calosphaeria wahlenbergii</i>	-	-		-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	0.1	-

? – koksne ir palikusi sārtāka, kā bērza celms 2 nedēļas pēc nozāģēšanas.

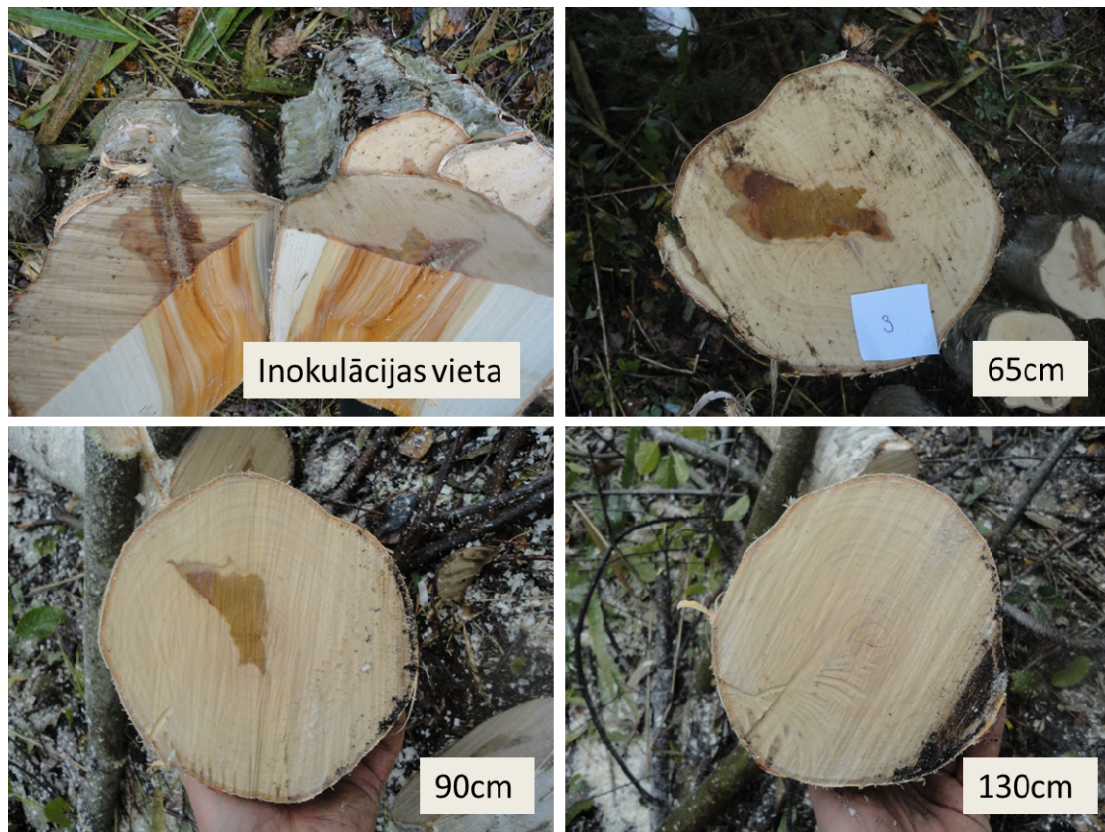
* - grūti spriest, vai iekrāsojums ir virspusējs, sīku sporu radīts, vai tomēr dziļāks, jo vērtēšanas laikā Petri plates neatvēra

Augošu bērza koku inokulēšana ar iekrāsojošo sēņu sporām jeb micēliju un iekrāsojuma veidošanās novērtējums

Ar sēņu un baktēriju tīrkultūrām, kuras ieguva no iekrāsotās un neiekrāsotās koksnes daļas, inficēja sterilus bērza klucīšus, katru ar vienu tīrkultūru. Lai arī dažos paraugos novēroja brūngana iekrāsojuma parādīšanos, vairumā gadījumu konstatēja pelēcīgu iekrāsojumu, kas nav novērots lauka apstākļos. Šis eksperiments liecina, ka eksperimentiem ar tīrkultūrām ir nepieciešami augoši bērzi, jo iekrāsojuma rašanās ir saistāma ar nepārtrauktu bērza un mikroorganismu mijiedarbību. 2012. gada aprīlī bērzus lauka apstākļos inokulēja ar 10 sēņu tīrkultūrām trijos atkārtojumos (tīrkultūras katru atsevišķi ievietoja ar Preslera urbi veiktos urbumos ik pēc 20 cm sākot no koka pamatnes 30 cm augstumā). Bērzus nozāgēja pēc 6 mēnešiem. Sākotnējie rezultāti liecina par tipiska sarkanbrūna iekrāsojuma rašanos no jebkura liela ievainojuma, kurš ir pakļauts iespējamai mikroorganismu invāzijai, jo ne tikai visi ar sēņu tīrkultūrām inficētie urbumi, bet arī negatīvās kontroles (n=3) iniciēja iekrāsojuma veidošanos (2. attēls). Iekrāsojums, sākoties pie apakšējā urbuma, turpinājās tikai uz augšu un summējās ar katru nākamā urbuma iekrāsojumu. Noskaidrots, ka 6 mēnešu laikā, koknes iekrāsojums var izplatīties vairāk kā 90 cm no inokulēšanas vietas (3. attēls). Iespējams, ka iekrāsojumu izraisa koksnes audu enzimatiskas aizsargreakcijas, ko ierosina mikroorganismu un/vai liels skābekļa daudzums bojātos audos.



2. attēls. Koksnes iekrāsojums pēc dzīva koka inokulēšanas ar sēņu tīrkultūrām.



3. attēls. Koksnes iekrāsojuma izplatība 6 mēnešus pēc sēņu tīrkultūras inokulācijas dzīvā bērza kokā.

Iekrāsojuma izplatība visa bērza stumbra garumā

Dažādos pētījumos ir secināts, ka ārējie faktori var liecināt par iekrāsotu kodolkoksni. Sarkanbrūna, nehomogēna iekrāsojuma izplatība augošā papīra bērzā (*Betula papyrifera* Marsh.) ir saistāma ar koka ārējiem defektiem un īpatnībām, piemēram, zaru žāklēm vai rētām, kas atrodas tuvāk stumbra pamatnei (Belleville *et al.*, 2011). Hallaksela un Niemisto (1998) secināja, ka galvenais iemesls plantācijās augošu āra bērza (*Betula pendula* Roth.) kodolkoksnes iekrāsojumam bija nolauztie zari un sekojoša mikroorganismu invāzija. Tādējādi varētu secināt, ka iekrāsojumu, visticamāk, ir iniciējis kāds ievainojums un ar to saistītie faktori. Tomēr iekrāsojuma iespējamība tiek saistīta arī ar dažādiem vides faktoriem un koka īpatnībām, piemēram, kokiem, kuri attiecīgajā audzē atrodas dominējošajā stāvā, iekrāsoto daļu apjomi ir mazāki. Lielāks iekrāsotās kodolkoksnes daudzums novērots kokiem, kuri ir vecāki par 40 gadiem ar relatīvi lielu diametru krūšu augstumā un apjomīgu lapotni (Belleville *et al.*, 2011).

Dažām sugām kodolkoksne ar tai raksturīgo tumšo iekrāsojumu veidojas koksnes šūnām novecojot un izmainoties to ķīmiskajam sastāvam. Tomēr papīra bērza iekrāsojumu nevarētu uzskatīt par īstu kodolkoksni, jo tā satur barības vielas (ogļhidrātus, piemēram, cieti), kas ir raksturīgas dzīviem, augošiem koksnes audiem (Piispanen, Saranpää, 2001). Lai gan šādu iekrāsojumu saista arī ar trapes sākuma stadiju, tas parasti būtiski neietekmē koksnes mehāniskās īpašības.

Lai novērtētu iekrāsojuma izplatību visa stumbra garumā, nozāģēja trīs 12 gadus vecus āra bērzus. Bērzu aptuvenais augstums bija 17 m, diametrs krūšu augstumā – 15 cm. Iekrāsojums vispirms tika noteikts, izdarot urbumu pie koka pamatnes ar Preslera

urbi. Pēc koka nozāgēšanas stumbru sadalīja 1-2 m garos gabalos, lai sākotnēji novērtētu iekrāsojuma sākumu un beigas. Pēc tam attiecīgos stumbra fragmentus ar iekrāsojumu pārzāģēja gareniski. Zāģēšanai izmantoja benzīna motorzāģi ar apm. 5 mm platu zāģa ķēdi.

Izvēlētajiem kokiem iekrāsojums stumbra vidū bija konstatējams jau pie pamatnes, no kurienes tas turpinājās aptuveni 4-5 m augšup. Iekrāsojuma samazināšanās virzienā uz augšu nebija vienmērīga – vietām tas kļuva plašāks, vietām manāmi samazinājās (4. attēls) līdz pakāpeniski izzuda pavisam vai krasi beidzās kādā zara vietā (5. attēls). Rētu, dzīvu un nolauztu (t.i., ieaugušu) zara vietu saistība ar vienmērīgi izplatītu iekrāsojumu bērza stumbra vidū konstatēta lielākajā daļā gadījumu (5. - 8. attēli). Iekrāsojums no zara vietas lokāli nedaudz palielināja iekrāsojuma diametru vidusdaļā. Daļa zara vietu, gan dzīvu, gan ieaugušu, radīja lokālu iekrāsojumu, kas neturpinājās stumbra vidū (9. - 15. attēli).



4. attēls.



5. attēls.



6. attēls.



7. attēls.



8. attēls.



9. attēls.



10. attēls.



11. attēls.



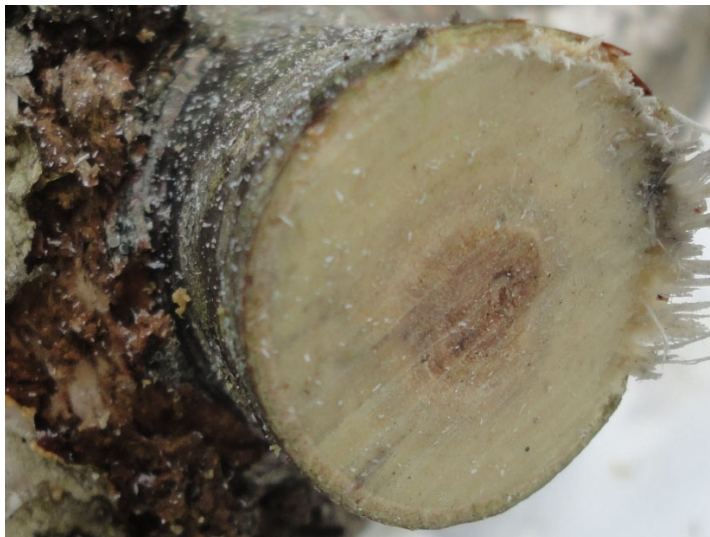
12. attēls.



13. attēls.



14. attēls.



15. attēls.

Vienam no trim bērziem praktiski visi zari pie pamatnes bija ar iekrāsoju vidusdaļu (15. attēls), tomēr vairumā gadījumu iekrāsojums neturpinājās dziļāk stumbrā. Šādi zari lielākoties bija sastopami bērza augšdaļā. Nokaltušu un nolauztu zara vietu, kā arī ieaugušu rētu radītais iekrāsojums dažviet bija lokāls, bet citur – turpināja izplatīties stumbrā (8. attēls) vai bija šķietams iekrāsojuma nobeigums (5. attēls). Šādi rētaudi, kas vietām, iespējams, satur trupējušus koksnes audus, varētu būt viegls ceļš, kā mikroorganismiem iekļūt kokā. Līdz ar mikroorganismiem kokā, iespējams, iekļūst arī papildus skābeklis, kas var veicināt oksidēšanās reakcijas. Tomēr nav skaidri zināmi iemesli, kādēļ viena zara vieta rada nelielu, lokālu iekrāsojumu, bet cita – saplūst ar iekrāsojumu stumbra vidū. Veseli zari, kas ir iekrāsoti pie pamatnes, ir novēroti arī iepriekš. Šo parādību ir grūti izskaidrot, ņemot vērā faktu, ka vizuāli nekas neliecina par būtiskiem bojājumiem. Iespējams, ka tas liecina par trupes sākuma stadiju. Vairākos pētījumos konstatēta specifisku sēņu klātbūtne bērza zaros, kas, iespējams, veicina bērza atzarošanos (Hanso, Drenkhan,

2010). Iespējams, atsevišķos gadījumos, kas varētu būt saistīti ar noteiktām koksnes īpašībām, infekcija no zariem pāriet dziļākos koksnes audos.

Vairāki pētījumi mudina domāt, ka segsēkļu nodalījumā visas koku sugas funkcionālajā aplievas koksne vairāk vai mazāk satur trupi izraisošas sēnes latentā stāvoklī, tomēr ne vienmēr tās ir tās pašas, kas pēc tam ir sastopamas trupē. To izplatība viscaur stumbram un zariem var būt vienmērīga. Aktīvus trapes procesus, visticamāk, ierosina nelabvēlīgi vides apstākļi, piemēram, pārmērīgs mitrums (Parfitt *et al.*, 2010).

Jāatzīmē, ka izmantotie bērzi bija salīdzinoši jauni. Lai gan nedaudzajos pieejamajos rakstos stumbra vidusdaļas iekrāsojums ir saistāms ar aptuveni 40 gadus veciem bērziem, iepriekšējos novērojumos iekrāsojums tika konstatēts arī 8 gadus veciem bērziem (Bitenieks, 2012 (bakalaura darbs), Parfitt *et al.*, 2010). Jauno bērzu izpēte var liecināt par iekrāsojuma iniciācijas vietām.

Iekrāsojuma izplatības izpēti vajadzētu veikt ar lielāku atkārtojumu skaitu; īpaši svarīgi pētīt vecākus bērzus, jo iekrāsojuma struktūra tiem ir izteiktāka nekā jaunajiem kokiem. Lielāku un vecāku bērzu izpēte ir problemātiska, jo pēc stumbra gareniskas pārzāgēšanas, ievērojams daudzums koksnes vairs nav lietojams finiera iegūšanai. Alternatīva varētu būt finierkluča lobīšanas procesa novērošana, tomēr tas ir mehanizēts un ātrs process. Tā laikā iekrāsojuma izplatība samērā īsajos finierklučos ir grūti novērojama, taču zara vietu saistība ar stumbra vidusdaļas iekrāsojumu ir redzama.

Iekrāsotā koksne atrasto baktēriju lomas noskaidrošana iekrāsojuma veidošanā

Atsevišķos eksperimentos ar dažādu bērza koku koksnes ekstraktu ietekme uz atsevišķām tīrkultūrām netika novērota. Kultivējot tīrkultūras sterilā bērza sulā, kuru ieguva pavasarī, tikai trijos gadījumos (n=36) novēroja niecīgas, baktēriju tīrkultūru radītas brūnas nogulsnes, kas varētu liecināt par šo tīrkultūru spēju izmantot organiskās vielas bērza sulā, radot galaproduktus brūnā krāsā. Iespējamie blakus pētījumi varētu būt saistīti ar paaugstinātu fenolu klātbūtni iekrāsotā koksne, kas daudzos gadījumos ir saistāma ar koka aizsargmehānismiem pret patogēniem, kā rezultātā var rasties koksnes īpašību izmaiņas, t.sk., krāsas izmaiņas.

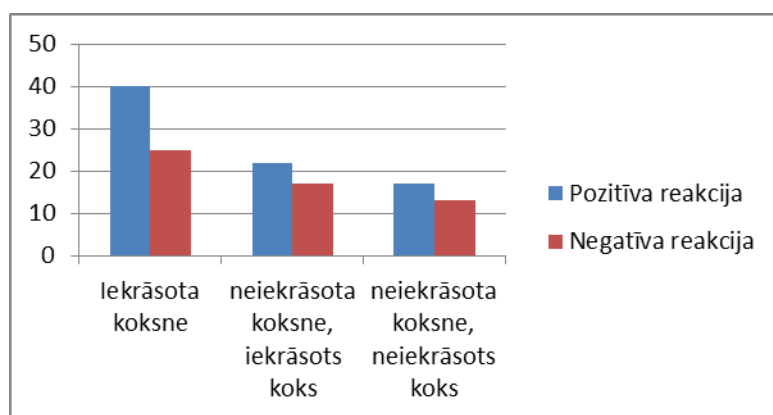
Koksnes kopējās un tīrkultūru DNS izdalīšana

Kopējo DNS no koksnes izdalīja pēc CTAB metodes protokola (ar modifikācijām no Asif, Cannon 2005, Johannesson, Stenlid 1999).

Sēņu sugu specifisku praimeru izstrāde, izmantojot polimorfus sēņu ribosomālo gēnu apgabalu

Ievākti 117 bērza paraugi no nesen cirstiem bērzu baļķiem un celmiem, dažādos Latvijas reģionos. Katrā audzē ievāca paraugus gan no kokiem bez iekrāsojuma, gan no kokiem ar iekrāsojumu un izdalīja DNS. Sākotnēji sēnes identifikācijai tika izvēlēta DNS sekvenēšanas metode. Atlasīti ribosomālie DNS marķieri, ar kuriem būtu iespējams analizēt visas paraugos esošās sēņu sugas. Ar šiem marķieriem PQR reakcijās iegūti DNS fragmenti. Iegūtās DNS sekvences salīdzinātas ar NCBI datubāzi, lai noskaidrotu sēņu sugu, kā arī savstarpēji, lai varētu noskaidrot dažādo sēņu sadalījumu iekrāsotā un neiekrāsotā koksne.

No iekrāsotās koksnes izdalīja sēņu tīrkultūras, no kurām izdalīja DNS. Iegūto DNS sekvenēja ar ITS1 un ITS4 praimeriem un ieguva ITS1 un ITS4 nekodējošā rajona sekvences, kā arī 5S kodējošo sekvenci. Izmantojot iegūtās ITS sekvences tika konstruēti specifiski praimeru. Iegūto praimeru specifiskums tika pārbaudīts uz dažādu sēņu tīrkultūrām dažādos reakcijas apstākļos. No izstrādātajiem praimeriem, pēc optimizācijas, par derīgu tika atzīti tikai *Cladosporium* ģintij specifiskie praimeru. Ar šiem praimeriem tika pārbaudīti 65 paraugi no iekrāsotas un 69 paraugi no neiekrāsotas koksnes (gan no iekrāsota koka neiekrāsotās daļas, gan no neiekrāsota koka). Izteikta atšķirība starp iekrāsotu un neiekrāsotu koksni nav konstatēta. Turklāt datu analizēšanu apgrūtina tas, ka *Cladosporium* ģints ir plaša, ar daudz sugām, tāpēc ar šiem praimeriem nevar noteikt, vai paraugos ir viena suga vai vairākas. Ar diviem izstrādātajiem sēņu sugu specifiskajiem PĶR praimeriem tika analizēti 121 bērzu koksnes paraugi, kuri tika ievākti no iekrāsotas un neiekrāsotas koksnes. Papildus tika analizēti 17 paraugi, kuri tika ievākti no bērzu kokaudzētavas 'Zābaki'. Ar praimeru pāri '2.ssp' 41 paraugs no iekrāsotas koksnes arī uzrādīja pozitīvu rezultātu PĶR analizē. 12 neiekrāsoti koksnes paraugi uzrādīja negatīvu rezultātu PĶR analizē. Kopumā 68 paraugi bija tādi, kur nesakrita iekrāsojums ar PĶR analīzi. No tiem, 11 neiekrāsotie paraugi uzrādīja pozitīvu PĶR analīzi, un 57 iekrāsotie koksnes paraugi uzrādīja negatīvu PĶR analīzi (16. attēls).

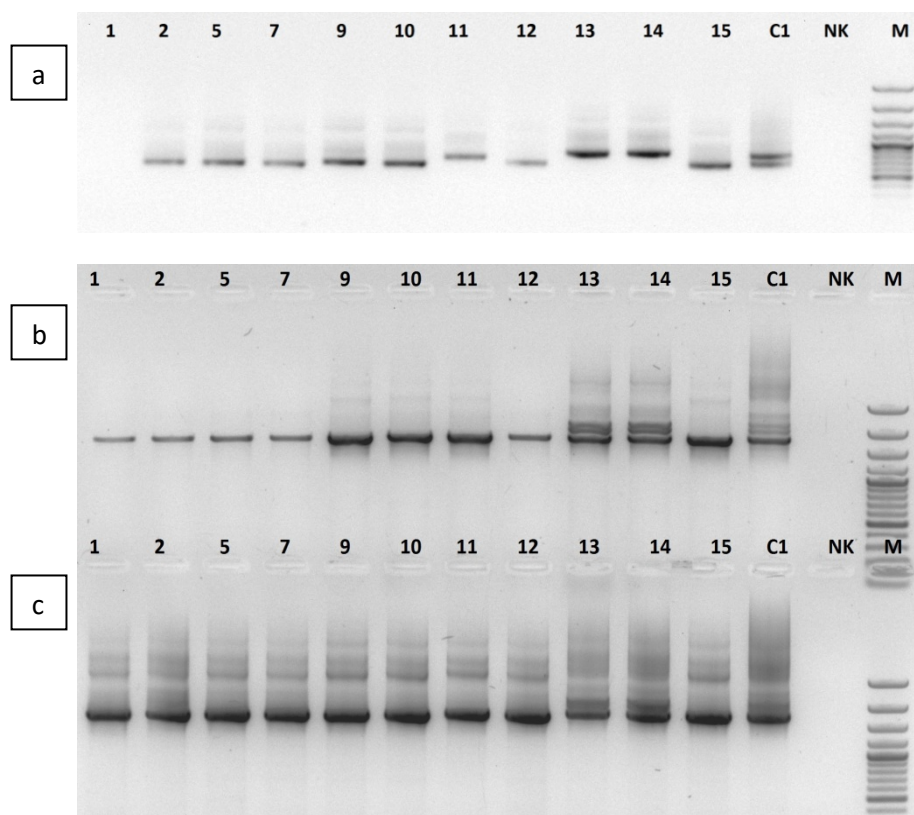


16. attēls. Iekrāsotas un neiekrāsotas koksnes analīze ar sēņu sugu specifisku marķieri

Iepriekšminētās metodes ir piemērotas sugu konstatēšanai, tomēr tās nav statistiski būtiskas un nepierāda identificēto sugu lomu iekrāsošanās procesos, tāpēc, analizējot mikroorganismu sabiedrību pētījumus, nolēma izstrādāt citu uz molekulārajām metodēm balstītu pieeju, kas dotu iespēju vienlaicīgi apskatīt lielāko daļu baktēriju vai mikroskopisko sēņu sabiedrības iekrāsotā bērza koksne un salīdzināt tās savā starpā, kā arī ar neiekrāsotu koksnes mikroorganismu sabiedrībām. Tādēļ tika konstruēti divi praimeru komplekti baktēriju sabiedrību pētījumiem un divi – mikroskopisko sēņu sabiedrību pētījumiem. Tika noteikta mikroorganismu taksonomiskā piederība pēc PĶR-DGGE rezultātiem, lai iegūtu sugu specifiskus praimerus precīziem un ātriem patogēna pētījumiem bērza koksne.

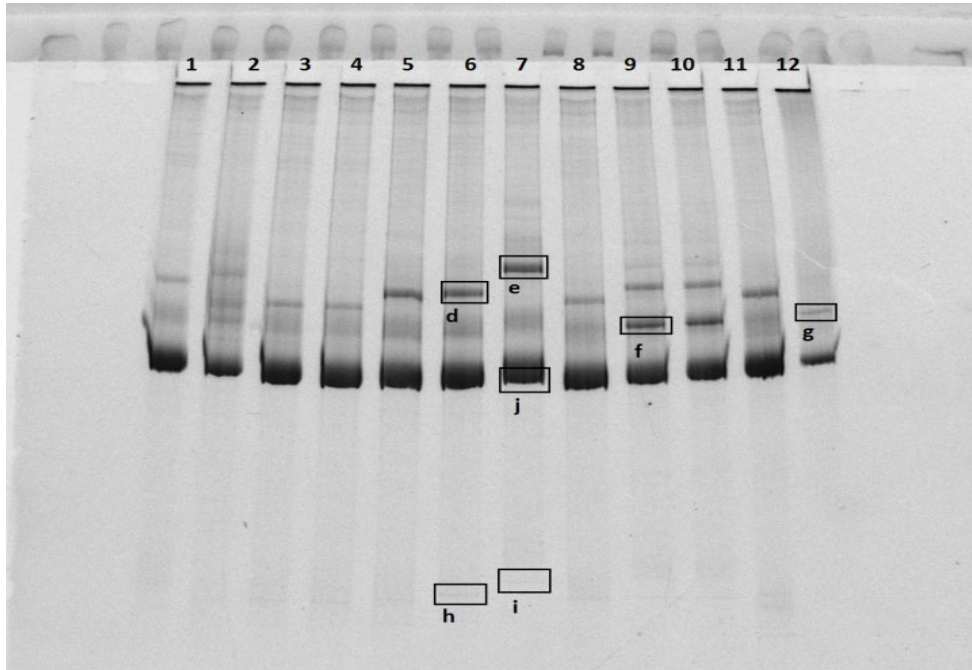
Polimerāzes ķēdes reakcijas pielietoja, lai pavairotu 18S, 5.8S un 28S gēnu fragmentus. Balstoties uz literatūrā minētām praimeru sekvencēm, izveidoja divus praimeru komplektus baktēriju un sēņu DNS profilēšanai un identificēšanai koksne. Pirmais praimeru komplekts amplificē lielāko daļu no 18S gēna sēnēm (pilns ~1800 bp) ar trim secīgām PĶR – pirmajā PĶR (NS1_F un EF3_R) reģionu V1-V9 (1711 bp), otrajā PĶR (NS1_F un FR1-GC_R) reģionu V1-V5 (1648 bp), izmantojot pirmā

PĶR produkta DNS. Otrais praimeru komplekts (ITSF-GC_F un ITS4_R) amplificēja (secīgi) daļu 18S rDNS, visu 5.8S rDNS un daļu no 28S rDNS gēna rajona sēnēm (kopā ~ 350-880 bp) (17. attēls).



17. attēls. Sēņu tīrkultūru DNS amplifikācijas ar praimeru pāriem (a) ITSF-GC_F un ITS4_R, (b) NS1_F un EF3_R, (c) NS1_F un FR1-GC_R. 'c' rindā esošie paraugi ir *nested*-PĶR produkti no 'b' rindā esošajiem PĶR produktiem.

Tālāk PĶR produktus sadalīja denaturējošā gradienta gēla elektroforēzē, tādējādi veicot dažādu kopējo DNS paraugu profilēšanu un salīdzināšanu savā starpā (18. attēls).



18. attēls. NS1_F un FR1-GC_R PĶR produktu DGGE profili.

Bērza koksnes iekrāsojuma izplatība un dinamika Latvijas bērzu audzēs

Noteikta bērza koksnes iekrāsojuma izplatība un dinamika Latvijas pieaugušās bērzu audzēs ciršanas laikā, kā arī jaunākās audzēs kopšanas cirtes laikā. Noskaidrots, ka bērzu koksnes iekrāsojums ir izplatīts pa visu Latvijas teritoriju, un tas sastopams jau desmit gadus vecos kokos. No iekrāsotās bērzu koksnes izdalītās endofītās sēnes un baktērijas un noteiktas to identitātes, izmantojot ribosomālās DNS sekvenēšanas metodikas.

Cirsmu apsekošana dažādos meža augsnes tipos Latvijas reģionos iekrāsojuma pakāpes noteikšanai

Laika periodā no 2011. gada septembra līdz 2012. gada augustam bērza koksnes paraugi (kopumā aptuveni 320) tika ievākti šādās vietās:

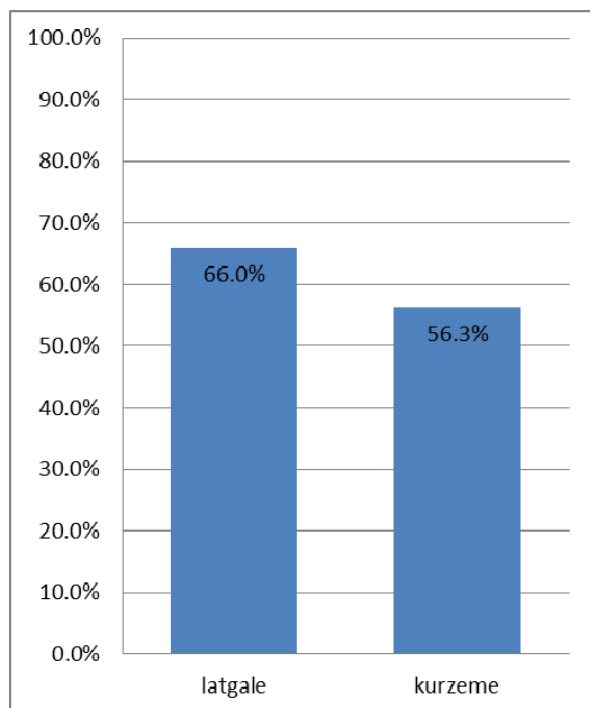
1. Liepājas novads, Mazgramzda, 56,618672 N, 21,606766 E, bojāti 13 koki no 16;
2. Rēzeknes novads, Bikava, četri parauglaukumi: 56,620219 N 27,613792 E; 56,440007 27,442474 E; 56,784755 N 27,232189 E; 56,806517 N 27,060626 E, bojāts 121 koks no 418;
3. Ikšķīles novads, Tīnūži, 56,878985 N 24,590315;
4. Ķeguma novads, Rembate, 56,769754 N 24,799232 E, bojāts 121 koks no 418;
5. Rēzeknes novads, Kuderi, 56,786611 N, 27,203778 E, bojāti 11 koki no 14;
6. Rēzeknes novads, Gaigalava, 56,77141935 N, 27,10718866 E, bojāts 1 koks;
7. Rēzeknes novads, Strūžāni, 56,765528 N, 27,157139 E, bojāti 54 koki no 85;
8. Kuldīgas novads, Laidi, 56,777833 N 21,853722 E, bojāti 11 koki no 15;
9. Aizputes novads, Kazdanga, 56,74628624321 N, 21,68281173 E, bojāti 10 koki no 19;

10. Durbes novads, Dunalka, 56,7188756321 N, 21,26919645 E, bojāti 12 koki no 15;
11. Pāvilostas novads, Ziemupe, 56,733222 N, 21,089483 E, bojāti 9 koki no 19;
12. Kandavas novads, Oksle, 57,110889 N 22,812222 E, bojāti 16 koki no 40;
13. Kandavas novads, Zante, 56,8353792322 N 22,78280958 E, bojāts 31 koks no 50.

Koksnes iekrāsojuma izplatības analīze bērzu plantācijā kopšanas cirtes laikā

Apsekojot iekrāsojuma izplatību, Liepājas rajona Mazgramzdu cirsma 57 % (26 no 45) no apskatītajiem aptuveni 30 gadus vecu bērzu celmiem bija ar iekrāsojuma pazīmēm kodolkoksnes apvidū. Kopumā Latgalē un Kurzemē tika konstatēta līdzīga iekrāsojuma sastopamība (66% un 56%) (19. attēls).

2012. gada janvārī, piedaloties bērzu jaunaudzū (14 g.v.) kopšanas cirtē Rembatē (56,769754 N, 24,799232 E), konstatēja, ka 31% (131 kokam no 418) no nozāģētajiem kokiem kodolkoksnes daļa pie pamatnes ir iekrāsota. Iekrāsojuma īpatsvars nebija vienmērīgi izplatīts, bet atšķīrās starp bērzu pēcnācēju ģimenēm. Atsevišķās ģimenēs iekrāsojums praktiski netika novērots, savukārt citās tas bija lielākajai daļai koku. Tiek pieņemts, ka viens no galvenajiem iemesliem ir ģenētiskā variācija starp ģimenēm, kas varētu būt saistīta ar rezistences mehānismiem pret iekrāsojumu vai to izraisošajiem mikroorganismiem. Arī augsnes neviendabīgums eksperimentālajā plantācijā varētu dažādi ietekmēt bērza augšanas procesus. Bērzu sēkļu plantācijā novērots, ka atrodamas atšķirības koksnes iekrāsojuma pakāpē starp atsevišķām ģimenēm, kas liecina par tā ģenētisku pamatu. Bērza koksnes iekrāsojumu izraisošo mikroorganismu noskaidrošana dos iespēju noteikt to izplatību, kā arī izmantot šīs zināšanas, lai atlasītu bērzus ar lielāku noturību pret koksnes iekrāsošanos.



19. attēls. Bērza koku ar iekrāsotu koksni īpatsvars Latgalē un Kurzemē.

Bērza koksnē esošo sēņu kvantitatīvās noteikšanas metodes izstrāde

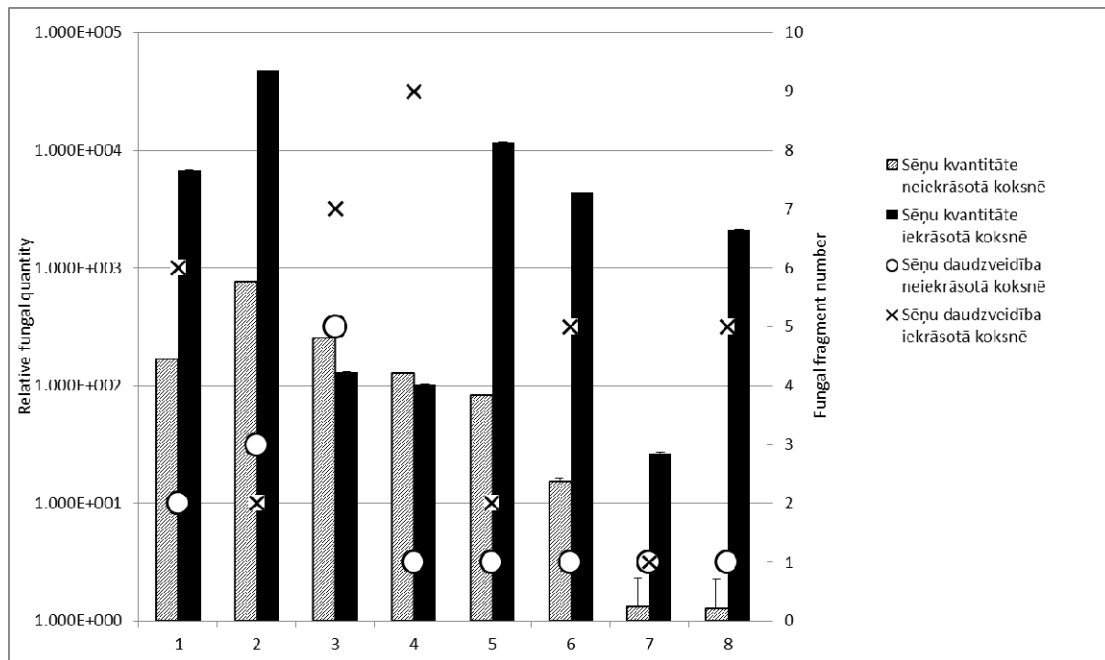
Izmantotas divas metodes sēņu DNS kvantitēšanai un daudzveidības noteikšanai paraugos – reālā laika PĶR (RT – PĶR) un PĶR produkta analīze ar gēnu analizatoru.

RT – PĶR ir metode, kas balstās uz to, ka pēc katra cikla PĶR reakcijā tiek detektēts DNS daudzums paraugā. RT – PĶR tika izmantoti ITS1F praimeris, kas ir sēņu specifisks, un ITS4 praimeris. Kontrolei izmantoti bērza *PAL* gēnu kodējoši praimeris. Metode ir ticama un ar augstu precizitāti. Ar šo metodi ir iespējams noteikt kopējo sēņu kvantitāti DNS paraugā. Analīzei tika izdalīta kopējā DNS no iekrāsotas un neiekrāsotas koksnē un salīdzināta kopējā sēņu kvantitāte.

PĶR produkta analīze ar gēnu analizatoru – šajā metodē PĶR reakcijai tika izmantots ITS1F praimeris ar fluoriscento iezīmi (FAM) un ITS4 praimeris. Reakcijas veiktas ar dažādām DNS koncentrācijām no vienas sēnes tīrkultūras, kā arī ar vienādas koncentrācijas DNS no dažādām sēņu tīrkultūrām. Iegūtie PĶR produkti analizēti ar gēnu analizatoru. Iegūtā pīķa augstums starp viena parauga tehniskajiem atkārtojumiem ir atšķirīgs un nav novērojama korelācija starp pīķa augstumu un DNS daudzumu PĶR reakcijā. Līdz ar to šī metode nav pielietojama kvantitatīvām analīzēm. Tā kā ITS fragmenta bp garums starp dažādām sēņu sugām var atšķirties, tad ar šīs metodes palīdzību varētu noteikt paraugā esošo sēņu daudzveidību. Ar šo metodi ir iespējams noteikt kopējo sēņu daudzveidību DNS paraugā. Analīzei tika izdalīta kopējā DNS no iekrāsotas un neiekrāsotas koksnē un salīdzināta kopējā sēņu daudzveidība.

Ar RT-PĶR metodi noteica kopējo sēņu kvantitāti. Tika analizēta no 8 bērza koku gan iekrāsotas un neiekrāsotas koksnē (kopā 16 paraugi) izdalīta DNS. Konstatēts, ka vairumā gadījumu, iekrāsotā koksnē ir ievērojami lielāka kopējā sēņu daudzveidība. 3. un 4. indivīdā, sēņu kvantitāte bija mazliet mazāka, tomēr tika konstatēta sēnes klātbūtne iekrāsotā un neiekrāsotā koksnē. Netika kvantitatīvi vērtēta koksnē iekrāsojuma pakāpe, un, iespējams, ka šajos analizētajos indivīdos tikai nesen parādījies koksnē iekrāsojums. Šādu analīzi vajadzētu paplašināt, un analizēt lielāku koku skaitu, tomēr laika un resursu ierobežojuma dēļ, to nebija iespējams veikt šī projekta ietvaros.

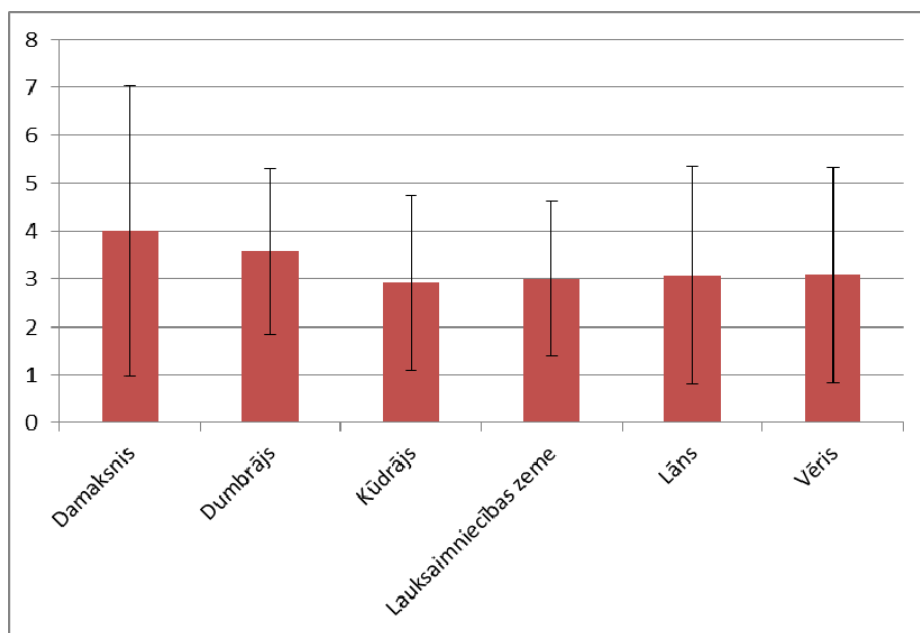
Tika analizēta arī sēņu kopējā daudzveidība, izmantojot iepriekš aprakstītos iekrāsotos un neiekrāsotos bērza koksnē paraugus. Analīze liecināja, ka kopējā sēņu daudzveidība ir lielāka iekrāsotos koksnē paraugos, izņemot 7. indivīdā, kur tā ir vienāda iekrāsotā un neiekrāsotā koksnē, un 2. indivīdā, kur iekrāsotā koksnē tika atrasta mazliet zemāka kopējā sēņu daudzveidība nekā neiekrāsotā koksnē (20. attēls).



20. attēls.

Kopējās sēņu daudzveidības analīzes dažādos meža tipos

No bērza kokiem, kurus ievāca no dažādiem meža tiptiem, tika analizēta koksnes kopējā sēņu daudzveidība, izmantojot iepriekš aprakstīto metodiku. Kopumā tika analizēti 546 koksnes paraugi no dažādiem meža tiptiem un augšanas apstākļiem (damaksnis, dumbrājs, kūdrājs, lāns, vēris un bijusī lauksaimniecības zeme). Lielākā daļa analizēto koksnes paraugu bija iekrāsoti. Noteikts, ka nav būtiska atšķirība kopējā sēņu daudzveidībā starp dažādiem meža tiptiem un augšanas apstākļiem (21. attēls), tomēr tika apstiprināta lielāka daudzveidība iekrāsotos koksnes paraugos, salīdzinot ar neiekrāsotiem.



21. attēls. Kopējā sēņu daudzveidība iekrāsotā koksņē dažādos meža tiptos.

Dažādas aprites stādu analīze

2011. gada rudenī tika ievākti paraugi no stādaudzētavas „Zābaki”. Ievākti desmit trešās aprites stādi, deviņi pirmās aprites stādi un desmit iepriekšējā gadā sēti un uz lauka augoši stādi. No šo stādu stumbriem izdalīta DNS, kas analizēta ar *Cladosporium* ģintij specifiskiem praimeriem. No 18 analizētajiem paraugiem 12 paraugos bija pozitīva reakcija.

Stādu inficēšanās pārbaudei tika veikts sekojošs eksperiments:

1) sēklas sterilizēja ar balinātāju ACE, atšķaidot to ar dejonizētu ūdeni attiecībā 1:1, piecas minūtes, pēc tam vairākas reizes skalots ar sterilu dejonizētu ūdeni,

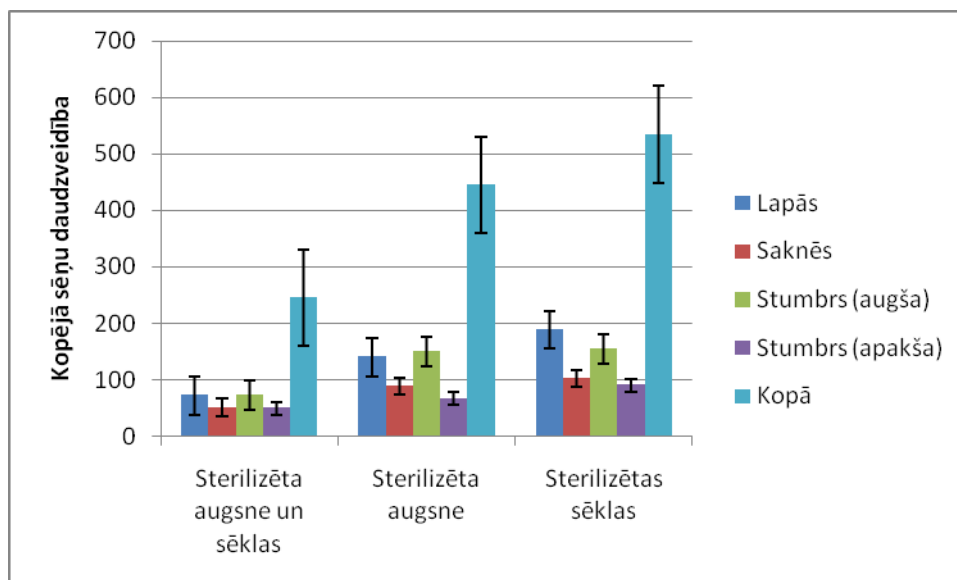
2) kūdras substrāts tika sterilizēts 140° C temperatūrā 4 stundas. Tomēr eksperimenta gaitā izrādījās, ka šāda sterilizācija ir nepietiekama,

3) apbēta DNS izdalīšanas metodika no kūdras substrāta tā sterilitātes kontrolei,

4) sterilizētas sēklas iesētas gan nepilnīgi sterilā, gan nesterilizētā augsnē, kā arī nesterilizētas sēklas iesētas nepilnīgi sterilā augsnē 2012. gada jūlijā, pēc divām nedēļām izpētās,

5) iekrāsojošo sēņu pārbaude stādos tika veikta 2013. gada pavasarī izmantojot ITS1F/ITS4 praimeru pāri, nosakot kopējo sēņu daudzveidību analizētajos bērzu stādos (22. attēls).

Secināts, ka lielākā daļa sēņu atrodas vidē (augsnē u.c.), un ka tās nav pārnestas sēklās. Lielākā sēņu daudzveidība atrasta stādu virszemes daļā (lapās un stumbra augšpusē). Tas liecina, ka endofītās sēnes, kuras ir atrodamas bērza koksnē ir kolonizējušas bērza koksni no apkārtējās vides, un ir atrodamas stāda augšdaļā, kā arī saknēs.

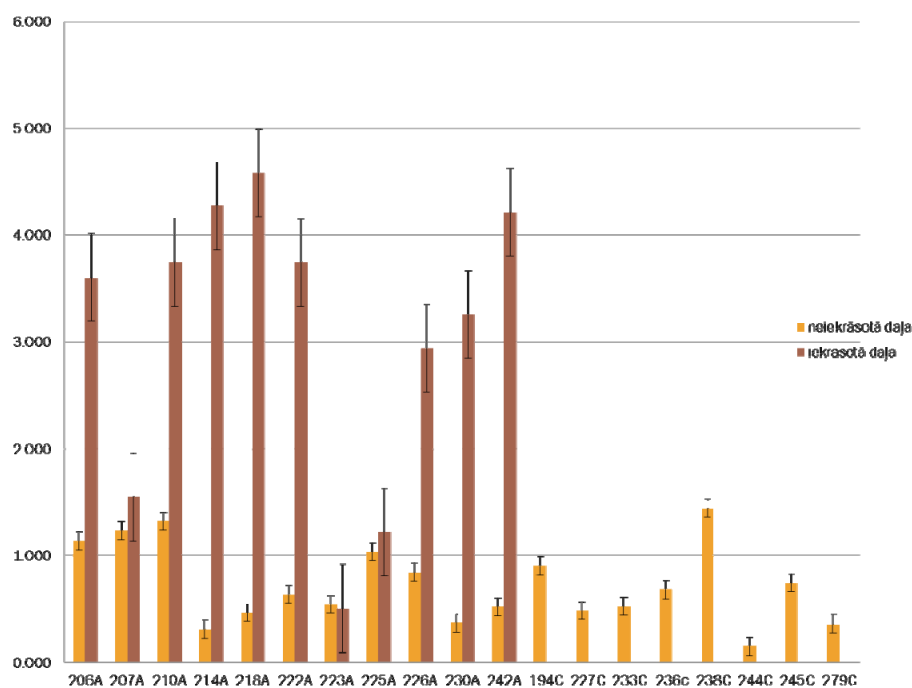


22. attēls. Kopējā sēņu daudzveidība 1 g.v. bērzu stādos.

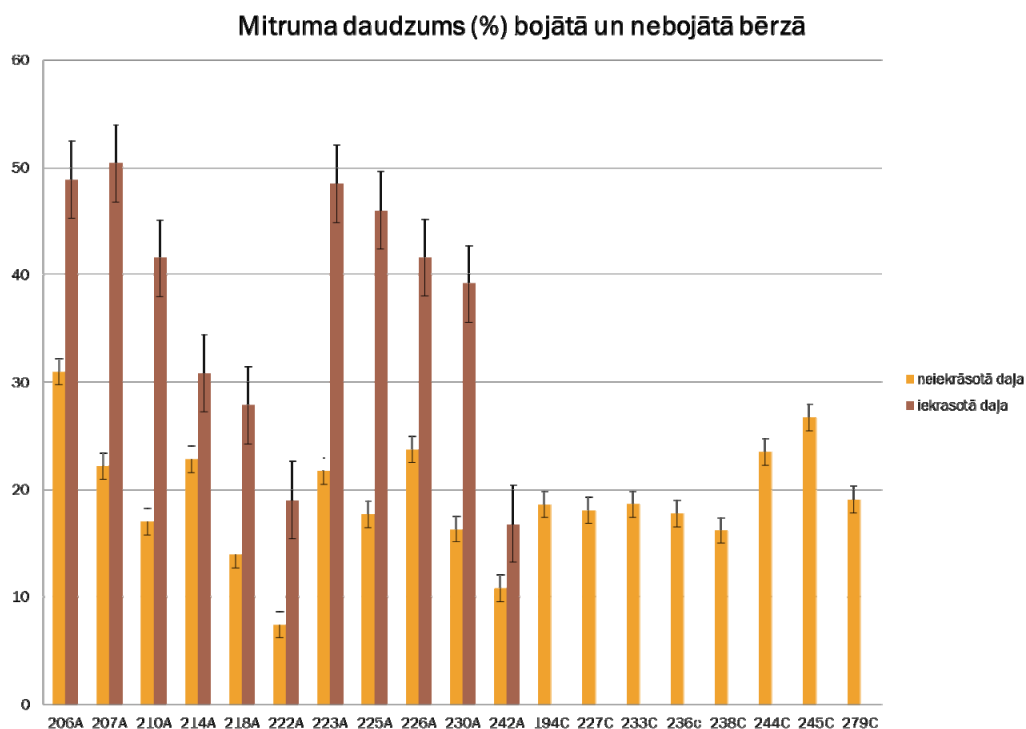
Kopējā fenolu daudzuma un mitruma noteikšana iekrāsotā un neiekrāsotā koksnē

Fenola savienojumi tika ekstrahēti no bērza koksnes ar 70% etanolu un to daudzums tika noteikts fotometriski pēc Folina-Čikalte metodes nosakot kopējo reducēto fenolu daudzumu. Koksnes mitruma saturs (%) tika noteikts ar mitruma svariem. Tika analizēti koksnes paraugi no 19 bērzu kokiem, analizējot gan iekrāsoto, gan neiekrāsoto koksni, tādus kokos, kuros tika atrasts koksnes iekrāsojums (kopā 30 paraugi). Tika atrasts, ka kopējais fenolu un mitruma saturs ir nozīmīgi paaugstināts iekrāsotā koksnē (23. un 24. attēls).

Fenola savienojumu daudzums (%) bojātā un nebojātā bērzā



23. attēls. Fenola savienojumu daudzums (%) iekrāsotā un neiekrāsotā bērza koksnē.



24. attēls. Mitruma daudzums (%) iekrāsotā un neiekrāsotā bērza koksne.

Secinājumi

- Visas izpētītās sēņu tīrkultūras izraisīja bērza koksnes iekrāsojumu klucīšos un dzīvos kokos.

- Koksnes iekrāsojums var izplatīties >90cm 6 mēnešu laikā pēc dzīva koka inokulācijas ar sēņu tīrkultūrām.

- Kopējā sēņu daudzveidība un kvantitāte ir palielināta iekrāsotā koksne.

- Meža tips, kurā aug bērzi, būtiski neietekmē kopējo sēņu daudzveidību koksne.

- Visticamāk, iekrāsojums ir koka fizioloģiskā reakcija uz mikroorganismu klātbūtni, un iekrāsotā koksne ir paaugstināts fenolu un mitruma saturs.

- Starp bērzu ģimenēm atrasta liela atšķirība koksnes iekrāsojuma sastopamībā, kas liecina par šīs īpašības ģenētisko pamatojumu.

- Turpmākajos pētījumos varētu analizēt atsevišķus fenola savienojumus un to atšķirību starp bērzu ģimenēm.

- Ģenētiskais pamatojums koksnes iekrāsojumam varētu dot iespēju nākotnē atlasīt bērzu materiālu/ģimenes, kurām ir zemāka koksnes iekrāsošanās sastopamība.

Dalība konferencēs

AdapCar un IUFRO (WP 2.02.00) konference "Adaptācijas un pielāgošanās ģenētiskie aspekti meža veselības, koksnes kvalitātes un biomasas ražošanas kontekstā", 2012. gada 3.-5. oktobris, Rīgā, Latvijā

K. Bitenieks, A. Korica, Ž. Bacāns, V. Nikolajeva, I. Baumanis, I. Veinberga, D. Ruņģis „Identification of microorganisms found in discoloured birch (*Betula pendula* Roth) wood” (publicēts 2012. Mežzinātne 25(58): 180)

1st Congress of Baltic Microbiologists, Rīga, 31.10.- 4.11.2012.

K. Bitenieks, A. Korica, Ž. Bacāns, V. Nikolajeva, I. Baumanis, I. Veinberga, D. E. Ruņģis „Detection and identification of silver birch *Betula pendula* Roth wood inhibiting microorganisms for determination of potential wood discoloration initiators” (posteris)

Publikācijas

K. Bitenieks, A. Korica, Ž. Bacāns, I. Baumanis, I. Veinberga, D. Ruņģis (2013) Analysis of microorganisms in discoloured *Betula pendula* wood. Proceedings of the International Scientific and Practical Conference "The Modern condition and prospects for protecting and sustaining forests in the system of sustainable development". Gomel, October 9-11. pp. 67-70.

K. Bitenieks, A. Korica, Ž. Bacāns, I. Baumanis, I. Veinberga, D. Ruņģis. Microbiological and genetic analysis of fungi in discoloured silver birch (*Betula pendula* Roth.) wood. (submitted to Baltic Forestry)