
Skuju koku mizas ekstraktu ietekmes uz *Lophodermium seditiosum* micēlija attīstību *in vitro* novērtējums

Dārta Kļaviņa ^{1*}, Rasa Dace Ķiesnere ¹, Ausma Marija Korica ¹, Natālija Arhipova ¹, Māris Daugavietis ¹, Tālis Gaitnieks ¹

Kļaviņa, D., Ķiesnere, R. D., Korica, A. M., Arhipova, N., Daugavietis, M., Gaitnieks, T. (2012). Evaluation of impact of pine bark extracts on mycelial growth of *Lophodermium seditiosum in vitro*. *Mežzinātne* 26(59): 167-181.

Kopsavilkums. Pētījumā novērtēta skuju koku mizas ekstraktu ietekme uz priežu brūnās skujbīres izraisītāja *Lophodermium seditiosum* (Minter, Staley & Millar) augšanu un attīstību *in vitro*. Pārbaudīti parastās egles (*Picea abies* (L.) H. Karst.) un parastās priedes (*Pinus sylvestris* L.) mizas ekstrakti, kas iegūti ekstrahēšanas procesā, pielietojot dažādus polāros šķīdinātājus (ūdens, etanols, sārmaini ūdens šķīdumi).

Konstatēta atsevišķu priedes mizas ekstraktu inhibējoša ietekme uz *L. seditiosum* micēlija augšanu, turpretī egles mizas ekstrakti nekavēja vai pat stimulēja *L. seditiosum* augšanu *in vitro*.

Visefektīvāk micēlija augšanu kavēja 0,1 % priedes mizas etanola ekstrakts, kā arī 1,5 % priedes mizas nātrija sārma ūdens ekstrakts. Ekstraktu inhibējoša ietekme uz sēnes attīstību novērota līdz otrajai augšanas nedēļai. Konstatētas ekstraktu ietekmes atšķirības uz dažādu sēnes izolātu augšanu. Ekstraktu inhibējošais efekts uz sēnes augšanu skaidrots ar ekstraktos sastopamo fenola savienojumu antifungālajām īpašībām.

Nozīmīgākie vārdi: *Lophodermium seditiosum*, skuju koku mizas ekstrakti, fenola savienojumi, antifungāla iedarbība.

•••

Kļaviņa, D. ^{2*}, Ķiesnere, R. D. ², Korica, A. M. ², Arhipova, N. ², Daugavietis, M. ², Gaitnieks, T. ² **Evaluation of impact of pine bark extracts on mycelial growth of *Lophodermium seditiosum in vitro*.**

Abstract. *Lophodermium seditiosum* (Minter, Staley & Millar) is one of the main needle pathogens in forest nurseries and young pine plantations causing *Lophodermium* needle cast on pines. Every season in forest nurseries Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings are treated with fungicides to prevent infection. As these chemicals have an impact on the environment and use of some of them is not allowed after forest planting research is required into new agents for protection of seedlings against needle cast.

¹ LVMI Silava, Rīgas iela 111, Salaspils, LV-2169, Latvija; * e-pasts: darta.klavina@silava.lv

² Latvian State Forest Research Institute "Silava", 111 Riga str., Salaspils, LV-2169, Latvia,

* e-mail: darta.klavina@silava.lv

Since conifer bark extracts, especially phenolic compounds, are known to have antifungal effects, we tested those on *Lophodermium seeditiosum* under laboratory conditions.

We tested three methods of adding extracts to agar media – addition of unsterilized extract, addition of autoclaved extract and addition of filter paper previously impregnated with extract. The method using impregnated filter paper showed the best results.

Comparing Scots pine and Norway spruce (*Picea abies* (L.) H. Karst.) bark extracts we observed that spruce extract did not show any inhibition of *L. seeditiosum* colony growth or even stimulated it, though some of the spruce bark extracts had a greater total amount of phenols in comparison with pine extracts.

The largest *L. seeditiosum* colony growth inhibition was obtained using pine bark ethanol and sodium hydroxide water extracts, and the effect of these extracts was maintained for more than two weeks.

Sodium hydroxide water extracts at high concentration (1.5 %) showed inhibition of fungal growth. It was speculated that fungal growth is reduced by inhibiting its cellulase enzyme activity due to tannins most likely present in these extracts or by possible increase of pH in the medium due to extract addition. 0.1 % pine bark ethanol extract had a significant effect on *L. seeditiosum* mycelial growth in most of experiments, though its effectiveness varied among different *L. seeditiosum* isolates. As this extract was rich with phenolic compounds which are reported to have antifungal effects, it was assumed that phenolic compounds are causing fungal inhibition. This extract will be tested on seedlings under field conditions to evaluate its effectiveness in practical forestry.

Key words: *Lophodermium seeditiosum*, conifer bark extracts, phenolic compounds, antifungal effect.

...

Клявиня, Д.^{3*}, Киеснере, Р. Д.³, Корица, А. М.³, Архипова, Н.³, Даугавиетис, М.³, Гайтниецс, Т.³ **Оценка воздействия экстрактов коры хвойных деревьев на развитие мицелия *Lophodermium seeditiosum* in vitro.**

Резюме. В ходе данного исследования в лабораторных условиях было оценено воздействие экстрактов коры хвойных деревьев на рост и развитие мицелия возбудителя обыкновенного (настоящего) шютте сосны – гриба *Lophodermium seeditiosum* (Minter, Staley & Millar). Были тестированы вытяжки из коры ели обыкновенной (*Picea abies* (L.) H. Karst.) и сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), при экстракции которых использовались различные полярные растворители (вода, этанол и водные растворы щелочи NaOH).

В ходе эксперимента выявлено, что экстракты, полученные из коры ели не замедляют, а в ряде случаев даже ускоряют рост мицелия *L. seeditiosum* в лабораторных условиях, в то время как некоторые экстракты, полученные из коры сосны имели ингибирующее воздействие на рост мицелия *L. seeditiosum*.

³ ЛГИЛ «Силава», ул. Ригас 111, Саласпилс, LV-2169, Латвия; * эл. почта: darta.klavina@silava.lv

Наиболее эффективно рост мицелия *L. seditiosum* замедляли 0,1 % этаноловый экстракт сосновой коры и 1,5 % водный NaOH экстракт сосновой коры. Замедление роста мицелия гриба под влиянием экстрактов сосновой коры наблюдалось до второй недели роста. Негативное воздействие экстрактов на рост грибного мицелия может быть связано с содержащимися в коре фенольными соединениями, которые имеют фунгицидные свойства.

Ключевые слова: *Lophodermium seditiosum*, экстракты сосновой и еловой коры, фенольные соединения, фунгицидные препараты.

Ievads

Parastā priede (*Pinus sylvestris* L.) ir dominējošā koku suga Latvijā, kas aizņem 35,7 % no mežu platības (VMD dati uz 2011. gadu). Tā ir arī komerciāli nozīmīgākā koku suga mūsu valstī. AS „Latvijas valsts meži” kokaudzētavās 2012. gadā izaudzēti 8,5 miljoni priežu kailsakņu stādu un 14,4 miljoni ietvarstādu (LVM „Sēklas un Stādi” informācija). Viens no nozīmīgākajiem priežu skuju patogēniem ir *Lophodermium* ģints sēnes, no kurām kokaudzētavās sējeņu skujbiri 95-100 % gadījumos izraisa sēne *Lophodermium seditiosum* (Minter, Staley & Millar).

Ziemeļu un Centrālajā Eiropā *Lophodermium seditiosum* izraisītā slimība – priežu brūnā skujbire – konstatēta gan kokaudzētavās, gan jaunos priežu stādījumos (Ortiz-García *et al.*, 2003), radot pieauguma samazināšanos un kociņu atmiršanu pirmajos augšanas gados. Slimība skar ne tikai parasto priedi (*Pinus sylvestris*), bet arī citas priežu sugas: *Pinus nigra*, *P. mugo*, *P. resinosa*. Vienģadīgajām priedēm skujas var daļēji nobirt sezonā pēc inficēšanās vai saglabāties vēl vienu gadu. Stādījumos slimībai raksturīga vienmērīga izplatība: nereti tā inficē visas tur augošās priedes.

Lai ierobežotu skujbires izplatību,

kokaudzētavās ieteikts neveidot sabiezinātus sējumus, neievest inficētus stādus no citām kokaudzētavām, atturēties lietot priežu mulču un ievērot optimālu laistīšanas režīmu. Tomēr stādu aizsardzībai nozīmīgākās ir ķīmiskās metodes, kuru profilaktiska pielietošana var būt ļoti efektīva (>95 %) stādu pasargāšanā no skujbires gan kokaudzētavā, gan arī pirmajā gadā pēc kociņu izstādīšanas mežā. Aktīvākās fungicīdās vielas ir hlorotalonils, azoksistrobīns un mankocebs. Latvijā reģistrēti divi preparāti „Dithane NT” (kontaktpreparāts; satur mankocebu; pielietojams kā kokaudzētavās tā jaunaudzēs) un „Amistar” (sistēmpreparāts; satur azoksistrobīnu; atļauts kokaudzētavās) (Marģeviča *et al.*, 2012). Kokaudzētavās sējeņus apsmidzina no jūlija sākuma, ik pēc nedēļas vai divām, līdz novembrim.

Taču jaunaudzēs slimību apkarošanai dažu fungicīdu pielietošana nav atļauta (Jansons *et al.*, 2008). Konstatēts, ka *Lophodermium seditiosum* savairošanās jaunaudzēs, salīdzinot ar kokaudzētavām, ir krietni retāka (Hanso, Drenkhan, 2007). Tomēr plašāku slimības izplatību un bojājumu pakāpi jaunaudzēs var veicināt sugai labvēlīgi vides apstākļi, kādi novērojami pēdējos gados – biežās nokrišņiem bagātās vasaras, vēlie rudenī un siltās, mitrās ziemas (Jansons *et al.*, 2008). Piemēram, Igaunijā nesen veiktajos

pētījumos konstatētas gandrīz regulāras skujbires epidēmijas: reizēm pat tik biežas, ka viena gada epidēmija ir grūti nodalāma no nākamā gada epidēmijas (Hanso, Drenkhan, 2007).

Lai mazinātu ķīmisko aizsardzības līdzekļu pielietošanu skujbires ierobežošanai, tiek meklēti alternatīvi risinājumi. Augos ir izveidojušies aizsardzības mehānismi, piemēram, spēja sintezēt metabolītus ar antifungālām īpašībām (Rai, Mares, 2003). Tā kā miza ir koka dabiskā aizsardzības barjera, zinātnieki pēta dažādu koku sugu mizas mehāniskās un ķīmiskās īpašības. Kā parāda M. Mori u.c. (1995, 1997) eksperimenti, skuju koku mizas ekstraktiem, īpaši no *Pinaceae* dzimtas sugām, piemīt augstāka fungicīdā aktivitāte nekā lapu koku mizas ekstraktiem. Arī citi autori, analizējot dažādu koku sugu mizas ekstraktu ietekmi uz patogēnām un koksnes zilējumu izraisošajām askomicētēm, norāda, ka skuju koku mizas ekstrakti kopumā ir iedarbīgāki salīdzinājumā ar lapu koku ekstraktiem (Alfredsen *et al.*, 2008).

Tomēr samērā maz ir darbu par Ziemeļeiropas koku sugu mizu ekstraktu fungicīdo efektivitāti. Dažos pētījumos konstatēta priedes mizas ekstraktu vai pulvera inhibējoša ietekme uz atsevišķām trupi izraisošām bazīdijsēnēm (Nemli *et al.*, 2006; Alfredsen *et al.*, 2008) vai citu augu patogēnu, kā *Alternaria solani*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum* un *Sclerotinia sclerotiorum* (Kokalis-Burelle, Rodrigues-Kabana, 1994), attīstību.

Skuju koki, reaģējot uz dažādiem ievainojumiem, kā arī sēņu infekcijām vai kukaiņu bojājumiem, producē vairāk terpēnu, sveķskābju un fenola savienojumu, tādēļ šīs

vielas uzskata par nozīmīgām skuju koku dabiskās aizsardzības veidošanā. Terpēnu un sveķskābju nozīme skuju koku ķīmiskajā aizsardzībā pret sēņu infekcijām ir samērā maz pētīta. Dažu pētījumu rezultāti apliecina gaistošo terpēnu un sveķskābju inhibējošo ietekmi uz sēņu augšanu (Schrimpton, Whitney, 1968), savukārt citos konstatēts, ka minētie savienojumi kavē arī stādu augšanu vai pat stimulē patogēnu attīstību (Nerg *et al.*, 1994).

Daudzu skuju koku mizā – īpaši pielāgotās parenhīmas šūnās – sintezējas un uzkrājas fenolu savienojumi, kas aizsargā no savainojumiem, kaitēkļiem un sēņu infekcijām (Kähkönen *et al.*, 1999; Evensen *et al.*, 2000; Franceschi *et al.*, 2005). Fenolu savienojumi sekmīgāk ekstrahējami ar polāriem šķīdinātājiem. Šādiem polāriem, fenola savienojumus saturošiem mizas ekstraktiem konstatēta augšanu inhibējoša ietekme, piemēram, pret koksnes sēnēm no *Leptographium* ģints (Klepzig *et al.*, 1996) vai atsevišķām piepju sugām (Hart, Shrimpton, 1979; Harun, Labosky, 2007).

No skuju koku mizas ekstrahētajiem fenolu savienojumiem konstatēts koksnes zilējumu izraisošo sēņu *in vitro* augšanu kavējošs efekts (Blodgett, Stanosz, 1997; Evensen *et al.*, 2000). Kopumā novērots, ka *Pinaceae* dzimtas augu mizas ekstrakti var inhibēt augiem patogēno sēņu augšanu (Mori *et al.*, 1995), taču jāatzīmē, ka lielākoties eksperimentēts ar koksni vai stādu substrātu saistītajiem patogēniem, ne skuju patogēniem. Literatūras dati liecina, ka dabiskos apstākļos, pārbaudot kokaudzētavā audzētus *P. sylvestris* stādīņus, atklāta ievērojama kopējo fenolu koncentrācijas sezonālā variācija:

to koncentrācija stādiņos pavasarī ir būtiski augstāka, bet rudenī – būtiski zemāka (Nerg *et al.*, 1994). Iespējams, ka fenolu savienojumus saturošie skuju koku mizas ekstrakti var mazināt stādu uzņēmību pret *L. seditiosum*, kas uzsāk jauno skuju inficēšanu vasaras otrajā pusē un turpina izplatīties tieši rudenī, kad fenolu savienojumu koncentrācija skujās ir zemāka. Mūsu darba mērķis – noskaidrot skuju koku mizas ekstraktu ietekmi uz *Lophodermium seditiosum* attīstību *in vitro*.

Pētījumu gaitā veikti trīs secīgi eksperimenti, lai

- 1) pārbaudītu trīs metodes ekstraktu pievienošanai barotnei;
- 2) salīdzinātu dažādu mizas un skuju ekstraktu ietekmi uz *Lophodermium* augšanu;
- 3) izvērtētu iedarbīgāko ekstraktu ietekmi uz dažādu *Lophodermium* izolātu augšanu.

Materiāls un metodes

Mizu ekstraktu iegūšana un raksturojums

Parastās egles un parastās priedes mizas iegūtas no SIA „Rūķi” (Salaspils novads, Salaspils pagasts) apstrādātajiem skuju koku baļķiem. Mizu paraugi ievākti 2010. gada oktobrī un 2011. gada martā.

Etanola un ūdens ekstrakti

Priedes un egles miza sasmalcināta ar ekstrūdera tipa smalcinātāju M-1. Iegūtā masa frakcionēta, izmantojot sietus, un ekstrakcijai ņemta frakcija ar daļiņu izmēru 0,5-1,0 mm.

Ekstrakcija veikta firmas „Buchi” aparātā B-811 soksleta režīmā, kas nodrošina praktiski pilnīgu ekstrakciju. Ekstrakcijas cilindrā iepildīts noteikts daudzums atdalītās

mizu frakcijas, kurai iepriekš noteikta sausne; tad uzliets šķīdinātājs (ūdens vai 96 % etanols) tā, lai tas apņemtu apstrādājamo materiālu. Šķīdinātājs ieliets arī iztvaicēšanas traukā (vienai šūniņai nepieciešami ap tuveni 250 ml šķīdinātāja). Ekstrakcijas optimālais ilgums – 2,5 stundas.

Sārmainie ūdens ekstrakti

Priedes un egles miza apstrādāta ar smalcinātāju M-1. Iegūtais izejmateriāls frakcionēts ar sietiem, un ekstrakcijai ņemta frakcija ar daļiņu izmēru lielāku par 1,0 mm, jo smalkā putekļveida frakcija (daļiņu izmērs mazāks par 1 mm) apgrūtinā ekstraktu iegūvi. Iegūtai frakcijai noteikta sausne.

Ekstrakcijas veikšanai apaļkolbā iesvērts noteikts daudzums atdalītas koku mizas frakcijas un uzliets noteiktas koncentrācijas sārmainā ūdens šķīdums (NaHCO_3 , Na_2CO_3 vai NaOH šķīdumi), kas pievienots tādā daudzumā, lai miza pilnībā būtu pārklāta. Kolbai pievienots atces dzesinātājs, un šķīdums karsēts pie vārīšanās temperatūras 2,5 stundas. Ekstrakcijas laiks uzņemts no viršanas sākuma.

Pēc ekstrakcijas beigām ekstrakts atdalīts no mizas, pārnesot kolbas saturu uz tīra lina auduma un nospiežot ar slogu, jo miza, līdzīgi sūklim, uzkrāj ievērojamu ekstrakta daudzumu.

Fenolu satura noteikšana ekstraktos

Kopējais fenolsavienojumu daudzums ekstraktu sausnē noteikts ar „Genesys 10 UV scanning” spektrofotometru, pamatojoties uz šo savienojumu reoksidēšanas ar Folina-Čikalteu (*Folin-Ciocalteu*; ražotājs – *Scharlau*, Spānija) fenola reaģentu, kā

rezultātā veidojas krāsains savienojums, kura intensitāte ir proporcionāla fenolsavienojumu koncentrācijai. Kā standartšķīdums izmantots noteiktas koncentrācijas gallus-skābes šķīdums, mērot tā absorbciju pie viļņa garuma 765 nm (Mechikova *et al.*, 2007). Mizas ekstraktu parametri apkopti 1. tabulā.

Eksperimentālo barotņu sagatavošana

Lophodermium seditiosum augšanas pārbaudei izmantota agarizētā iesala ekstrakta barotne (Malt Extract, Biolife, Italiana). Eksperimentos ekstrakti barotnēm pievienoti trīs dažādos veidos:

1) 1 ml nesterila ekstrakta ieliets Petri traukā ar karstu barotni, samaisīts un atstāts sacietēšanai;

2) ekstrakts 20 minūtes autoklāvēts 121°C temperatūrā, pēc tam 1 ml sterila ekstrakta ienests Petri traukā, tam klāt pievienojot barotni. Viss samaisīts un atstāts sacietēšanai. Ja autoklāvēšanas procesā ekstrakts kristalizējas, tas šķīdināts ar dejonizētu, sterilu ūdeni.

3) sterils filtrpapīrs ($\varnothing = 7$ cm) samitrināts ar 1 ml nesterila ekstrakta. Pievienots 1 ml 96 % etilspirta un atstāts 15 minūtes nožūšanai. Filtrpapīrs ielikts Petri traukā, pievienojot 20 ml barotnes un ļaujot tai sacietēt (Alfredsen *et al.*, 2008). Daļā eksperimentu, lietojot šo metodi, uz filtrpapīra pilinātā ekstrakta daudzums aprēķināts atkarībā no paredzētās ekstraktvielu koncentrācijas barotnē.

1. tabula / Table 1

Mizu ekstraktu raksturojums
Characteristics of bark extracts

Koku suga <i>Tree species</i>	Ekstrakcijas metode <i>Extraction method</i>	Kopējais ekstraktvielu saturs ekstraktā, % <i>Total content of extractive substance in extract, %</i>	Fenolsavienojumu daudzums ekstraktā, % <i>Amount of phenol compounds in extract, %</i>	Ekstrakta pH <i>pH of extract</i>
P	H ₂ O	3,28	1,47	–
P	EtOH	5,01	9,31	–
E	H ₂ O	31,53	17,74	–
E	EtOH	14,73	4,04	–
P	Ar 0,6 % NaOH ūdens šķīdumu <i>With 0.6 % NaOH water solution</i>	5,47 ±0,21	1,05	7,43
P	Ar 1 % Na ₂ CO ₃ ūdens šķīdumu <i>With 1 % Na₂CO₃ water solution</i>	6,40 ±0,22	1,31	7,43
P	Ar 1 % NaHCO ₃ ūdens šķīdumu <i>With 1 % NaHCO₃ water solution</i>	5,82 ±0,20	1,25	7,48
E	Ar 0,7 % Na ₂ CO ₃ ūdens šķīdumu <i>With 0.7 % Na₂CO₃ water solution</i>	5,43 ±0,24	1,21	7,55

Apzīmējumi / Legend:

P – parastā priede / Scots pine (*Pinus sylvestris*),

E – parastā egle / Norway spruce (*Picea abies*).

Kontrolei izmantots sterils filtrpapīrs, kas apstrādāts ar etanolu (Alfredsen *et al.*, 2008).

Eksperimentā ar dažādiem *Lophodermium seditiosum* izolātiem atšķirīgu ekstraktu variantu barotnes sagatavotas astoņos atkārtojumos, citos eksperimentos – piecos.

Lophodermium kultūras un to augšanas novērtēšana

Visos eksperimentos lietots *Lophodermium seditiosum* izolāts I (izdalīts priežu jaunaudzē, Rendas iecirkņa 309. kv., 23. nogabalā). Papildus tam eksperimentā ar dažādiem sēnes izolātiem lietoti arī *Lophodermium seditiosum* izolāti, kas iegūti no Valsts augu aizsardzības dienesta (VAAD) Nacionālās fitosanitārās laboratorijas. Izolāti rakstā apzīmēti kā *Lophodermium seditiosum* izolāts II (izdalīts 2011. gadā no Viesītes novadā ievāktām priežu skujām, Nr. VAAD kolekcijā: 0046-11), izolāts III (izdalīts 2011. gadā no Pļaviņu novadā ievāktām priežu skujām, Nr. VAAD kolekcijā: 0019-11) un izolāts IV (izdalīts 2010. gadā no Rēzeknes novadā ievāktām priežu skujām, Nr. VAAD kolekcijā: 0162-10). Visu izolātu piederība *Lophodermium seditiosum* sugai pārbaudīta arī ar molekulārām metodēm LVMI Silava Ģenētisko resursu centrā, veicot polimerāzes ķēdes reakciju ar sugai specifiskiem praimeriem, kā arī pārbaudot amplifikācijas produktus uz 1 % agarozes gēla.

Sēnes izolāta gabaliņš, kopā ar substrātu, izmantojot sterilu metāla caurulīti ($\varnothing = 0,5$ mm), ņemts no sēnes kolonijas aktīvās augšanas zonas un novietots Petri trauka centrā. Inkubācija noritēja tumsā +18°C temperatūrā. Sēnes augšana mērīta

divos perpendikulāros virzienos. *Lophodermium* augšana kontrolēta 7, 10, 14 un 21 dienu pēc eksperimenta sākuma. Tā kā lauka apstākļos stādus apstrādā ar aizsardzības līdzekļiem – intervāls 10 līdz 14 dienas –, rezultātu sadaļā analizēti tieši 10 un 14 dienu vecu *L. seditiosum* kultūru augšanas rādītāji.

Datu analīze

Lophodermium seditiosum kolonijas aizņemtais laukums aprēķināts, izmantojot elipses formulu $S = \pi ab$, kur a un b – elipses pusasis. Ekstraktu inhibējošais efekts uz sēnes augšanu noteikts, salīdzinot tās aizņemto laukumu barotnēs konkrētā ekstrakta variantā un kontroles variantā; izmantots vienvirziena t-tests, pie $\alpha = 0,05$ MS Excel programmā.

Rezultāti

Ekstrakta pievienošanas veida un mizas ekstraktu iedarbības izvērtējums

Barotnes sagatavošanai pielietojot nesterilu ekstraktu, variantos ar priedes un egles ūdens ekstraktiem, tika konstatēts augsts citu sēņu infekcijas fons, un līdz ar to vairāki Petri trauki eksperimentam nebija izmantojami. Tādēļ turpmākajā izpētē šī metode netika pielietota.

Autoklāvēta priedes mizas ekstrakta pievienošana barotnei būtiski kavēja *Lophodermium seditiosum* augšanu, un ekstrakta darbības efekts saglabājās pat trešajā nedēļā pēc eksperimenta uzsākšanas (2. tabula). Kaut gan autoklāvēšanas metodei bija labi rezultāti un tā ir lietota arī citos *in vitro* izmēģinājumos ar augu ekstraktiem (piemēram, Montes-Belmont, Prados-Ligero, 2006), jāuzsver, ka ekstrakta rūpnieciskai

ražošanai šis risinājums nav piemērots. Ar filtrpapīru metodi priedes mizas ekstrakta barotnēs 10 dienas pēc eksperimenta sākuma sēnes aizņemtā laukuma vidējā vērtība bija būtiski zemāka nekā kontroles variantā (2. tabula). Kaut gan netika konstatētas statistiski būtiskas atšķirības, bija vērojama tendence, ka priedes mizas ekstrakta barotnē sēnes kolonijas aizņemtā laukuma vidējās vērtības līdz 2. nedēļai bija zemākas nekā kontroles variantā (2. tabula). Salīdzinot pārbaudītās metodes, konstatējām, ka filtrpapīru metode, kas lietota arī citos pētījumos (Alfredsen *et al.*, 2008), ir optimālākā sēnes micēlija augšanas ātruma novērtēšanai, tādēļ to arī izmantojām turpmākajos eksperimentos.

Priedes un egles mizas atšķirīgo ekstraktu ietekme uz Lophodermium seditiosum augšanu
 Rezultāti par dažādu izvilkumu

priedes un egles mizas ekstraktu ietekmi uz *Lophodermium seditiosum* augšanu atspoguļoti 1. attēlā. Barotnei pievienoto ekstraktu daudzums (%) aprēķināts, ņemot vērā kopējo ekstraktvielu daudzumu (skat. 1. tab.). No visiem šajā eksperimentā pārbaudītajiem ekstraktiem būtiska ($p < 0,05$) negatīva ietekme uz micēlija attīstību, salīdzinot ar kontroles variantu, otrajā nedēļā bija 0,1 % priedes mizas etanola ekstraktam un trešajā nedēļā – 1,5 % priedes mizas NaOH ūdens šķīduma ekstraktam (1. attēls). Trīs nedēļas pēc eksperimenta ierīkošanas pārbaudītajiem egles mizas, kā arī priedes mizas NaHCO_3 un 0,5 % EtOH ekstraktiem tika novērota pat pretēja, stimulējoša ietekme uz *L. seditiosum* augšanu.

Jāatzīmē, ka egles mizas ekstraktos kopumā, salīdzinot ar vairākiem priedes mizas ekstraktiem, kopējo fenolu saturs bija augstāks (1. tab.), taču, neskatoties uz to,

2. tabula / Table 2

Lophodermium seditiosum kolonijas laukums atkarībā no ekstrakta pievienošanas veida
Area of Lophodermium seditiosum colony depending on the type of extract addition

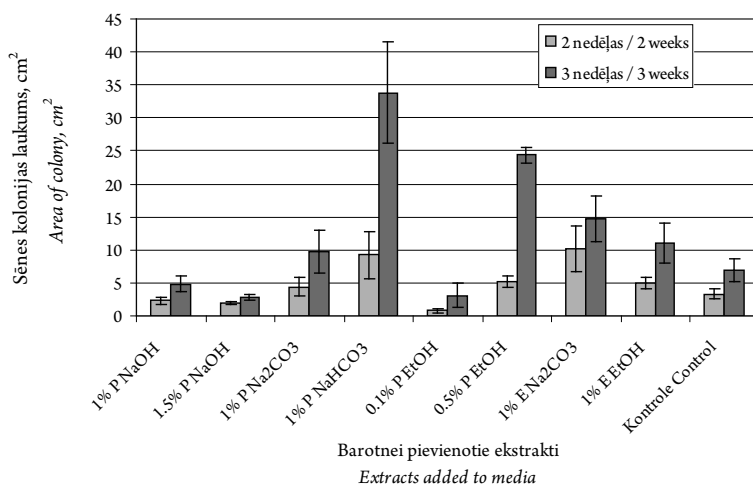
Ekstrakcijas metode <i>Extraction method</i>	Nesterila ekstrakta metode <i>Unsterile extract method</i>			Autoklāvētu ekstraktu metode <i>Autoclaved extract method</i>			Filtrpapīru metode <i>Filter paper method</i>		
	10 dienas <i>10 days</i>	2 nedēļas <i>2 weeks</i>	3 nedēļas <i>3 weeks</i>	10 dienas <i>10 days</i>	2 nedēļas <i>2 weeks</i>	3 nedēļas <i>3 weeks</i>	10 dienas <i>10 days</i>	2 nedēļas <i>2 weeks</i>	3 nedēļas <i>3 weeks</i>
P H ₂ O	Infekcija <i>Infection</i>	Infekcija <i>Infection</i>	Infekcija <i>Infection</i>	2,4±0,3	4,2±0,5	10,5±0,7	1,4±0,3*	3,1±0,4	21,1±12,5
P EtOH	1,3±0,4	3,0±1,0	9,4±2,5	1,1±0,1*	1,8±0,3*	4,2±0,2*	1,4±0,6*	3,4±1,4	15,1±3,0
E H ₂ O	5,5±0,5	9,4±0,5	21,9±3,1	6,0±0,1	10,6±0,3	27,0±1,7	5,5±1,0	9,1±1,4	23,7±3,3
E EtOH	3,0±0,7	5,1±1,0	13,0±2,5	2,0±0,2	3,5±0,6	5,9±1,3	3,5±0,7	7,0±1,1	18,9±2,8
Kontrole <i>Control</i>	2,5±0,9	4,3±1,6	6,5±2,0	2,2±0,3	3,2±0,4	5,3±0,3	2,9±0,2	5,0±0,6	8,9±1,0

Apzīmējumi / Legend:

* – būtiski zemāki augšanas rādītāji, salīdzinot ar kontroles variantu ($t > t_{0,05}$) / significantly lower parameters of colony growth compared to control ($t > t_{0,05}$).

P – parastā priede / Scots pine (*Pinus sylvestris*);

E – parastā egle / Norway spruce (*Picea abies*).



1. attēls. *Lophodermium seditiosum* kolonijas laukums barotnēs ar dažādiem ekstraktiem divas un trīs nedēļas pēc eksperimenta sākuma.

Figure 1. Area of *Lophodermium seditiosum* colony on media with addition of different extracts two and three weeks after experiment initiation.

šie ekstrakti nekavēja vai pat stimulēja sēnes augšanu.

Tā kā egles mizas ekstrakti, salīdzinājumā ar kontroli, sēnes augšanu būtiski nekavēja, turpmākajos eksperimentos izmantojām tikai priedes mizas ekstraktus.

Priedes mizas etanola ekstrakts 0,1 % koncentrācijā inhibēja *Lophodermium* augšanu, taču, koncentrācijas līmeni paaugstinot, *Lophodermium* augšana tika stimulēta (1. attēls).

Priedes mizas ekstraktu ietekme uz dažādu *Lophodermium* izolātu augšanu

Salīdzināta iepriekšējos eksperimentos efektīvāko ekstraktu variantu – sārma un etanola ekstraktu (3. tabula, 2. un 3. attēls) – ietekme uz četrus dažādu *Lophodermium seditiosum* izolātu augšanu *in vitro*.

Nedēļu pēc eksperimenta ierīkošanas

barotnēs ar etanola ekstraktu I un IV *Lophodermium* izolāts auga būtiski lēnāk ($p < 0,05$) nekā kontroles variantā (3. tabula).

II, III un IV izolātiem, barotnēs ar sārma 1,5 % ekstraktu, 10 dienas pēc eksperimenta ierīkošanas novērots būtiski mazāks ($p < 0,05$) kolonijas laukums salīdzinājumā ar kontroles variantu (2. attēls). Divas nedēļas pēc eksperimenta ierīkošanas barotnēs ar nātrija sārma 1,5 % priedes mizas ekstraktu *Lophodermium* II un IV izolāta augšanas rādītāji bija būtiski ($p < 0,05$) zemāki nekā kontroles barotnēs (3. attēls).

Savukārt barotnēs ar etanola ekstraktu 10 dienas pēc eksperimenta ierīkošanas IV *Lophodermium* izolātam kolonijas laukums, salīdzinot ar kontroli, bija būtiski mazāks (2. attēls). Bet divas nedēļas augušo koloniju laukums statistiski būtiski neatšķīrās no kontroles variantos fiksētā.

Visumā pārbaudītie izolāti uz ekstraktu pievienošanu barotnei reaģēja līdzīgi, tomēr kopumā izolāts I auga ātrāk un tā kolonijas aizņēma lielāku laukumu nekā citi izolāti.

Ar nātrija sārma šķīdumu iegūtā ekstrakta pievienošana barotnei 1,5 % koncentrācijā arī pēc 14 dienām inhibēja micēlija augšanu diviem (II un IV) no pārbaudītajiem *L. seditiosum* izolātiem, salīdzinot ar kontroles variantu (3. attēls).

Lophodermium seditiosum micēlija aug-

šanu *in vitro* būtiski kavēja priedes mizas ekstrakti: ar nātrija sārma šķīdumu iegūtais priedes mizas ekstrakts 1,5 % koncentrācijā un ar etanolu iegūtais priedes mizas ekstrakts 0,1 % koncentrācijā. Šie ekstraktu varianti ieteikti pārbaudei priežu stādmateriāla aizsargāšanai pret *L. seditiosum* infekciju lauka apstākļos.

Diskusija

Kaut arī literatūras dati liecina par egles mizas ekstraktu augstāku antifungālo

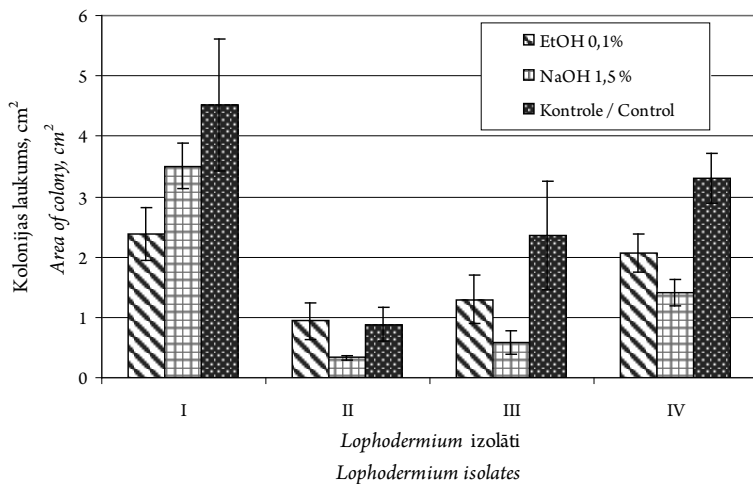
3. tabula / Table 3

Dažādu *Lophodermium seditiosum* izolātu kolonijas laukums barotnēs ar atšķirīga sastāva priedes mizas ekstraktiem
Area of colony of different Lophodermium seditiosum isolates on agar media with addition of different pine bark extracts

Barotnes raksturojums <i>Characteristics of media</i>		<i>Lophodermium</i> izolāts <i>Lophodermium isolate</i>			
Šķīdinātājs <i>Solvent</i>	Ekstrakta daudzums barotnē, % <i>Amount of extract in media, %</i>	I	II	III	IV
7 dienas / 7 days					
EtOH	0,1 %	1,3±0,2*	0,4±0,1	0,6±0,1	1,0±0,2*
NaOH	1,5 %	1,7±0,2*	0,3	0,4±0,1	0,4*
Kontrole / Control		3,0±0,6	0,4±0,1	1,1±0,4	1,7±0,2
10 dienas / 10 days					
EtOH	0,1 %	2,4±0,4	1,0±0,3	1,3±0,4	2,1±0,3*
NaOH	1,5 %	3,5±0,4	0,3*	0,6±0,2*	1,4±0,2*
Kontrole / Control		4,5±1,1	0,9±0,3	2,4±0,9	3,3±0,4
14 dienas / 14 days					
EtOH	0,1 %	4,3±0,5	2,3±0,9	2,7±1,0	4,1±0,3
NaOH	1,5 %	7,0±0,7	0,6±0,2*	1,2±0,4	2,8±0,4*
Kontrole / Control		6,4±1,9	1,9±0,6	3,3±1,3	4,9±0,6
22 dienas / 22 days					
EtOH	0,1 %	9,5±1,2	5,9±6,5	5,6±5,7	9,9±2,0
NaOH	1,5 %	16,8±4,0	2,0±3,3	3,6±3,0	5,6±3,5*
Kontrole / Control		7,7±6,7	3,2±3,3	7,6±9,1	9,8±3,4

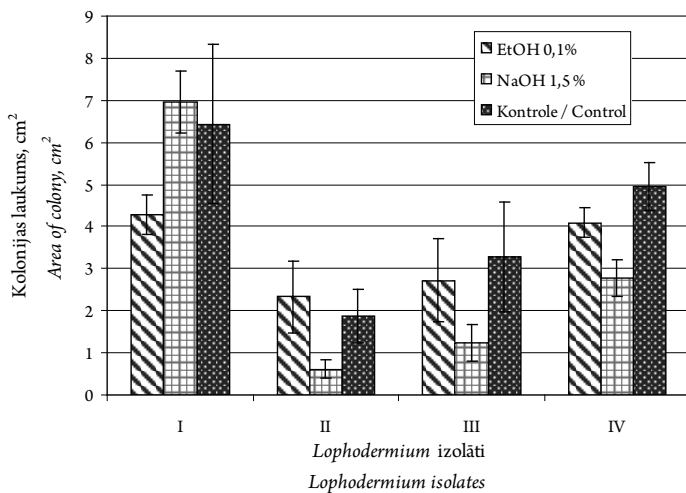
Apzīmējumi / Legend:

* būtiski zemāki augšanas rādītāji, salīdzinot ar kontroles variantu ($t > t_{0,05}$) / significantly lower parameters of colony growth compared to control ($t > t_{0,05}$).



2. attēls. Ekstraktu iedarbība uz dažādu *L. seditiosum* izolātu augšanu 10 dienas pēc eksperimenta ierīkošanas.

Figure 2. Effect of bark extracts on growth of different *L. seditiosum* isolates 10 days after experiment initiation.



3. attēls. Ekstraktu iedarbība uz dažādu *L. seditiosum* izolātu augšanu 14 dienas pēc eksperimenta ierīkošanas.

Figure 3. Effect of bark extracts on growth of different *L. seditiosum* isolates 14 days after experiment initiation.

iedarbīgumu, salīdzinot ar citu skuju koku mizas ekstraktiem (Alfredsen *et al.*, 2008), mūsu pētījumā tieši priedes mizas ekstrakti visvairāk kavēja *Lophodermium seditiosum* augšanu. Tas, iespējams, saistīts ar saimniekorganisma ietekmi, ko savā pētījumā apraksta G. Alfredsen u.c. (2008), konstatējot tieši skuju koku mizas ekstraktu efektivitāti pret skuju koku patogēniem. Neskatoties uz lielāku kopējo fenolu saturu egles mizas ekstraktos, salīdzinot ar priedes mizas ekstraktiem, tie nemazināja vai pat stimulēja sēnes augšanu, kas apstiprina arī citu pētnieku novēroto, ka kopējais fenolu saturs ekstraktā nav tieši saistīts ar ekstrakta antifungālo aktivitāti (Bärlocher, Oertli, 1978).

Etanola ekstraktu inhibējošo ietekmi uz *Lophodermium* augšanu var veicināt tajos sastopamie fenolu savienojumi – stilbēni, kas citu autoru eksperimentos ar *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum* un *Monilinia aucupariae* parādīja antifungālu iedarbību (Aslam *et al.*, 2009). Stilbēnu grupas savienojumiem konstatēts micēlija augšanu kavējošs efekts arī eksperimentos ar skuju koku patogēnu *Sphaeropsis sapinea*, kas inficē priežu skuju (Blodgett, Stanosz, 1997). Taču priedes mizas etanola ekstraktu augstāko koncentrāciju stimulējošā ietekme uz *Lophodermium* augšanu, varētu būt saistīta ar to, ka, izmantojot šo metodi, iespējams ekstrahēt arī ogļhidrātus, kas var būt sēņu barības bāze.

Ar sārmainiem šķīdumiem no mizām var ekstrahēt tādus lielmolekulārus fenolsavienojumus kā kondensētos tanīnus (Fradinho *et al.*, 2002), kuru inhibējošā

ietekme uz celulāzi ir aprakstīta literatūrā (Mandels, Reese, 1965). Tā kā *Lophodermium* ģints sēņu sugas barības vielu uzņemšanai aktīvi šķeļ celulozi (Boberg *et al.*, 2011), iespējams tieši celulāzes inhibēšana izraisījusi sēnes augšanas samazināšanos barotnēs ar šiem ekstraktiem. Taču, tā kā ar nātrija sārma ūdens šķīdumu iegūtajā priedes mizas ekstraktā bija salīdzinoši zems fenolu savienojumu saturs (1. tabula), šo ekstraktu kavējošā ietekme uz sēņu augšanu varētu būt saistīta arī ar ekstrakta bāzisko vai neitrālo vides pH, kas nav optimāls *Lophodermium* attīstībai (optimāls pH *Lophodermium* kultūru veģetatīvai augšanai ir starp 4 un 6 (Martinsson 1979)).

N. Kokalis-Burelle un R. Rodriguez-Kabana (1994) konstatējuši, ka sēņu augšanu vairāk kavē sārmainie ekstrakti nekā neitrālie un skābju ekstrakti. Tas arī izskaidro augstākas ekstrakta inhibēšanas spējas pie lielākas ekstrakta koncentrācijas barotnē. Ar nātrija sārma ūdens šķīdumu iegūto ekstraktu lietošana lauka apstākļos, domājams, arī nebūtu tik efektīva dēļ nepieciešamās šo ekstraktu ļoti augstās koncentrācijas apstrādes šķīdumā.

Dažādu *Lophodermium* izolātu atšķirīgās augšanas tendences eksperimentālajās barotnēs, iespējams, skaidrojamas ar izolātu atšķirīgo vecumu, agresivitāti vai enzimatisko aktivitāti. T. Osono un D. Hirose (2011) savos pētījumos, novērtējot dažādu *Lophodermium pinastri* izolātu spēju noārdīt lignīnu atmirušās priežu (*Pinus thunbergii* un *P. densiflora*) skuju, arī konstatējuši būtiskas atšķirības starp analizētajiem izolātiem.

Turpmākajos pētījumos paredzēts nopārbaudīt labākos ekstrakta variantus lauka teikt ekstraktu spēju inhibēt sēnes augšanu, apstākļos. lietojot tos dažādā koncentrācijā, kā arī

Secinājumi

1. Pārbaudot dažādi ekstrahētus priedes un egles mizas ekstraktus, priežu brūnās skujbīres izraisītāja *Lophodermium seditiosum* augšanu būtiski kavēja tikai priedes mizas ekstrakti.
2. Ieteicamā metode, lai pārbaudītu skuju koku mizas ekstraktu ietekmi uz *Lophodermium seditiosum in vitro* eksperimentos, ir filtrpapīru metode.
3. *Lophodermium seditiosum* augšanu visvairāk kavēja priedes mizas nātrija sārma ūdens šķīduma ekstrakts un priedes mizas etanola ekstrakts.
4. *Lophodermium seditiosum* izolātu atšķirīgā augšanas intensitāte ietekmēja analizēto ekstraktu iedarbiguma efektivitāti.

Pateicība: pētījumi veikti ERAF projekta Nr. 2010/0249/2DP/2.1.1.1.0/10/APIA/VIAA/168 "Videi draudzīgu augu valsts izcelsmes augu aizsardzības līdzekļu izstrāde uz skuju koku biomasas ekstraktvielu bāzes" ietvaros. Izsakām pateicību Dr. Rein Drenkhan par konsultācijām un Valsts augu aizsardzības dienesta Nacionālajai fitosanitārajai laboratorijai par *Lophodermium* kultūrām.

Literatūra

- Alfredsen, G., Solheim, H., Slimestad, R. (2008). Antifungal effect of bark extracts from some European tree species. *European Journal of Forest Research*, 127, 387-393.
- Aslam, S. N., Stevenson, P. C., Kokubun, T., Hall, D. R. (2009). Antibacterial and antifungal activity of cicerfuran and related 2-arylbenzofurans and stilbenes. *Microbiological Research* 164, 191-195.
- Bärlocher, F., Oertli, J. J. (1978). Inhibitors of Aquatic Hyphomycetes in Dead Conifer Needles. *Mycologia*, 70 (5), 964-974.
- Blodgett, J. T., Stanosz, G. R. (1997). Differential Inhibition of *Sphaeropsis sapinea* Morphotypes by a Phenolic Compound and Several Monoterpenes of Red Pine. *Phytopathology*, 87(6), 606- 609.
- Boberg, J. B., Ihrmark, K., Lindahl, B. D. (2011). Decomposing capacity of fungi commonly detected in *Pinus sylvestris* needle litter. *Fungal ecology* 4, 110-114.
- Evensen, P. C., Solheim, H., Hoiland, K., Stenersen, J. (2000). Induced resistance of Norway spruce, variation of phenolic compounds and their effects on fungal pathogens. *For. Path.* 30(2000), 97-108.
- Fradinho, D. M., Pascoal Neto, C., Evtuguin, D., Jorge, F. C., Irle, M. A., Gil, M. H., Pedrosa de Jesus, J. (2002). Chemical characterisation of bark and of alkaline bark

- extracts from maritime pine grown in Portugal. *Industrial Crops and Products* 16, 23-32.
- Franceschi, V. R., Krokene, P., Christiansen, E., Krekling, T.** (2005). Anatomical and chemical defenses of conifer bark against bark beetles and other pests. *New Phytologist*, 167, 353-376.
- Hanso, M., Drenkhan, R.** (2007). Retrospective Analysis of *Lophodermium seditiosum* Epidemics in Estonia *Acta Silv. Lign. Hung., Spec. Edition* (2007), 31-45.
- Hart, J. H., Shrimpton, D. M.** (1979). Role of stilbenes in resistance of wood to decay. *Phytopathology*, 69(10), 1138-1143.
- Harun, J., Labosky, P.** (2007). Antitermitic and Antifungal Properties of Selected Bark Extractives. *Wood and Fiber Science* 17(3), 327-335.
- Jansons, Ā., Neimane, U., Baumanis, I.** (2008). Parastās priedes skujbīres rezistence un tās paaugstināšanas iespējas. *Mežzinātne*, 18(51): 3-18.
- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., Heinonen M.** (1999). Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3954-3962.
- Kokalis-Burelle, N., Rodríguez-Kabana, R.** (1994). Effects of pine bark extracts and pine bark powder on fungal pathogens, soil enzyme-activity, and microbial – populations. *Biological Control* 4(3), 269-276.
- Klepzig, K. D., Smalley, E. B., Raffa, K. F.** (1996). Combined chemical defenses against an insect-fungal complex. *Journal of Chemical Ecology* 22: 1367-1388.
- Mandels, M., Reese, E. T.** (1965). Inhibition of Cellulases. *Annual Review of Phytopathology* 3, 85-102.
- Margeviča, I., Čūdere, R., Būmane, D., Krupenko, L., Prekele, A.** (2012). Latvijas Republikā reģistrēto augu aizsardzības līdzekļu saraksts. 2012. Valsts augu aizsardzības dienests, Rīga, 292 lpp.
- Martinsson, O.** (1979). Testing Scots Pine for Resistance to *Lophodermium* Needle Cast. *Studia Forestalia Suecica*, 150.
- Mechikova, G. Ya., Stepanova, T. A., Zaguzova, E. V.** (2007). Quantitative determination of total phenols in strawberry leaves. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 41(2), 97-100.
- Montes-Belmont, R., Prados-Ligero, A. M.** (2006). Influence of Plant Extracts on *Sclerotium cepivorum* Development. *Plant Pathology Journal* 5(3): 373-377.
- Mori, M., Aoyama, M., Doi, S., Kanetoshi, A., Hayashi, T.** (1995). Antifungal activity of bark extracts of conifers. *Holz als Roh- und Werkstoff*, 53(2), 81-82.
- Mori, M., Aoyama, M., Doi, S., Kanetoshi, A., Hayashi, T.** (1997). Antifungal activity of bark extracts of deciduous trees. *Holz als Roh- und Werkstoff*, 55, 130-132.
- Nemli, G., Gezer, E. D., Yildiz, S., Temiz, A., Aydin, A.** (2006). Evaluation of the mechanical, physical properties and decay resistance of particleboard made from

particles impregnated with *Pinus brutia* bark extractives. *Bioresource Technology*, 97 (16), 2059-2064.

- Nerg, A., Kainulainen, P., Vuorinen, M., Hanso, M., Holopainen, J. K., Kurkela, T.** (1994). Seasonal and geographical variation of terpenes, resin acids and total phenolics in nursery grown seedlings of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *New Phytologist* 128(4), 703-713.
- Ortiz-García, S., Gernandt, D. S., Stone, J. K., Johnston, P. R., Chapela, I. H., Salas-Lizana, R., Alvarez-Buylla, E. R.** (2003). Phylogenetics of *Lophodermium* from pine. *Mycologia* 95(5), 846-859.
- Osono, T., Hirose, D.** (2011). Colonization and lignin decomposition of pine needle litter by *Lophodermium pinastri*. *Forest Pathology*, 41(2), 156-162.
- Rai, M., Mares, D.** (2003). *Plant Derived Antimycotics. Current trends and Future prospects.* Haworth Press. Binghamton, N.Y., USA., p. 587.
- Shrimpton, D. M., Whitney, H. S.** (1968). Inhibition of growth of blue stain fungi by wood extractives. *Canadian Journal of Botany*, 46(6): 757-761.