

Bērza koksnes iekrāsojuma izpēte molekulāri ģenētiskā līmenī

Žanis Bacāns, Krišs Bitenieks, Anna Korica,
Ilze Veinberga, Imants Baumanis, Dainis Ruņģis

LATVIJAS FINIERIS

AKCIJU SABIEDRĪBA



EIROPAS REĢIONĀLĀS
ATTĪSTĪBAS FONDS



EIROPAS SAVIENĪBA

IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ

- ☐ Noskaidrot bērza koksnes iekrāsojuma saistību ar konkrētām sēņu sugām
- ☐ Izpētīt kopējo sēņu kvantitātes un daudzveidības saistību ar bērzu koksnes iekrāsojumu
- ☐ Izpētīt bērzu koksnes iekrāsojumu dažādos Latvijas reģionos, meža tipos, koku vecumos un ģimenēs

Komanda

Imants Baumanis

Vadošais pētnieks,
Dr.silv.



Dainis Edgars Ruņģis

Vadošais pētnieks, Dr.biol.

Krišs Bitenieks

Maģistra students



Ilze Veinberga

Vadošā pētniece,
Dr.chem.



Anna Korica

Zinātniskais asistents,
Mg.biol.



Žanis Bacāns

SIA Latvijas Finieris «Mežs» valdes priekšdēdētājs

- ❑ Mikrobioloģiskās metodes - sēnes audzēšana uz barotnes, mikroskopiskā identifikācija (sadarbībā ar doc. V. Nikolajevu, LU)
- ❑ Koksnes (klucīšu un augošu koku) mākslīgā apstrāde ar dažādām sēņu sugu tīrkultūrām

- ❑ Molekulāri ģenētiskās metodes – kopējo sēņu DNS
izpēte – sekvenēšana, daudzveidība un kvantitēšana
- ❑ Sekvenēšana – sēņu identificēšana, DGGE
- ❑ Daudzveidība – cik daudz dažādas sēnes atrodas
paraugā (bez identificēšanas), DGGE
- ❑ Kvantitēšana – kopējo sēņu daudzums (visas sēņu
sugas)

- ☐ Vairums paraugi ievākti no pieaugušām bērzu audzēm ciršanas laikā (galvenokārt no Kurzemes un Latgales)
- ☐ Arī analizēti 14 g.v. koki Rembates stādījumā (33 ģimenes, sadarbībā ar LVMI «Silava» selekcionāru A. Gaili) (kopšanas cirtes laikā)
- ☐ Bērzu stādu audzēšanai, sēklas iegūtas no Kalsnavas zemlēves bērzu plantācijas
- ☐ Dzīvo koku mākslīgai inficēšanai izmantoti bērzi no privāta īpašuma «Kārlēni», Īkšķiles novadā pie Tinūžiem



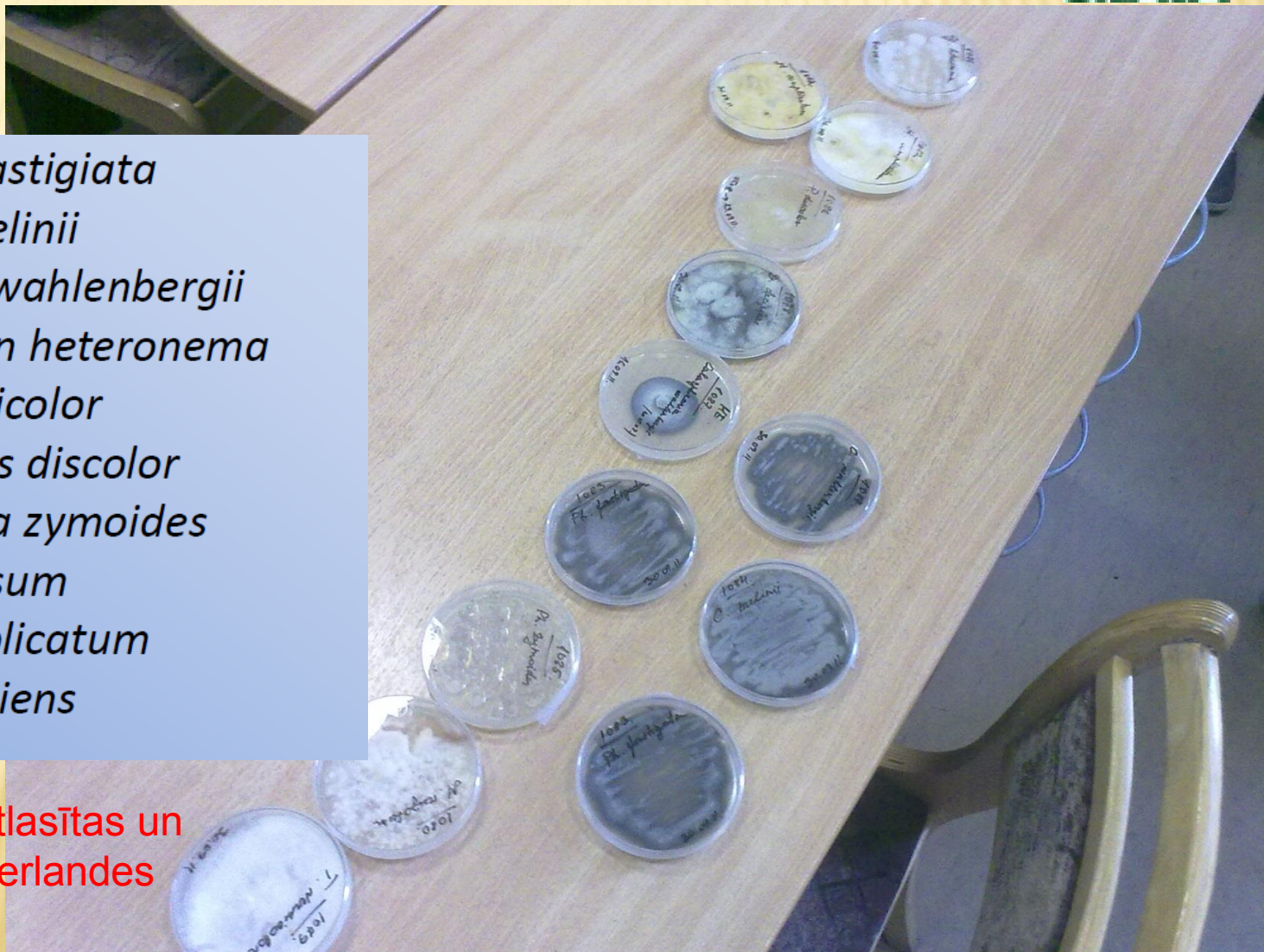
Materiāli



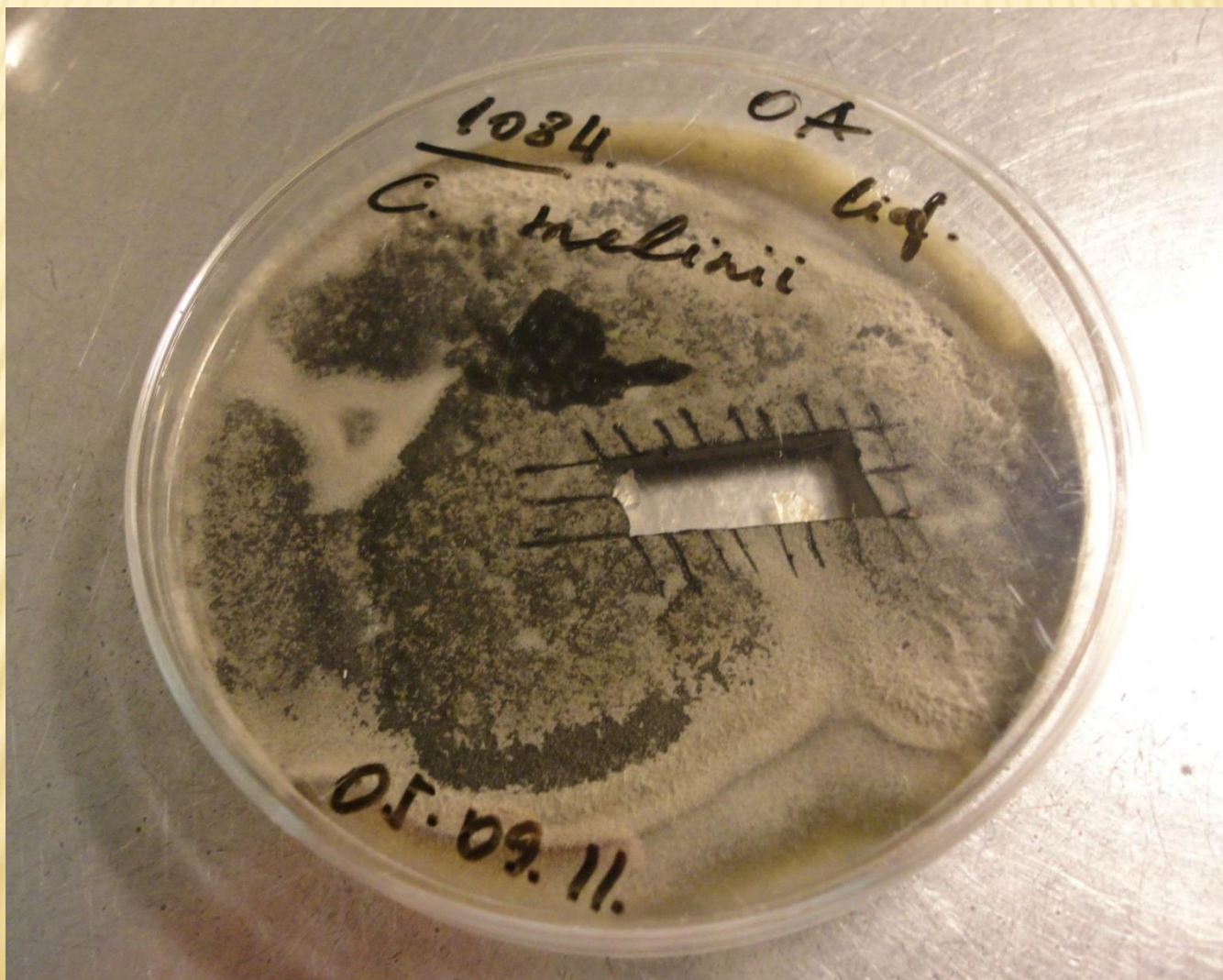
- ❑ Iekrāsoti un neiekrāsoti koksnes paraugi novietoti uz barotnēm, novērota sēņu daudzveidība, un izdalītas tīrkultūras
- ❑ No literatūras identificētas sēņu sugas, kuras ir agrāk atrastas iekrāsotā koksnē, un pasūtītas sēņu tīrkultūras no Sēņu biodiversitātes centra, Nīderlandē

- *Phialophora fastigiata*
- *Cadophora melinii*
- *Calosphaeria wahlenbergii*
- *Cylindrocarpon heteronema*
- *Trametes versicolor*
- *Potebniamyces discolor*
- *Phaeomoniella zymoides*
- *Stereum rugosum*
- *Stereum complicatum*
- *Daldinia decipiens*

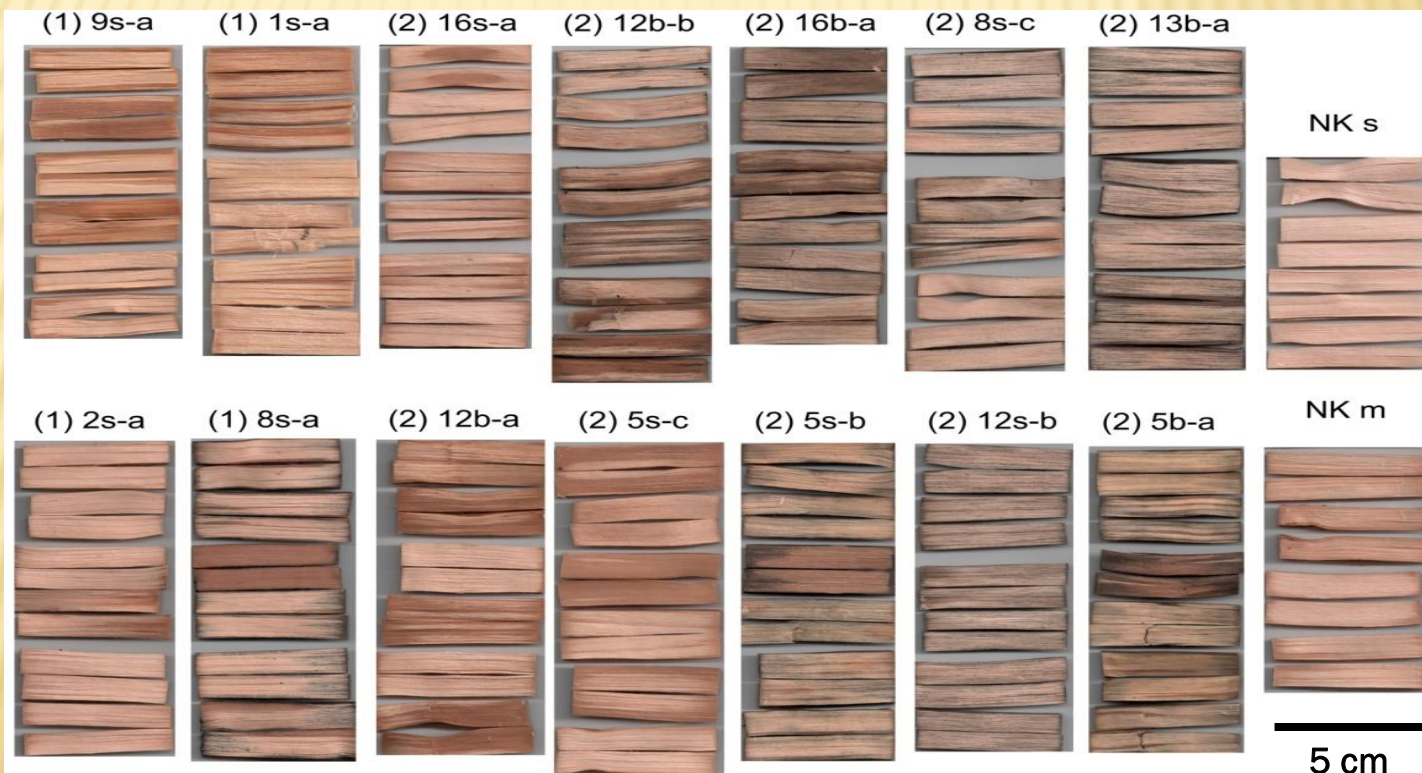
Pēc literatūras atlasītas un
pasūtītas no Nīderlandes



Materiāli



- visas analizētās sēņu tīrkulturas izraisīja koksnes iekrāsojumu

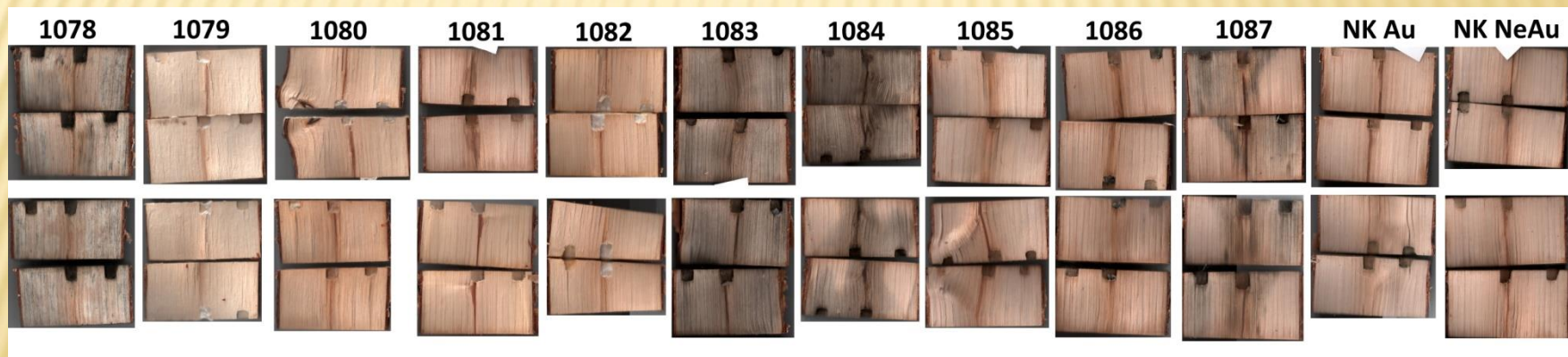


Rezultāti:

- visintensīvāko koksnes iekrāsojumu izraisīja

Nr. 1083 – *Phialophora fastigiata* un

Nr. 1084 – *Cadophora melinii*



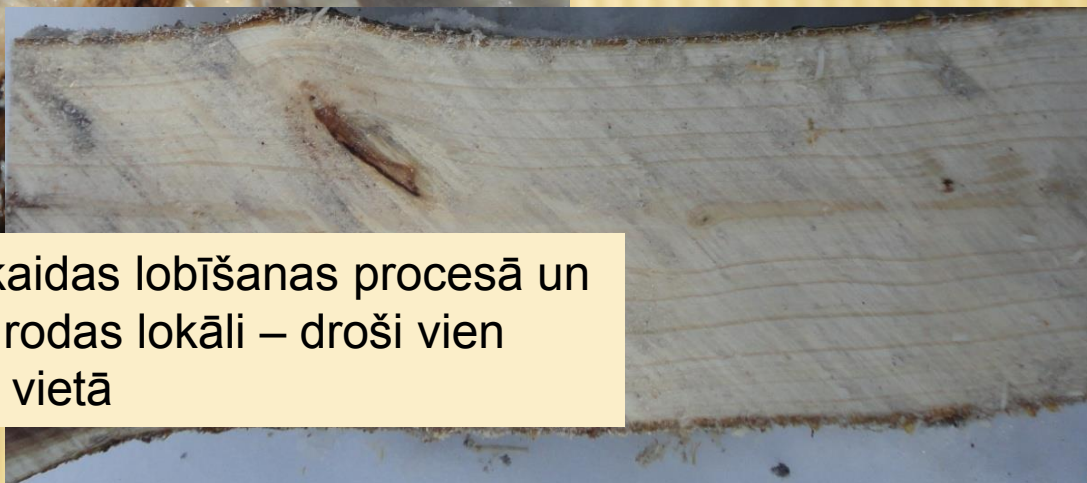
DARBA GAITA – AUGOŠU KOKU INFICĒŠANA



3 bērzu koki tika
mākslīgi inficēti
ar 10 dažādām
sēņu tīrkultūrām.
Pēc 6 mēnešiem,
kokus nozāģēja,
un analizēja
iekrāsojumu



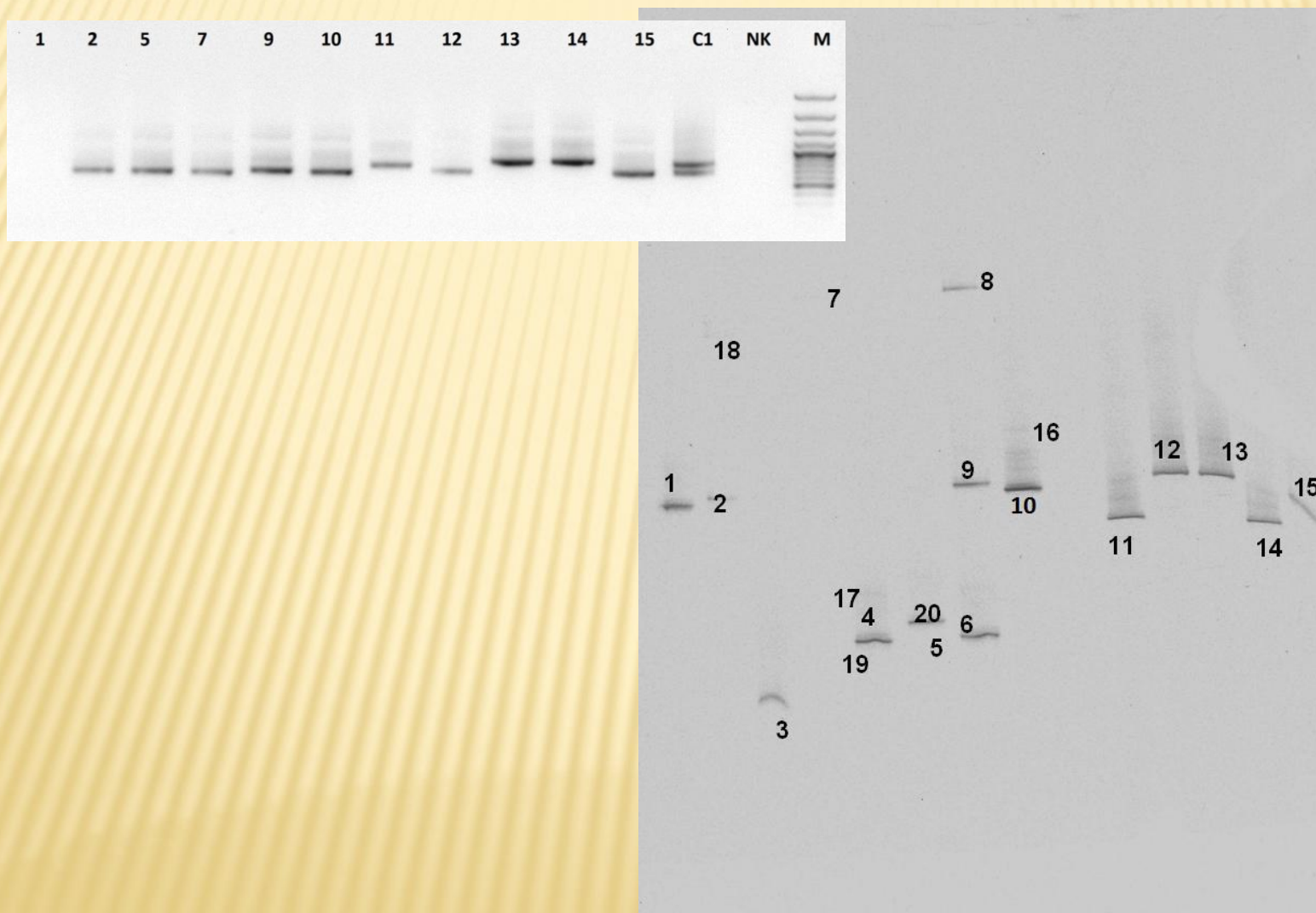




«Lignumā» tika veikta analīze skaidas lobīšanas procesā un konstatēts, ka iekrāsojums bieži rodas lokāli – droši vien kādreizējās zaru un ievainojuma vietā

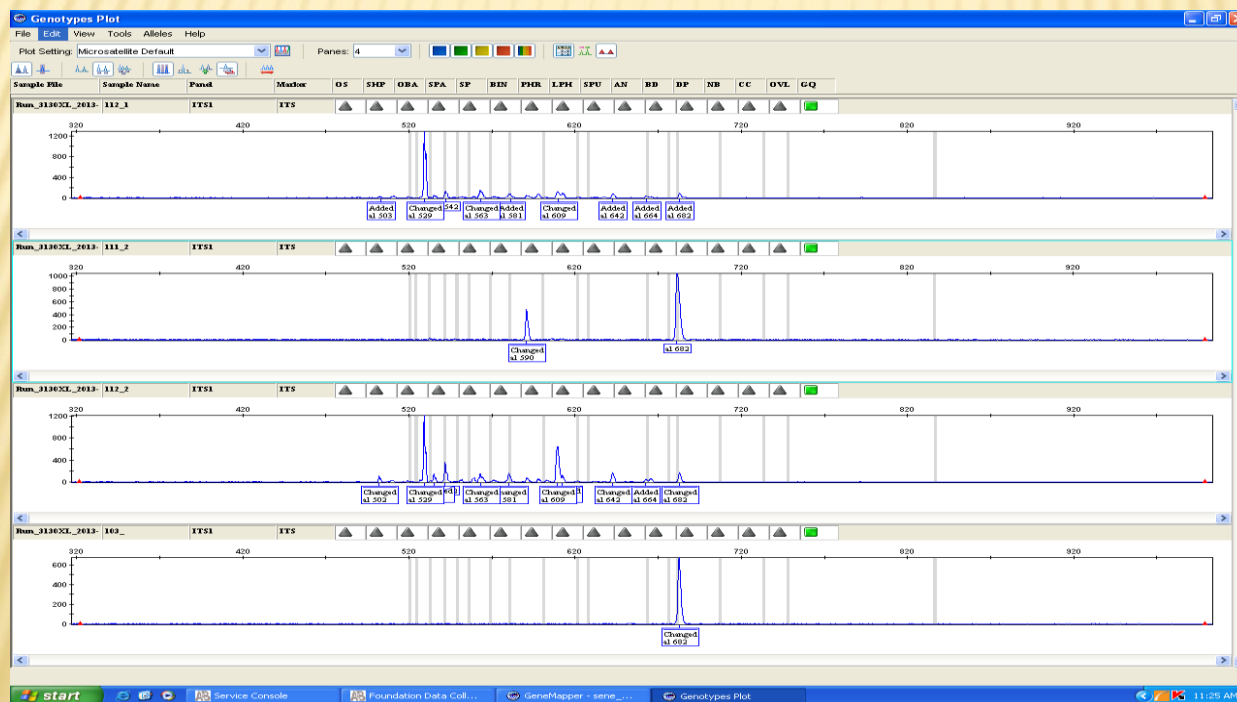
- ❑ Sēņu identifikācija ar molekulārām metodēm
- ❑ Sekvenēšana un salīdzināšana ar datubāzēm
 - ❑ Tika identificētas *Cadophora melinii* un *Stereum rugosum* sugas, kuras aprakstītas literatūrā, un arī izraisīja koksnes iekrāsojumu (uz klucišiem jau pēc 2 nedēļām)
- ❑ DGGE – atrastas un identificētas vairākas sēnes iekrāsotā koksne (K. Bitenieks aizstāvēs maģistra darbu 2014.g.

Metodes - DGGE

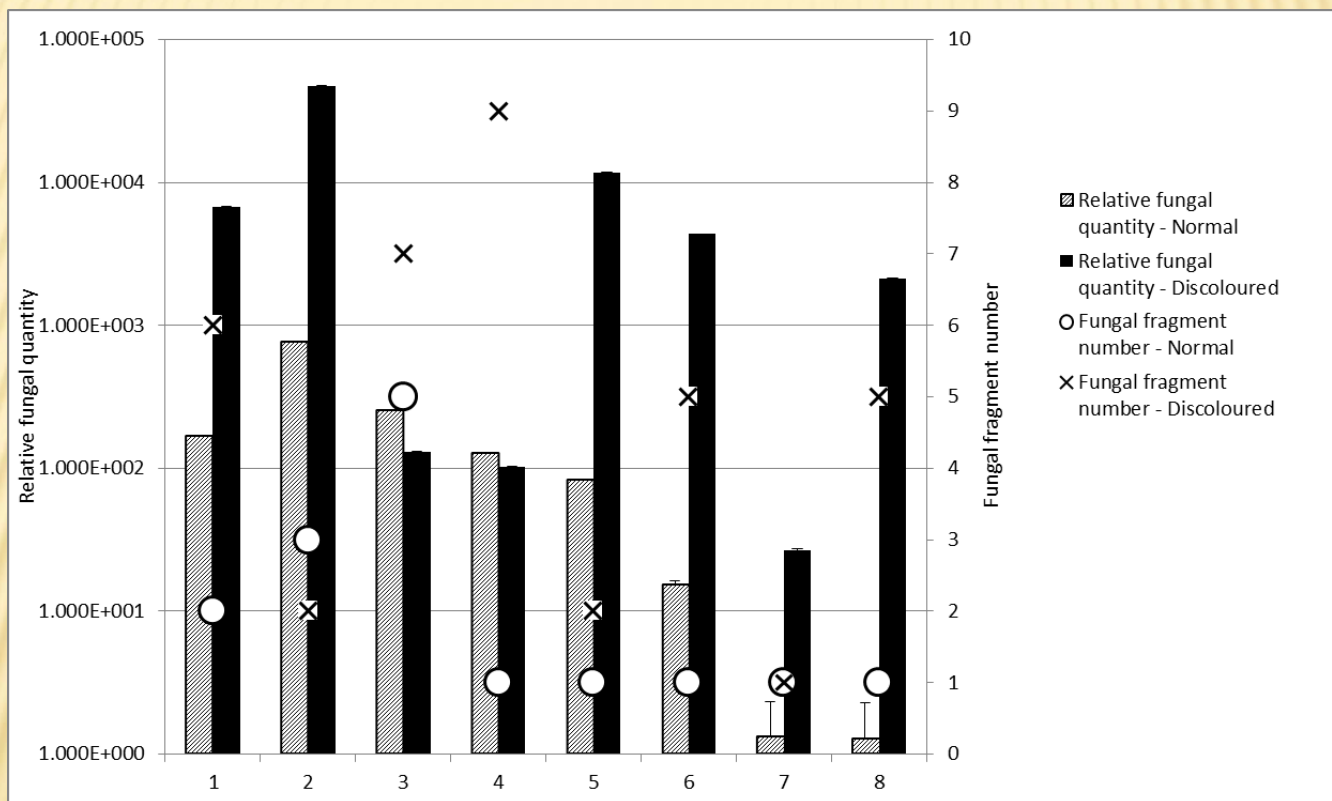


- ☐ Netika identificēta dominējoša sēņu suga, kura atrodas visos iekrāsotos koksnes paraugos
- ☐ Novērots, ka vairāk sēnes izolētas no iekrāsotas koksnes (daudzveidībā un kvantitātē)
- ☐ Šādi rezultāti iegūti ar visām izmantotajām metodēm (mikrobioloģiskām un molekulārām)
- ☐ Noskaidrots, ka koksnes iekrāsojumu var izraisīt dažādas sēņu sugas

- ❑ Tālāk tika pētīta kopējā sēņu daudzveidība un kvantitāte ar molekulāri ģenētiskām metodēm

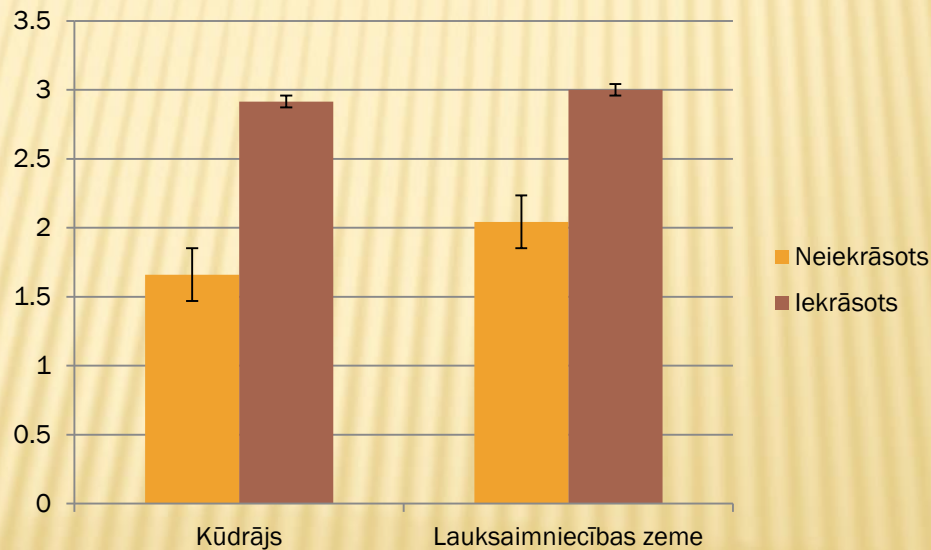


Jo vairāk
fragmentu, jo
lielāka sēņu
sugu
daudzveidība

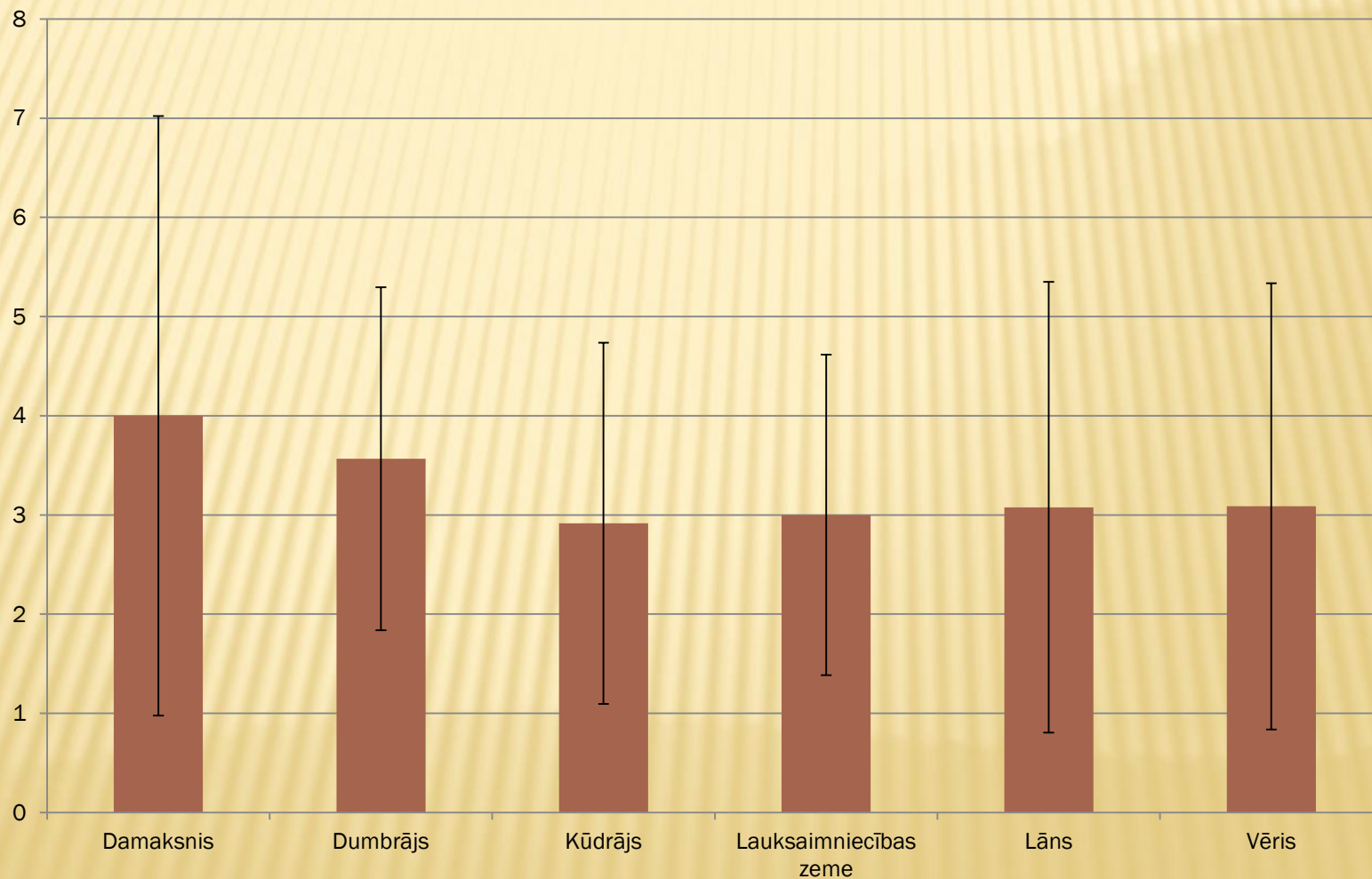


Atrasts, ka ir 20-1680 reizes vairāk sēņu iekrāsotā koksnē,
un ka arī tajā ir lielāka sugu daudzveidība

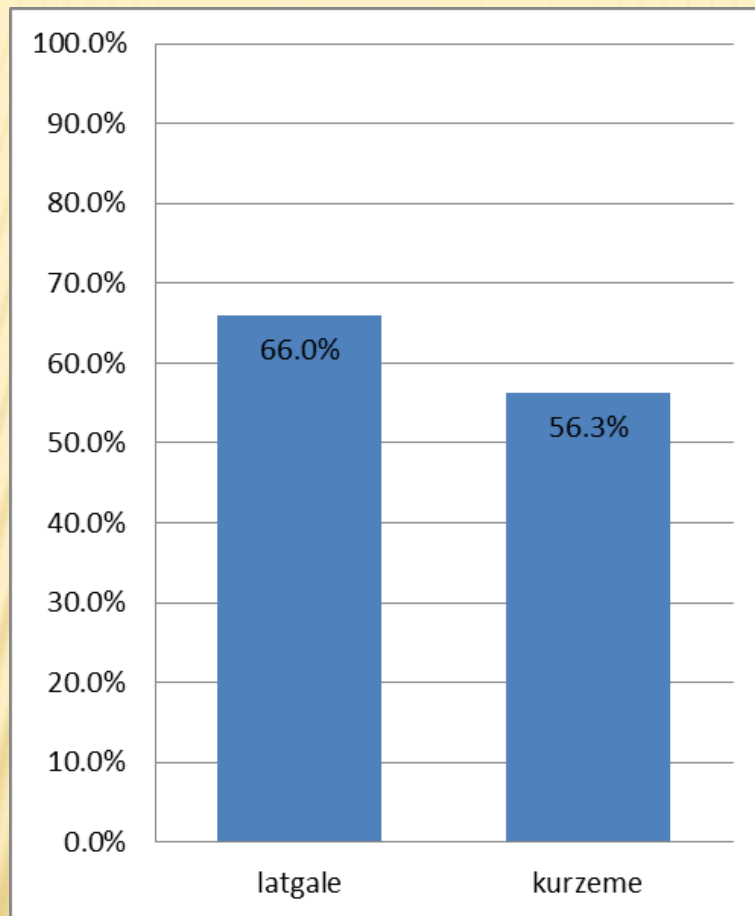
- Paraugi ievākti no dažādiem meža tiptiem, un kopējā sēņu daudzveidība noteikta



Kopējā sēņu daudzveidība iekrāsotā koksņē dažādos meža tipos



Koksnes iekrāsojuma sastopamība



Bērzu koku ar iekrāсотu koksni īpatsvars Latgalē un Kurzemē

- ☐ Iepriekš prezentātie dati iegūti no pieaugušiem bērzu kokiem
- ☐ Literatūrā arī atrodami pētījumi tikai par pieaugušiem kokiem
- ☐ Kādā vecumā var detektēt sēnes bērzu koksnē?
- ☐ Kādā vecumā parādās koksnes iekrāsojums?

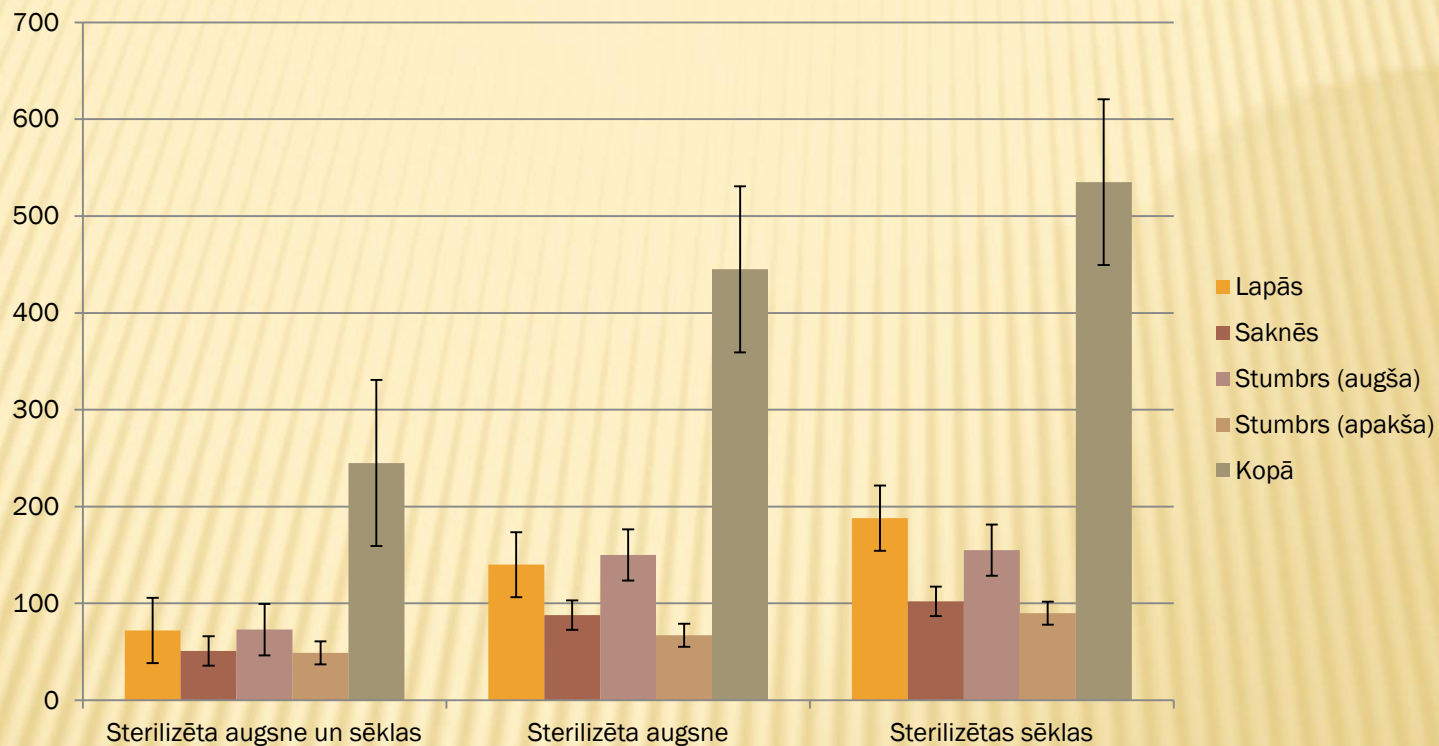
- ☐ 2011.g. tika ievākti 1 un 2 g.v. bērzu stādu koksnes paraugi no stādaudzētavas «Zābaki»
- ☐ Analizēti vizuāli un ar molekulārām metodēm
- ☐ 12 stādos (no 18) tika atrastas sēnes
- ☐ Vizuāli nav manāms koksnes iekrāsojums



Eksperiments stādaudzētavā Zābaki, lai noskaidrotu, cik agri var noteikt sēnes klātbūtni berzu stādos. Tika sterilizētas bērza sēklas un kūdra, un izaudzēti stādi un veikta kopējo sēņu daudzveidības analīze.

- ☐ Sēklu partija no Kalsnavas zemplēves bērzu plantācijas
- ☐ Sēklas un augsne sterilizēta un stādi audzēti stādaudzētavā «Zābaki»
- ☐ Pēc gada, ievākti stādi, nomazgāti, no ārpusēs sterilizēti, un analizēta sēņu sugu daudzveidība (kopā 90 paraugi)
- ☐ Analizētas lapas, saknes, stumbrs (augš- un apakšdaļa)
- ☐ Koksnes iekrāsojumu nebija iespējams novērtēt vizuāli, jo stādi bija pārāk maziņi

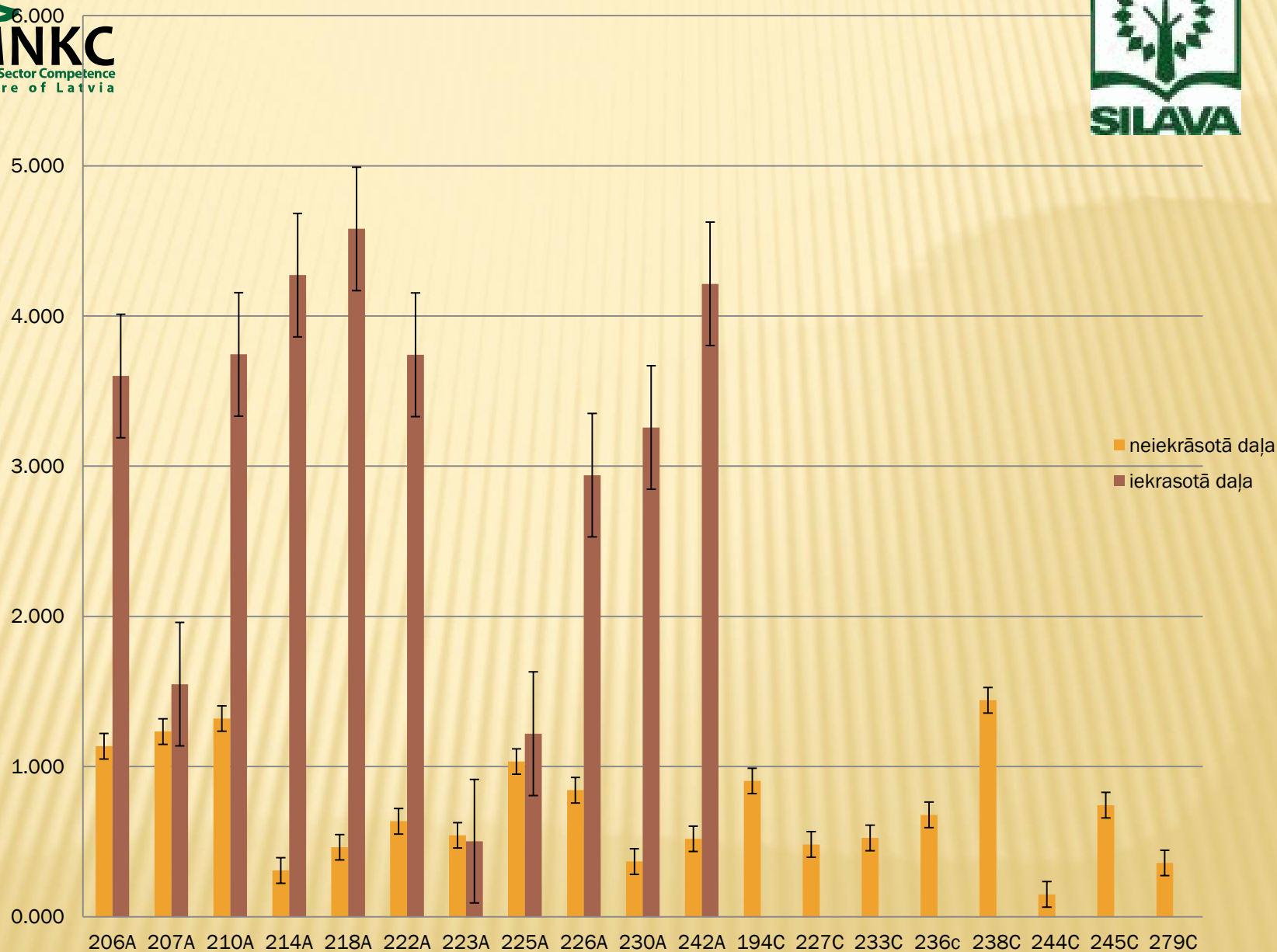
Rezultāti – sēņu kopējā daudzveidība



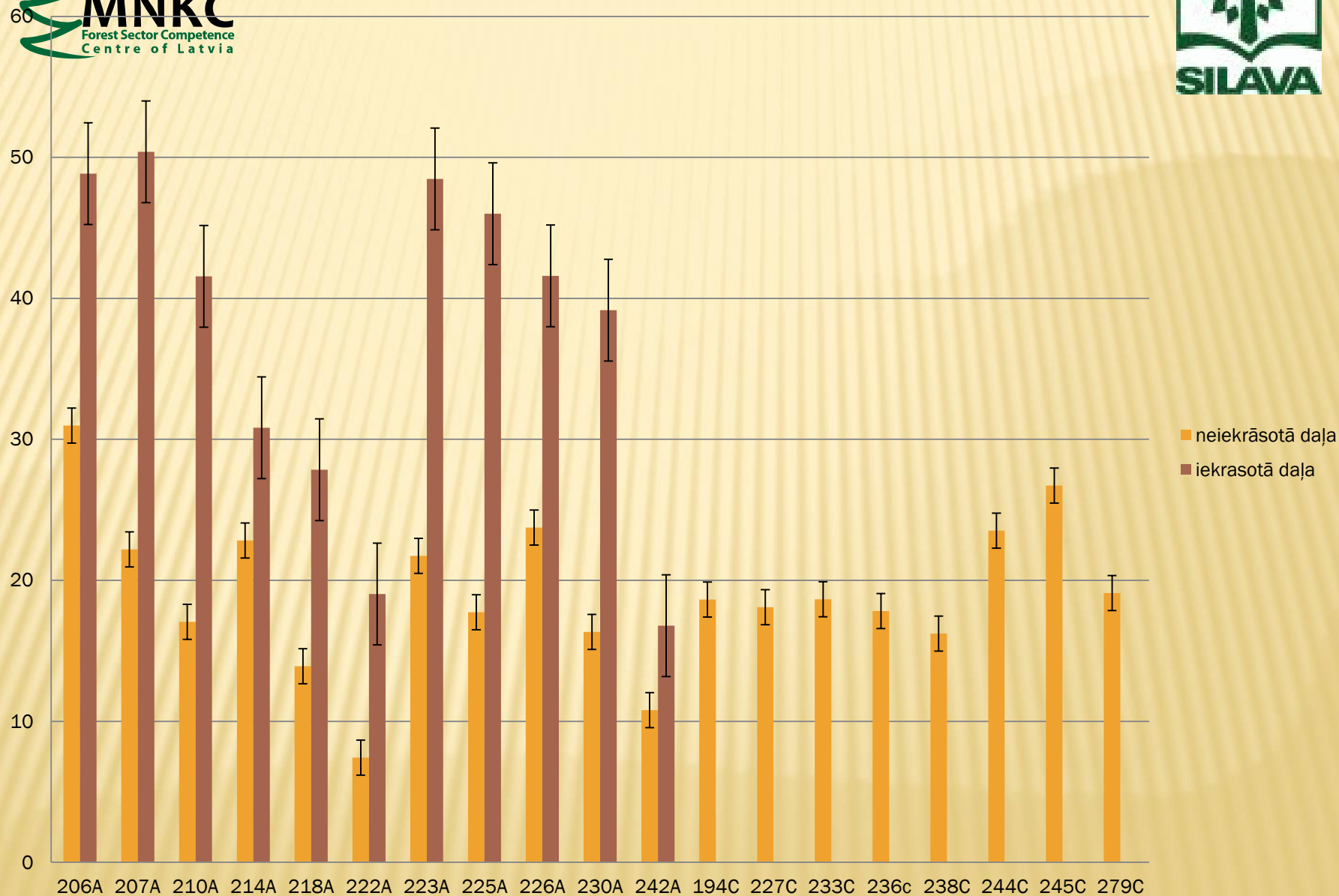
Var secināt, ka lielākā daļa sēņu atrodas vidē (augsnē u.c.), un ka tās nav pārnestas sēklās. Lielākā sēņu daudzveidība atrasta stādu virszemes daļā (lapās un stumbra augšpusē)

- ❑ Kopumā, iegūtie dati liecina, ka bērzu koksnes iekrāsojums nav saistīts ar vienu sēņu sugu, bet varētu būt koka fizioloģiskā reakcija uz mikroorganisma klātbūtni
- ❑ Atrasts, ka kopējo fenola daudzums, kā arī koksnes mitrums paaugstināts iekrāsotā koksne

Fenola savienojumu daudzums (%) bojātā un nebojātā bērznā



Mitruma daudzums (%) bojātā un nebojātā bērznā

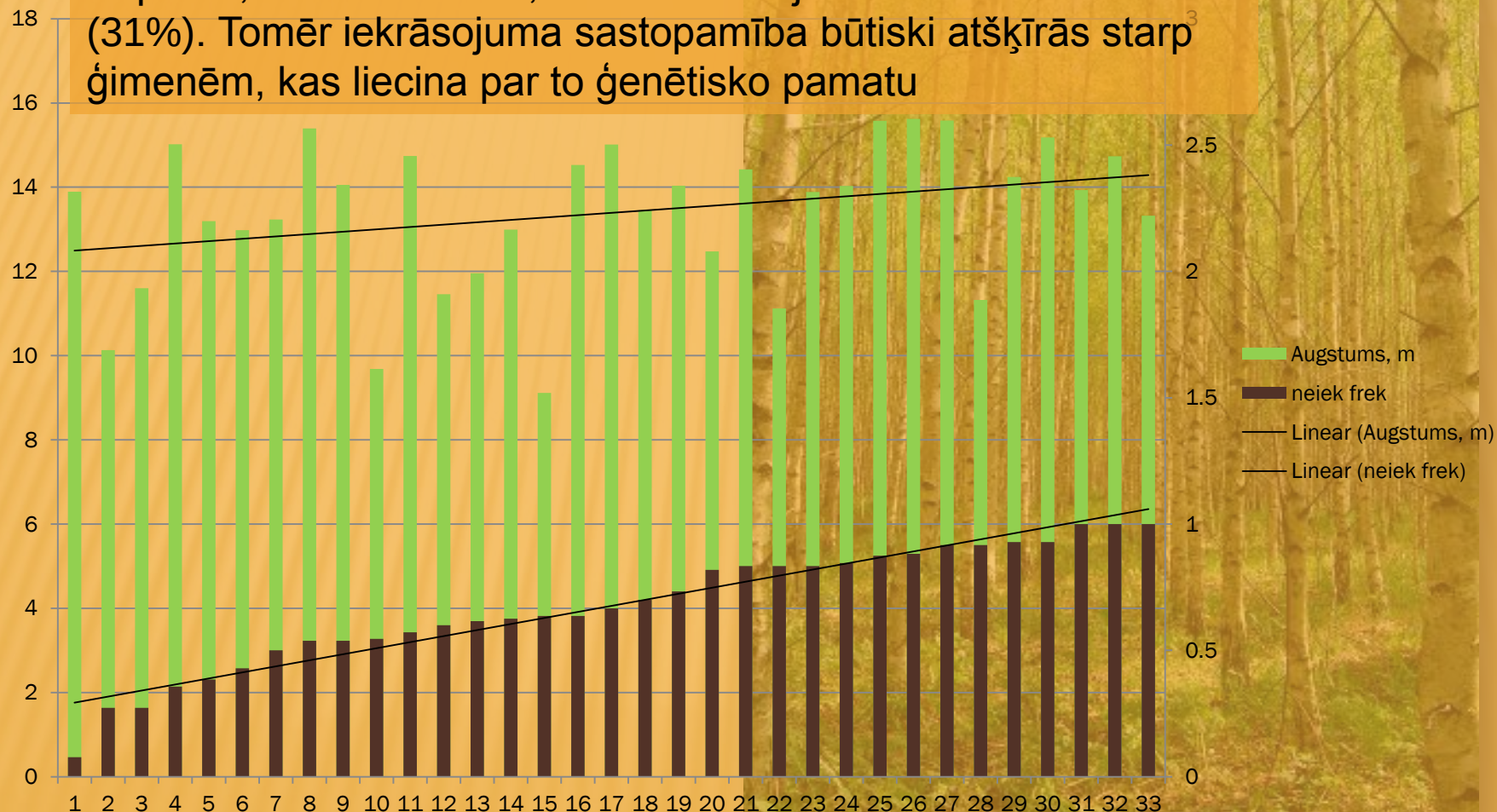


- ☐ Nebija zināms, kādā vecumā parādās koksnes iekrāsojums
 - ☐ Koksnes iekrāsojums analizēts 14.g.v. bērzu kokos kopšanas cirtes laikā
 - ☐ Rembates stādījums, 33 ģimenes, vidēji 12.7 indivīdi no ģimenes
- (sadarbībā ar LVMI «Silava» selekcionāru A. Gaili)





Kopumā, no 419 kokiem, 131 kokam bija iekrāsota koksne (31%). Tomēr iekrāsojuma sastopamība būtiski atšķīrās starp ģimenēm, kas liecina par to ģenētisko pamatu



- ☐ Visas izpētītās sēņu tīrkultūras izraisīja bērzu koksnes iekrāsojumu klucīšos un augošos kokos
- ☐ Koksnes iekrāsojums izplatās >90cm 6 mēnešu laikā
- ☐ 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 mikroorganisma klātbūtni
- ☐ Starp bērzu ģimenēm atrasta liela atšķirība koksnes iekrāsojuma sastopamībā, kas liecina par ģenētisko pamatu šai īpašībai
- ☐ Turpmākajos pētījumos varētu analizēt atsevišķus fenolu savienojums un to atšķirību starp bērzu ģimenēm
- ☐ Nākotnē būtu iespējams atlasīt bērzu materiālu/ģimenes, kurām ir zemāka koksnes iekrāsošanas sastopamība

Dalība konferencēs

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.** AdapCar un IUFRO (WP 2.02.00) konference "Adaptācijas un pielāgošanās ģenētiskie aspekti meža veselības, koksnes kvalitātes un biomasas ražošanas kontekstā", 2012. g. 3.-5. oktobris, Rīgā, Latvijā (publicēts 2012. Mežzinātne 25(58): 180)

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.** 1st Congress of Baltic Microbiologists, Rīga, Latvija, 2012.g. 31. oktobris.- 4. novembris. (posteris)

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

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" p. 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)



PALDIES !!!