
Metodikas aprobācija *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. izraisītās pigmentācijas novērtēšanai parastās priedes koksnē

Vilnis Šķipars^{1*}, Tālis Gaitnieks¹, Dainis Edgars Ruņģis¹

Šķipars, V., Gaitnieks, T., Ruņģis, D. E. (2011). Evaluation of pigmentation caused by different *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. strains after under-bark inoculation of Scots pine. *Mežzinātne* 24(57): 65–77.

Kopsavilkums. Lai novērtētu iespējamās atšķirības individuālu koku rezistencē pret *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. un dažādu *H. annosum* izolātu agresivitāti pret saimniekorganismu, deviņi parastās priedes koki inokulēti ar *H. annosum* izolātu 358, kas raksturots kā agresīvāks *H. annosum* izolāts, un 20 koki inokulēti ar *H. annosum* izolātu I Sm 15 92. Izmantota zemzīdas inokulācijas metode: 30–40 dienas pēc inokulēšanas novērtēta *H. annosum* izolāta izraisītā pigmentācija, nosakot vidējo pigmentācijas garumu koksnē uz augšu un uz leju no inokulācijas vietas. Noskaidrots, ka inficēšanai izmantotais izolāts būtiski ($p = 0,001$) ietekmējis pigmentācijas garumu. Salīdzinot datus par pigmentācijas garumu dažādu ģimeņu kokos, secināts, ka pastāv būtiska ($p = 0,017$) atšķirība starp ģimenēm Sm3 un Ja3. Šis ir pirmais pētnieciskais darbs, kurā aprakstīta pieaugušu parastās priedes koku izmantošana *H. annosum* izolātu agresivitātes pret saimniekorganismu novērtēšanai.

Nozīmīgākie vārdi: *Heterobasidion annosum*, *Pinus sylvestris*, rezistence, pigmentācija.

•••

Šķipars, V.^{2*}, Gaitnieks, T.², Ruņģis, D. E.². **Evaluation of pigmentation caused by different *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. strains after under-bark inoculation of Scots pine.**

Abstract. Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) is the economically most important forest tree species of Latvia. Scots pine forests compose 47 % of the forest area managed by the national forest company – JSC „Latvijas Valsts Meži”. 74 % of the pine forest area consists of pure pine stands (JSC „Latvijas Valsts Meži”, 2005), which favours the spread of species-specific diseases. Root rot caused by *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. is common in pine stands. This disease decelerates tree growth, causes withering of trees, and infected forest areas suffer more storm damage. Root rot is not easily detectable by visual examination of trees. This leads to delayed identification of the infection. Decontamination of forest soil in infected areas is virtually impos-

¹ LVMI “Silava”, Rīgas iela 111, Salaspils, LV-2169, Latvija; *e-pasts: vilnis.skipars@silava.lv

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

*e-mail: vilnis.skipars@silava.lv

sible because after removal of stems and roots of infected trees some root fragments bearing the infectious *H. annosum* can still remain in the soil. In Latvia root rot caused by *H. annosum* s.l. is more studied in Norway spruce. An estimation is available which suggests that in Latvian Norway spruce forest stands this disease causes economic losses of 800–4790 EUR ha⁻¹ (Gaitnieks *et al.*, 2007). We assume that economic losses inflicted by *H. annosum* in pine forest stands are also considerable. These factors indicate that research on Scots pine resistance to *H. annosum* is of high importance to Latvian forestry. In studies of pine resistance against root rot, information about the aggressiveness of different *H. annosum* isolates against the host organism is also important.

One of the criteria for characterisation of resistance levels of Norway spruce against *Heterobasidion parvivorum* is lesion length caused by an inoculum of this pathogen under the bark of mature Norway spruce trees. The shorter the lesion, the higher resistance of the tree (Kvaalen & Solheim, 2000). In this study we utilise this method to characterise the *H. annosum*–*P. sylvestris* pathosystem. The method can also be used for characterisation of aggressiveness of *H. annosum* isolates against the host organism. Other authors have studied the aggressiveness of *H. annosum* s.l. isolates on 2–3 years old trees using a sterile piece of wood inoculated with the pathogen culture (Swedjemark, 1995; Werner & Łakomy, 2002; Lind *et al.*, 2007; Dalman, 2010).

Research on the interaction of mature Scots pine trees with *H. annosum* is very important because the physiological properties of the tree, including resistance to pathogens, could be different at different ages.

H. annosum isolates I Sm 15 92 and 358 from collection of LSFRI „Silava” forest mycology and phytopathology laboratory were used for inoculation. One week old *H. annosum* cultures from agarised malt extract medium were used for inoculation.

Mature trees were inoculated by placing a fragment of medium containing *H. annosum* under the bark of the tree. For this purpose a 5 mm cork borer was used. Experiments were performed in two years, 2009 and 2010. Weather conditions were warmer and moister in 2010. Inoculated trees were 25–32 years old, growing in similar conditions. The trees represent different families (generative offspring of vegetative clones of plus trees). Average diameter at breast height (1.3 m) was 12.08 cm. In 2009, when nine trees were inoculated with *H. annosum* isolate 358 samples were collected 30 days post inoculation. In 2010, when 20 trees were inoculated with *H. annosum* isolate I Sm 15 92 samples were collected 40 days post inoculation.

In four samples, a PCR technique (Hantula & Vainio, 2003) was used to confirm the presence of *H. annosum* within the pigmented region. The remaining samples were not tested as the lesions were of similar appearance and *H. annosum* is not found at breast height in *P. sylvestris*.

Average length of lesion pigmentation for the trees was determined by measuring the distances between inoculation point and the upper and lower ends of lesion pigmentation, summing those results and dividing it by two.

In order to investigate possible differences in resistance of individual trees against *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. and to assess the aggressiveness of different isolates of *H. annosum*, 20 trees were inoculated with *H. annosum* isolate *ISm 15 92* and nine Scots pine trees were inoculated with *H. annosum* isolate 358, which is known to be more aggressive than isolate *ISm 15 92*. The pine trees that were inoculated were part of an family block design experimental forest plantation (six descendants of one mother tree). Under-bark inoculation was performed. 30–40 days after inoculation the pigmentation caused by *H. annosum* was determined by measuring the average pigmentation length upwards and downwards from the inoculation point. It was clarified that the choice of isolate used for inoculation affects the length of pigmentation significantly ($p = 0.001$). A significant difference was also detected in the length of pigmentation between members of two different Scots pine families – Sm3 and Ja3 ($p = 0.017$) but a larger number of analysed samples per family is needed to confirm this difference. It is likely that the differences in pigmentation length are influenced more by the choice of fungal isolate for inoculation and tree genotype than by the weather, given that the weather conditions were similar during the experiments. This is to our knowledge the first report where the use of mature Scots pine trees for assessing the aggressiveness of *H. annosum* isolates against the host organism is described.

Conclusions

1. A significant ($p = 0.0001$) difference between lesion length caused by different isolates of *H. annosum* was detected.
2. A significant ($p = 0.017$) difference between lesion length in trees representing families Sm3 and Ja3 was detected still a repeated experiment is needed to support this statement because of the small amount of trees tested.
3. The approbated method can be used to characterise resistance properties of mature Scots pine trees against *H. annosum*.

Key words: *Heterobasidion annosum*, *Pinus sylvestris*, resistance, pigmentation.

•••

Шкипарс, В. ^{3*}, Гайтниекас, Т. ³, Рунгис, Д. Е. ³. **Апробация методики для оценки вызванной *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. пигментации в древесине сосны обыкновенной.**

Резюме. Чтобы оценить возможные различия в резистентности индивидуальных деревьев против воздействия *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. и агрессивность разных изолятов *H. annosum* по отношению к организму хозяина девять деревьев

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

сосны обыкновенной были инокулированы с изолятом *H. annosum* 358, который является более агрессивным; в свою очередь 20 деревьев были инокулированы с изолятом *H. annosum* I Sm 15 92. При проведении эксперимента использован метод инокуляции под корой. В 30–40-дневный срок после инокуляции была оценена степень пигментации, вызванной изолятом *H. annosum*, путем определения средней пигментации в древесине по направлениям вверх и вниз от места инокуляции. Установлено, что использованный для инфицирования изолят оказал существенное ($p = 0,001$) влияние на длину пигментации. Сравнивая данные о длине пигментации разносемейных деревьев, выяснено, что имеется существенное различие ($p = 0,017$) между семействами Sm3 и Ja3. Проведенные исследования являются первой попыткой по определению возможности использования спелых деревьев сосны обыкновенной для оценки агрессивности изолятов *H. annosum* против организма хозяина.

Ключевые слова: *Heterobasidion annosum*, *Pinus sylvestris*, резистентность, пигментация.

Ievads

Latvijā parastā priede (*Pinus sylvestris* L.) ir ekonomiski nozīmīgākā koku suga, tā aizņem 47 % no AS „Latvijas Valsts meži” apsaimniekojamās mežu platības, savukārt 74 % no priežu mežiem sastāda tīraudzes (AS „Latvijas Valsts meži”, 2005), kas veicina sugai specifisku slimību ātru izplatību. Priežu audzēs izplatīta ir sakņu trupe, ko izraisa sakņu piepe *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. Šī slimība samazina koksnēs pieaugumu un izraisa koku nokalšanu, turklāt inficētās mežaudzes ir neoturīgas pret vējgāzēm. Priežu sakņu trupe ir grūti konstatējama, novērtējot tikai koka vainaga stāvokli, jo var neizraisīt redzamas izmaiņas pat gadījumā, ja tā ir skārusi pusi no koka sakņu sistēmas. Izskaut sakņu trupī inficētā mežaudzē praktiski ir neiespējami, jo tad būtu nepieciešama visu bojāto priežu sakņu izvākšana, un tomēr augsnē paliktu atsevišķi sakņu fragmenti. Latvijā *H. annosum* s.l. izraisītā

sakņu trupe vairāk pētiņa eglu audzēs un secināts, ka tā izraisa 800–4790 EUR ha⁻¹ lielus zaudējumus (Gaitnieks *et al.*, 2007). Vērojama arī tendence, ka, palielinoties mežaudzes vecumam, palielinās arī inficēto koku skaits (Gaitnieks *et al.*, 2007). Tādēļ iespējams pieņēmus, ka *H. annosum* izraisītie ekonomiskie zaudējumi ir būtiski arī inficētajās priežu audzēs. Minētā informācija rosina veikt pētījumus par parastās priedes rezistenci pret sakņu trupī. Šajā kontekstā svarīgi arī noskaidrot trapes izraisītāja – *H. annosum* atšķirīgu izolātu „agresivitāti” pret saimniekaugu.

Izpētes procesā nozīmīgi ir atklāt dabā sastopamās priedes noturības pret sakņu trupī raksturojošo parametru atšķirības. Arī Latvijas zinātnieki ir izvērtējuši priedes rezistenci raksturojošos kritērijus (Lauska, 1970). Viens no rādītājiem, kas zinātniskajā literatūrā minēts kā rezistentāko koku atlases kritērijs eglēm, ir *H. parviporum* izraisītās audu pigmentācijas garums pēc koku mākslīgās inficēšanas.

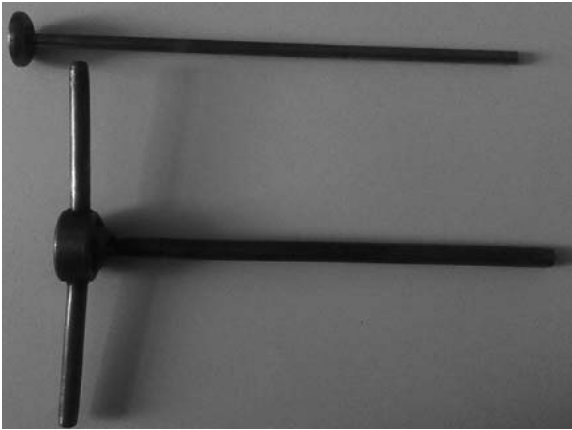
Jo īsāka ir inokulācijas izraisītā pigmentācija, jo koks tiek uzskatīts par rezistentāku (Kvaalen & Solheim, 2000). Minētais kritērijs ir universāls, jo šādas pārbaudes var veikt katrai izvēlētajai koku sugai, inokulēšanai izmantojot mikroorganismu, rezistenci pret kuru pētnieki mēģina pastiprināt selekcijas ceļā. Piemēram, ir publicēti dati par šādas pieejas izmantošanu parastās egles (*Picea abies*) rezistences izvērtēšanai pret zilējuma sēni (*Ceratocystis polonica*) (Nagy *et al.*, 2005). Aprakstītā metode pielietojama arī *H. annosum* izolātu agresivitātes pārbaudēm pret saimniekorganismu. Citi autori *H. annosum* s.l. izolātu agresivitāti pārsvarā pētījuši, inokulējot 2–3-gadīgus stādījumus, inokulācijai izmantojot ar *H. annosum* s.l. micēliju cauraugušus koksnes fragmentus (Swedjemark, 1995; Werner & Łakomy, 2002; Lind *et al.*, 2007; Dalman, 2010). Vairākums datu par *H. annosum* s.l. agresivitāti un arī koku rezistences spējām iegūti, pētot parasto egli. Pašreiz vēl nav informācijas par to eksperimentu rezultātiem, kuros izvērtēta *H. annosum* izolātu agresivitāte pret pieaugušiem parastās priedes kokiem. Sējeņu izmantošana koku rezistences spēju un *H. annosum* izolātu agresivitātes izpētē ļauj eksperimentēt kontrolētos apstākļos. Tomēr īpaši svarīgi ir pētījumi ar pieaugušiem kokiem, jo priedes rezistences spējas un audu struktūra tiem ir atšķirīga. Tāpat atšķirīgs ir pieaugušu egļu un priežu koksnes biokīmiskais sastāvs un citas šo koku īpašības, tādēļ metodes, kuras pielieto darbā ar pieaugušām eglēm, ir aprobējamas arī izmēģinājumos ar pieaugušiem parastās priedes indivīdiem.

Materiāls un metodika

Inficēšanas materiāla sagatavošanā izmantota *H. annosum* izolāta *ISm 15 92* kultūra un arī agresīvākais *H. annosum* izolāts 358 no LVMI „Silava” Meža mikoloģijas un fitopatoloģijas laboratorijas kolekcijas. Koki inokulēti ar nedēļu vecu *H. annosum* kultūru, kas iegūta agarizētā iesala ekstrakta barotnē.

Pieaugušie koki inokulēti, ievietojot *H. annosum* saturošu barotni aiz koka mizas. Šīs operācijas veikšanai izmantots korķurbis (1. att.), kura diametrs ir 5 mm.

Eksperiments ierīkots Meža pētīšanas stacijas Kalsnavas mežu novadā (224. kvartāls, ilglaicīgo zinātnisko pētījumu objektu reģistra nr. 235, meža tips – mētrājs) un Vecumnieku mežniecības (193. kvartāls, pētījumu objektu reģistra nr. 27 – turpmāk tekstā „Zvirgzde”; meža tips – lāns) priežu klonu pēcnācēju pārbaudes stādījumos, kas izveidoti 1979. un 1986. gadā ar mērķi – noteikt dažādas izcelsmes stādmateriāla augšanas rādītājus. Minētie stādījumi ierīkoti ar dažādām parastās priedes ģimenēm (koku grupām no viena mātes koka), kas ņemtas no dažādām izcelsmes vietām Latvijā. Vidējais izmēģinājumos ietvertu koku caurmērs krūšaugstumā (1,3 m no sakņu kakla) ir 12,08 cm. Darbā izmantotā metode, ko lietojis arī Hietala un līdzautori parastās egles (*Picea abies*) rezistences izvērtēšanai (Hietala *et al.*, 2003), paredz koka traumēšanu tikai līdz lūksnei. Pirmais solis koka inokulēšanai ir cauruma izveidošana mizā, spiežot pret stumbru korķurbi ar izņemtu virzuli, kad instrumenta kustība stumbra dziļumā vairs



1. attēls. Pieaugušu koku inokulēšanai izmantotais korķurbis ar izņemtu virzuli.

Figure 1. Cork boreused for inoculation of adult trees (with plunger removed).

neturpinās, urbi izņem ārā. Iegūtais mizas gabaliņš tajā brīdī atrodas urbja galā, to ar virzuli iebīda dziļāk korķurbī. Nākamais solis ir inokulāta ievietošana instrumentā, ko izdara, pārvietojot tā aso galu pa barotni tādā veidā, lai neliela barotnes daļa nonāktu urbja iekšpusē. Pēc tam instrumenta galu ievieto atpakaļ izveidotajā caurumā, koķurbī ieliek virzuli un lēnām spiež, līdz koķurbī atrodošais mizas gabals inokulātu iebīda caurumā, to noslēdzot. Pirms katras inokulācijas koķurbī un virzuli noskalo ar 70 % spirta šķīdumu, ko savukārt noskalo ar sterilu ūdeni. Inokulēšana veikta stumbra krūšaugstumā.

Paraugi mērīšanai ievākti dažādos laika intervālos pēc inokulācijas (30 dienas 2009. gadā; 40 dienas 2010. gadā). Inokulētā vieta un koksne ap to – 1 cm sānis virzienā uz abām pusēm un 7 cm uz augšu un leju – izņemta no koka, pielietojot kalnu un āmuru.

Četriem paraugiem noteikts, vai inokulāta izraisītās pigmentācijas cēlonis

ir *H. annosum* inokulāts, jo iespējams, ka pigmentācija radusies mikroorganismu darbības rezultātā, vai kā koka fizioloģiska reakcija uz traumu. Izpētes veikšanai no pigmentācijas galējā punkta paņemts koksnes paraugs, un no tā izdalīta DNS, kas izmantota polimerāzes ķēdes reakcijā (PKR), lai tādējādi specifiski konstatētu *H. annosum* klātbūtni koksnē (Hantula & Vainio, 2003).

Rezultāti un diskusija

Izpētes rezultāti liecina, ka pēc koka zemzīdas inokulēšanas lūksnē veidojas gareniska pigmentācija, kas vērsta uz augšu un leju no inokulācijas vietas. Sānis uz vienu un otru pusi pigmentācija izplatījies vidēji tikai 0,5–1,0 mm robežās. Pigmentācija izmantota, lai raksturotu *Picea sitchensis* koku rezistenci pret *H. annosum* un *Picea abies* rezistenci pret *H. parviporum*, pieņemot, ka salīdzinoši rezistentāki ir koki, kuros pigmentācijas izplatīšanās ātrums, kas norāda arī uz sēnes augšanas ātrumu, ir mazāks (Bodles *et al.*, 2007; Karlsson *et*

al., 2008). Arī mūsu pētījumā, salīdzinot dažādus kokus, konstatētas pigmentācijas garuma atšķirības. Mērījumu rezultāti apkopoti 1. tabulā.

1. tabula, Table 1

H. annosum izraisītās pigmentācijas mērījumi
Measurements of length of pigmentation caused by *H. annosum*

| Parauga nosaukums <i>Sample name</i> | Inokulēšanas materiāls <i>Inoculum material</i> | Vidējais pigmentācijas garums, mm <i>Average pigmentation length, mm</i> | Mērījuma standartkļūda <i>Standard error</i> |
|---|--|---|---|
| Zvirgzde 6 | 358 | 52,50 | 24,75 |
| Ja3-III-5 | 358 | 40,00 | 2,83 |
| Du12-III-4 | 358 | 30,00 | 4,24 |
| Zvirgzde 1 | 358 | 25,00 | 0,00 |
| Zvirgzde 5 | 358 | 20,00 | 2,83 |
| Str17-III-3 | 358 | 20,00 | 0,00 |
| Zvirgzde 7 | 358 | 18,00 | 0,00 |
| Ja2-III-4 | <i>I Sm 15 92</i> | 18,00 | 2,83 |
| Str17-I-1 | <i>I Sm 15 92</i> | 13,00 | 2,83 |
| Zvirgzde 2 | 358 | 10,00 | 1,41 |
| Ja15-III-6 | <i>I Sm 15 92</i> | 10,00 | 0,00 |
| Ja21-V-5 | <i>I Sm 15 92</i> | 9,50 | 3,54 |
| Zvirgzde 4 | 358 | 9,00 | 0,00 |
| Ja15-V-1 | <i>I Sm 15 92</i> | 7,50 | 3,54 |
| Ja18-III-2 | <i>I Sm 15 92</i> | 7,00 | 0,00 |
| Ja3-V-5 | <i>I Sm 15 92</i> | 7,00 | 0,00 |
| Sm9-III-2 | <i>I Sm 15 92</i> | 6,50 | 4,95 |
| Ja3-V-2 | <i>I Sm 15 92</i> | 6,00 | 7,07 |
| Ma6-V-2 | <i>I Sm 15 92</i> | 6,00 | 0,00 |
| Ja3-V-3 | <i>I Sm 15 92</i> | 5,50 | 0,71 |
| Ja15-V-5 | <i>I Sm 15 92</i> | 4,50 | 0,71 |
| Je7-III-5 | <i>I Sm 15 92</i> | 4,50 | 0,71 |
| Lub1-III-1 | <i>I Sm 15 92</i> | 4,50 | 0,71 |
| Du12-III-4 | <i>I Sm 15 92</i> | 4,00 | 2,83 |
| Ja4-III-2 | <i>I Sm 15 92</i> | 4,00 | 0,00 |
| Ja15-V-6 | <i>I Sm 15 92</i> | 3,50 | 0,71 |
| Sm3-V-2 | <i>I Sm 15 92</i> | 3,50 | 2,12 |

1. tabula (turpinājums) / Table 1 (continued).

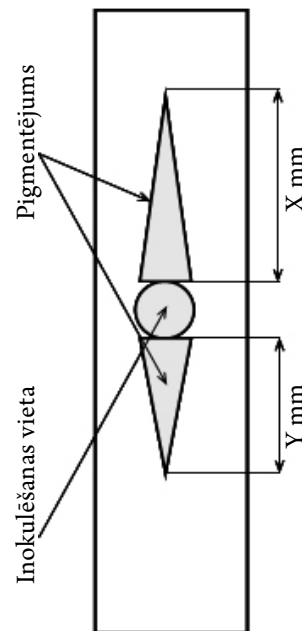
| Parauga nosaukums <i>Sample name</i> | Inokulēšanas materiāls <i>Inoculum material</i> | Vidējais pigmentācijas garums, mm <i>Average pigmentation length, mm</i> | Mērījuma standartkļūda <i>Standard error</i> |
|---|--|---|---|
| Sm3-II-2 | <i>I Sm 15 92</i> | 3,00 | 0,00 |
| Ja21-V-1 | <i>I Sm 15 92</i> | 2,50 | 0,71 |

Apzīmējumi tabulā: Atšifrējums paraugiem no Kalsnavas eksperimentālā stādījumā: pirmie divi – trīs simboli, piemēram, Ma vai Str apzīmē pluskoku izcelsmes vietu, no kuras ņemts plantācijas sēklu materiāls, tam sekojošais numurs – pluskoka pēcnācēju ģimenes numurs. Ar romiešu skaitļiem I – V apzīmē stādījuma atkārtojums, sekojošais skaitlis (1 – 6) norāda koka kārtas skaitli stādījumā. Paraugi no eksperimentālā stādījuma Zvirgzdē, kur pārstāvēti Mazsalacas pluskoku klonu ģeneratīvie pēcnācēji, apzīmēti ar „Zvirgzde 1” – „Zvirgzde 7”.

Designations used: „Deciphering of sample names from experimental plantation in Kalsnava: first two – three symbols, for instance Ma or Str, stands for origin of plus trees whose offspring these samples are, the following number is the number of offspring family. Roman figures I – V stand for the ramet repeat number, the number after that (1 – 6) indicates the number of the tree in ramet. Samples from experimental plantation in Zvirgzde which represent offspring families of plus trees from Mazsalaca are designated „Zvirgzde 1” – „Zvirgzde 7”.

Skrīveru meteoroloģijas stacijas dati liecina, ka vidējā gaisa temperatūra 2009. gada jūlijā bijusi 22,8 °C un augustā 21,0 °C. Vidējā gaisa temperatūra 2010. gada augustā bijusi 23,7 °C. Nokrišņu daudzums 2009. gada jūlijā un augustā – atiecīgi, 104,5 un 61,1 mm, bet 2010. gada augustā – 161,7 mm. Minētās temperatūras fiksētas trijos pēcpusdienā.

Mērījumu veikšanā izmantoto paraugu shematiskais attēlojums ar paskaidrojumiem redzams 2. attēlā. 1. tabulā apkopotais vidējais pigmentācijas garums iegūts, saskaitot un dalot ar divi 2. attēlā paskaidrotās vērtības X un Y. Tas, ka pigmentāciju izraisījusi *H. annosum*, apstiprināts, izmantojot PCR metodes, kas specifiski detektē *H. annosum* DNS no koksnes izdalītā DNS paraugā. PCR analīze deva pozitīvu rezultātu. Tika pārbaudīti četri paraugi, un tā kā visiem ievāktajiem paraugiem pigmentācijas raksturs bija līdzīgs un *H. annosum* nav



2. attēls. Parauga shematiskais attēlojums.
Figure 2. Schematic view of sample.

dabiski sastopama priedes stumbrā krūšaugsstumā, pieņemams, ka inokulācija pieaugušos kokos notiek sekmīgi.

Pigmentācijas garuma mērījumi, kas apkopoti 1. tabulā, izdarīti 2009. un 2010. gadā; 2009. gadā inokulācijai izmantots *H. annosum* izolāts 358, kas pēc pieejamās informācijas atzīts par agresīvāku, bet rezultātā radušos pigmentāciju garums noteikts 30 dienas pēc inokulēšanas; savukārt 2010. gadā inokulācijai pielietota *H. annosum* kultūra *ISm 15 92*, un radušos pigmentāciju garums noteikts 40 dienas pēc inokulēšanas. Kā redzams tabulā, dati savstarpēji ievērojami atšķiras. Inokulācijas izraisītās pigmentācijas vidējais garums, atkarībā no inokulātam izmantotās kultūras, attēlots 3. attēlā.

Izpētes rezultāti liecina, ka inokulācijai izmantotajiem izolātiem raksturīgs ļoti atšķirīgs pigmentācijas izplatīšanās ātrums (3. attēls). Salīdzinot ar dažādiem *H. annosum* izolātiem inficētos kokus (3. att.), secināts, ka grupu vidējās vērtības ir 24,9 mm un 6,5 mm, bet grupu standartnovirze (*SD*) – attiecīgi, 14,08 mm un 3,76 mm; vidējā standartklūda (*SEM*) katrai grupai ir 4,69 mm un 0,84 mm. Pigmentācijas garuma atšķirība, atkarībā no pielietotā inokulāta, ir būtiska – ticamības līmenis $p = 0,0001$. Viens koks, Du12-III-4, izmantots eksperimentos ar abiem *H. annosum* izolātiem. Eksperimentā ar izolātu *ISm 15 92* konstatētais pigmentācijas garums bija 4 mm, bet ar izolātu 358 – 30 mm. Šie dati liecina par nozīmīgu inokulātam izmantotā izolāta ietekmi uz pigmentācijas garumu. Eksperimentā, kā inokulātu pielietojot izolātu *ISm 15 92*

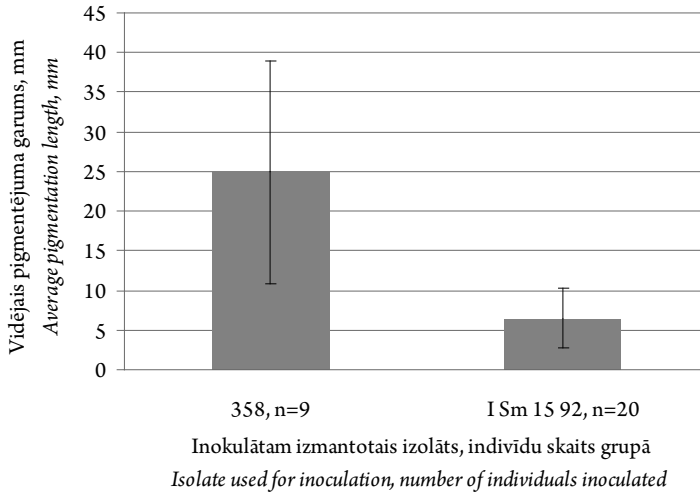
(4. attēls), konstatētas arī pigmentācijas garuma atšķirības starp ģimenēm.

Atšķirības starp ģimenēm Sm3, kur pigmentācijas garums vidēji ir 3,25 mm, un Ja3, kur pigmentācijas garums vidēji ir 6,17 mm, (Ja – Jaunjelgava; Sm – Smiltene) ir statistiski ticamas, $p = 0,017$. Atšķirības, savstarpēji salīdzinot pārējās ģimenes, statistiski nav ticamas.

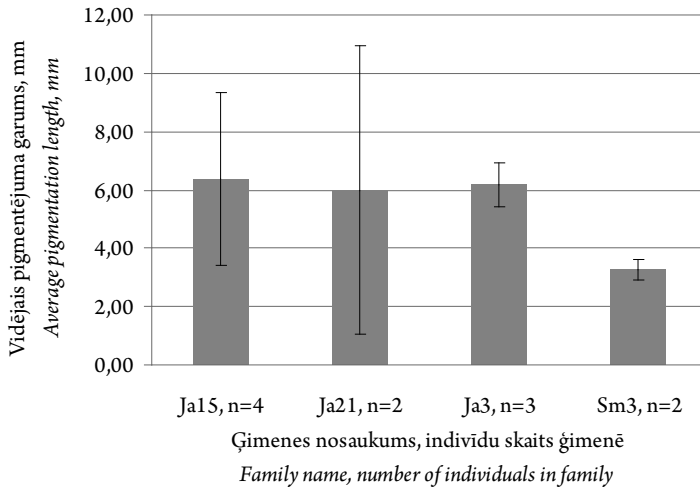
Vidējais pigmentācijas garums 2009. gada eksperimentā bija 24,94 mm, bet 2010. gadā veiktajā – 6,50 mm.

Interpretējot datus par *H. annosum* augšanas ātrumu, jāņem vērā klimata apstākļus, kas ietekmē šī augu patogēna attīstību – vēsā un sausā laikā *H. annosum* augšanas ātrums samazinās. Skrīveru meteoroloģijas stacijas dati rāda, ka vidējā gaisa temperatūra 2009. gada jūlijā bijusi aptuveni par vienu grādu, bet augustā par trim grādiem zemāka, salīdzinot ar vidējo temperatūru 2010. gada augustā. Lielāks nokrišņu daudzums fiksēts 2010. gada augustā. Tādējādi varam secināt, ka laika apstākļu atšķirības rezultātus būtiski nav ietekmējušas.

Salīdzinot atsevišķus kokus, konstatēti atšķirīgi pigmentācijas garumi. Tas apstiprina citā pētījumā par eglēm iegūtās atziņas (Hietala *et al.*, 2003). Tā kā indivīda genoms laika gaitā nemainās, var secināt, ka inokulāta izraisītās pigmentācijas garuma mērījumu rezultāti atspoguļo katra indivīda rezistences spēju, jo pielietoto inokulātu agresivitāte pret saimniekorganismu bijusi atšķirīga. Tāpat secināms, ka šādi mērījumi raksturo inokulāta agresivitāti. Iegūtie rezultāti iepriekš minēto apstiprina – jo konstatēta statistiski ticama pigmentā-



3. attēls. Dažādu inokulāta materiālu izraisītais vidējais pigmentācijas garums.
Figure 3. Average pigmentation length depending on isolate used for innoculation.



4. attēls. Dažādu ģimeņu pārstāvju vidējais pigmentācijas garums.
Figure 4. Average lesion lengths of representatives from different families.

cijas garuma atkarība no inokulātam izmantotā *H. annosum* izolāta.

Salīdzinot un analizējot ģimenes Sm3 un Ja3, iegūti statistiski ticami dati par rezistences spēju pret *H. annosum* atšķirībām, kas norāda, ka ģimenes Sm3 pārstāvji ir salīdzinoši rezistentāki par Ja3 ģimenes pārstāvjiem. Rezultāti apliecina šīs metodes potenciālu pielietojumu parastās priedes selekcijā. Protams, lai prakses vajadzībām izdalītu rezistentāko stādmateriālu, izpētes materiāla apjomam jābūt daudz lielākam.

Mūsu pētījums ir pirmais, kura izpildes gaitā izvērtēta priežu ģimeņu un indivīdu rezistence pret *H. annosum*, analizējot sēnes izraisīto pigmentāciju pieaugušos, dabiskos apstākļos augošos kokos. Iegūtie dati liecina, ka, izmantojot aprakstīto metodiku, iespējams noteikt atšķirības starp indivīdiem, kuru augšanas apstākļi ir vienādi (vienā stādījumā) un kuri vienlaicīgi inokulēti ar vienu *H. annosum* izolātu.

Lai gan atsevišķu indivīdu reakcijas uz inokulātu (inokulācijas radītās pigmentācijas) precīzai raksturošanai un savstarpējai salīdzināšanai katrā kokā būtu veicami vairāki mērījumi, pētījuma rezultāti liecina, ka atsevišķā mežaudzē praktizētā metode ir pielietojama, lai salīdzinātu parastās priedes indivīdu atbildes reakciju pēc inokulācijas ar mērķi atlasīt kandidātus turpmākai izpētei. Kaut gan analizēto paraugu skaits ir neliels, tomēr konstatētas statistiski ticamas atšķirības starp divām priežu klonu pēcnācēju ģimenēm – Sm3 un Ja3. Šajā pētījumā aprobēta metodika parastās priedes inokulēšanai ar *H. annosum*, lai novērtētu atsevišķu koku rezistenci un pielietoto izolātu agresivitāti. Šī metodika būs izmantojama turpmākajos zinātniskajos pētījumos par priedes rezistenci pret sakņu trupi, kā arī priedes selekcijas programmās.

Secinājumi

1. Konstatēta būtiska dažādu *H. annosum* izolātu izraisītās pigmentācijas garuma atšķirība ($p = 0,0001$)
2. Konstatēta statistiski ticama pigmentācijas garuma atšķirība starp priežu klonu pēcnācēju ģimenēm Sm3 un Ja3 ($p = 0,017$), tomēr vēlams šo rezultātu precizēšana, analizējot lielāku pārstāvju skaitu no katras ģimenes.
3. Aprobētā metodika, novērtējot *H. annosum* izraisīto pigmentāciju pēc zemzīdas inokulēšanas, ir izmantojama pieaugušu priežu rezistences pret sakņu piepi noteikšanai.

Pateicība: LVMI „Silava” Meža selekcijas projektu grupas vadošajam pētniekam Dr. silv. Imantam Baumanim par pētījuma materiāla izvēli.

Darbs veikts ESF projekta Nr. 009/0228/1DP/1.1.1.2.0/09/APIA/VIAA/035 ietvaros.

Literatūra

- AS „Latvijas Valsts Meži” mājas lapa http://www.lvm.lv/lat/mezs/par_mezu/, sagatavota 2005. gada 29. martā, pārbaudīta 2011. gada 7. novembrī.
- Bodles, W. J. A., Beckett, E., Woodward, S.** (2007) Responses of Sitka spruce of different genetic origins to inoculation with *Heterobasidion annosum*: lesion lengths, fungal growth and development of the lignosuberized boundary zone. *Forest Pathology*, 37, pp. 174–186.
- Dalman, K.** (2010). *Heterobasidion* root rot. Diss. (sammanfattning/summary) Uppsala: Sveriges lantbruksuniv., Acta Universitatis agriculturae Sueciae, 1652-6880; 2010: 81 ISBN 978-91-576-7526-2 [Doctoral thesis].
- Gaitnieks, T., Arhipova, N., Donis, J., Stenlid, J., Vasaitis, R.** (2007). Butt rot incidence and related losses in Latvian *Picea abies* (L.) Karst. stands. M. Garbelotto & P. Gonthier (Eds). Proceedings of the 12th International Conference on Root and Butt Rots of Forest Trees. Berkeley, California – Medford, Oregon, August 12-19, 2007. The University of California, Berkeley, USA, 2008, pp. 177–179.
- Hantula, J., Vainio, E.** (2003). Specific Primers for the Differentiation of *Heterobasidion annosum* (s.str.) and *H. parviporum* Infected Stumps in Northern Europe. *Silva Fennica*, 37, pp. 181–187.
- Hietala, A. M., Eikenes, M., Kvaalen, H., Solheim, H., Fossdal, C. G.** (2003). Multiplex Real-Time PCR for Monitoring *Heterobasidion annosum* Colonization in Norway Spruce Clones That Differ in Disease Resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), 4413–4420.
- Karlsson, B., Tsopelas, P., Zamponi, L., Carpetti, P., Soulioti, N., Swedjemark, G.** (2008) Susceptibility to *Heterobasidion parviporum* in *Picea abies* clones grown in different environments. *For. Path.* 38, 83–89.
- Kvaalen, H., Solheim, H.** (2000). Co-inoculation of *Ceratocystis polonica* and *Heterobasidion annosum* with callus of two Norway spruce clones with different in vivo susceptibility. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 60, 221–228.
- Lauska, A.** (1970). Priedes un egles rezistence pret mākslīgu *Fomes anosus* (Fr.) CKE infekciju. *Jaunākais mežsaimniecībā*, XII, 35–42.
- Lind, M., Dalman, K., Stenlid, J., Karlsson, B., Olson, Å.** (2007). Identification of quantitative trait loci affecting virulence in the basidiomycete *Heterobasidion annosum* s.l. *Curr Genet.*, 52, 35–44.
- Nagy, N. E., Franceschi, V. R., Kvaalen, H., Solheim, H.** (2005). Callus cultures and bark from Norway spruce clones show similar cellular features and relative resistance to fungal pathogens. *Trees*, 19, 694–702.
- Swedjemark, G.** (1995). Dissertation: *Heterobasidion annosum* root rot in *Picea abies*: variability in aggressiveness and resistance. Sveriges Lantbruksuniversitet (Swedish

University of Agricultural Sciences), Uppsala.

Werner, A., Łakomy, P. (2002). Intraspecific Variation in *Heterobasidion annosum* for Mortality Rate on *Pinus sylvestris* and *Picea abies* Seedlings Grown in Pure Culture. *Mycologia*, 94, 5, 856–861.