

***Zinātniskā projekta “Risinājumu izstrāde ozolu akūtās kalšanas ierobežošanai Talsu paugurainē Meža pēfīšanas stacijas teritorijā, kuri pēc nepieciešamības piemērojami arī pārējā Latvijas teritorijā” atskaite***

***Ievads***

Ozolu mežaudzes Latvijā aizņem apmēram 9500 ha. Vairāk nekā puse no ozolu mežiem atrodas Kurzemes reģionā. Latvijā savvaļā kā vietējā ozolu suga sastopams parastais ozols (*Quercus robur*). Apstādījumos, parkos vai stādījumu kolekcijās var būt sastopamas arī citas ozolu sugas – sarkanais ozols (*Quercus rubra*), klinšu ozols (*Quercus petraea*) u.c.

Ozols ir viens no Latvijas nacionālajiem simboliem, ozola lapas attēlotas Latvijas ģērbonī, Latvijas Dendrologu biedrība par 2018. gada koku bija izvēlējusi ozolu, līdz ar to ozoliem tiek pievērsta pastiprināta sabiedrības un mediju uzmanība.

Ņemot vērā ozolu ekoloģisko, ekonomisko un sociālo nozīmi Latvijā, jāsaprot, kas apdraud šos kokus Latvijā. Arvien biežāk dzirdama informācija, ka ozoli izskatās neveselīgi – kalstoši zari, vainagu defoliācija, stumbra bojājumi. Līdzīgas pazīmes ir arī bīstamai slimībai – ozolu akūtai kalšanai, kuru pēc zinātnieku pētījumiem saista ar baktēriju kompleksu *Gibbsiella quercinecans* un *Brenneria goodwinii*, taču aizvien biežāk, kā slimības izraisītājs tiek minēts arī dažādu biotisko un abiotisko faktoru kopums. Līdz šim kā būtiskākie ozolu kaitēkļi konstatēti ozolu tinējs un ozolu mūķene. Taču būtu jānoskaidro informācija par ozolu iespējamo inficēšanos ar jauniem kaitīgiem organismiem. Nenoliedzami lielu ietekmi uz ozolu novājināšanos atstāj arī klimatiskie apstākļi, kuru ietekmē ozoli kļūst uzņēmīgi pret dažādiem kaitīgiem organismiem.

Vairākas valstis Eiropā ir informējušas par potenciāliem ozolu saslimšanas gadījumiem, kad novēroti ozolu akūtās kalšanas simptomi, tomēr līdz šim laboratoriski apstiprināta šo baktēriju klātbūtne ir tikai Lielbritānijā, Šveicē un Polijā.

***Situācijas apraksts pirms projekta uzsākšanas***

Valsts augu aizsardzības dienests (turpmāk – VAAD) sadarbībā ar Lielbritānijas zinātniekiem 2017. gada rudenī laboratoriski apstiprināja *Gibbsiella quercinecans* un *Brenneria goodwinii* baktēriju esamību Latvijas ozolos (trīs kokos) Talsu paugurainē. Latvijā ozolu akūta kalšana līdz 2018. gada beigām konstatēta četrās dažādās vietās.

Slimības simptomi galvenokārt novēroti nobriedušiem ozoliem, kas ir vairāk nekā 50 gadus veci un kuru diametrs ir vairāk nekā 30 cm. Slimība ozolus var apdraudēt gan dabiskās, gan mākslīgās ekosistēmās, tajā skaitā mežos, parkos, lauksaimniecības zemēs un apstādījumos pilsētvidē. Bīstama ne tikai Latvijā visbiežāk sastopamajam parastajam ozolam (*Quercus robur*), bet arī citām ozolu sugām, kuras izplatītas apstādījumos.

Galvenie slimības simptomi ir lipīgs šķidrums – eksudāts, kas izdalās pa mazām (20 -15 cm), vertikālām plaisām koka stumbrā. Noplēšot koka mizu, saskatāmi tumši, slapji, neregulāras formas ievainojumi. Slimībai progresējot, koka vainags izretinās un bieži vērojama zaru galu atmiršana. Lielbritānijā inficētajos kokos bieži konstatētas šaurspārnu krāšņvaboles *Agrilus biguttatus* darbības pēdas – zem ārējās mizas novērotas vaboles kāpurejas. Stumbra sulošanās vietu tuvumā var būt redzami vaboļu radītie D-formas izskrejas caurumi 3 - 4 mm. Inficētie ozoli nokalst un aiziet bojā apmēram trīs līdz piecu gadu laikā no simptomu parādīšanās brīža, taču līdzšinējie pētījumi liecina, ka apmēram 40% gadījumu inficētie ozoli atveseļojas, tomēr nav skaidrs vai tādā gadījumā, slimību izraisošās baktērijas nesaglabājas inficētajā kokā. Pēc britu zinātnieku domām, ozolu akūtā kalšana ir kompleksa saslimšana, kas attīstās vairāku atšķirīgu faktoru (ne tikai baktēriju) ietekmē.

Lielbritānijā veiktie pētījumi galvenokārt attiecas uz parkā augošiem kokiem, bet Latvijā šī slimība ir konstatēta mežaudzēs. Līdz ar to ir svarīgi izprast to, kā notiek slimības tālāka izplatīšanās un attīstība mežaudzēs un Latvijas klimatiskajos apstākļos. Būtiski veikt Latvijas sadarbību ar Lielbritānijas zinātniekiem, lai nodrošinātu informāciju par jaunākajiem pētījumiem un tajos iegūtajiem rezultātiem.

2018. gada pavasarī veikti ozolu mežu apsekojumi Kurzemē un Zemgalē, lai apzinātu situāciju Latvijā saistībā ar ozolu akūto kalšanu. Sākotnēji 2018.gadā Latvijā ozolu akūtā kalšana konstatēta četrās dažādās vietās – Kazdanga, Cīrava, Talsu pauguraine (slimība izplatījies Kurzemes reģionā). Tomēr ņemot vērā, ka ir gadi, kad klimatiskie apstākļi nav labvēlīgi slimības attīstībai, pastāv iespējamība, ka šīs baktērijas kokos ir, bet neuzrāda ārējās pazīmes (atrodas latentā formā).

***Veiktie darbi un to rezultāti projekta “Risinājumu izstrāde ozolu akūtās kalšanas ierobežošanai Talsu paugurainē Meža pētīšanas stacijas teritorijā, kuri pēc nepieciešamības piemērojami arī pārējā Latvijas teritorijā” ietvaros***

2018. gada 18. decembrī starp sadarbības partneriem: Latvijas Lauksaimniecības universitātes valsts zinātniskās izpētes mežu apsaimniekošanas aģentūra “Meža pētīšanas stacija” (turpmāk – MPS), SIA “Amber wood”, Latvijas Valsts mežzinātnes institūtu “Silava” (turpmāk – LVMI “Silava”), VAAD un Valsts meža dienestu (turpmāk - VMD) noslēgts līgums par zinātniskā pētījuma projekta “Risinājumu izstrāde ozolu akūtās kalšanas ierobežošanai Talsu paugurainē Meža pētīšanas stacijas teritorijā, kuri pēc nepieciešamības piemērojami arī pārējā Latvijas teritorijā” īstenošanu. Projektā sasniedzamais rezultāts - izstrādāta metodika ozolu akūtās kalšanas ierobežošanai Talsu paugurainē Meža pētīšanas stacijas teritorijā.

Pētījuma rezultātā tika saņemtas atbildes uz to, kāda ir ozolu akūtās kalšanas izplatība Latvijā un saņemts novērtējums par slimību izraisīto un izplatību veicinošo dažādu biotisko un abiotisko faktoru kopumu un kā tas saistīts ar baktērijām *Gibbsiella quercinecans* un *Brenneria goodwinii*.

Lai sasniegtu projektā izvirzīto mērķi un izpildītu tajā noteiktos uzdevumus, projektā iesaistītās puses (LVMI “Silava”, VMD un VAAD) no 2018. gada līdz 2021. gadam veica aktivitātes, kas katram gadam tika plānotas atsevišķi. Pamatojoties uz katrā gadā veikto darbu apjomu, iegūto datu analīzi un rezultātu izvērtējumu, ņemot vērā situācijas dinamiku, veicamie darbi papildināti ar situācijai atbilstošu risinājumu. Pēc aktivitāšu īstenošanas apkopoti iegūtie rezultāti.

***Projekta ietvaros īstenotās aktivitātes un iegūtie rezultāti***

1. Mežaudžu apsekojumu veikšanas metodikas izstrāde un paraugu ņemšanas metodikas izstrāde divu veidu paraugiem: mizai un eksudātam.

1.1. Mežaudžu apsekojumu veikšanas metodikas “Ozolu mežaudžu apsekošanas metodika Latvijas teritorijā” (turpmāk – metodika) izstrādi veica VMD un tās mērķis noteikt kārtību kādā tiek veikta ozolu audžu apsekošana, lai konstatētu ozolu ar ozolu akūtās kalšanas pazīmēm izplatību, kā arī veiktu inficēto ozolu laboratorisku pārbaudi uz baktēriju sugu – *Gibbsiella quercinecans* un *Brenneria goodwinii* esamību. Izstrādātā metodika paredz, ka VMD atlasa no meža valsts reģistra apsekojamās ozolu mežaudzes pēc šādiem kritērijiem:

1.1.1. mežaudzes vecums – 50 gadi un vairāk;

1.1.2. vispirms izvēlas, kur mežaudzes formula ir 4, 5, 6, 10 ozoli, tad 2019. gadā ozoli mežaudzes formulā – 6, 7, 8, 9, 10, bet 2020. gadā ozoli mežaudzes formulā – 5, 6, 7, 8, 9, 10, visbeidzot 2021. gadā Ozoli mežaudzes formulā – 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10. Papildus apseko tuvumā esošās ozolu audzes, ja audzē konstatēta abu baktēriju klātbūtne;

1.1.3. nogabala platība – 1 ha un lielāka.

1.2. Datu atlasē pievieno sadalījumu pēc īpašnieka/tiesiskā lietotāja (t.i., AS “Latvijas valsts meži” (turpmāk – LVM), MPS, Dabas aizsardzības pārvaldes (turpmāk – DAP), LVMI “Silava” un pārējo fizisko juridisko personu meži).

VMD atlasīja apsekojamās ozolu mežaudžu nogabalus, kur īpašnieks vai tiesiskais valdītājs ir LVM, LVMI “Silava” un nosūtīja tos minētajiem īpašniekiem apsekošanas veikšanai.

VMD veica apsekojumus atbilstoši sagatavotajiem datiem.

1.3. Ozolu meža nogabalus apseko pa nogabala garāko diagonāli, vizuāli apskatot un novērtējot tur augošos ozolus. Transektu pa nogabala diagonāli ieteicams novilkt virzienā DA → ZR.

1.4. Apsekojumu veikšanas laikā uzmanība pievērsta meža malām, kā arī atsevišķām saules labi apspīdētām vietām, kur slimības risks teorētiski varētu būt augstāks. Savukārt apskatot atsevišķus ozolus, pastiprināta uzmanība jāpievērš tai stumbra daļai, kas ir eksponēta dienvidu pusē.

1.5. Ja apsekotajā meža nogabalā konstatē ozolu ar ozolu akūtās kalšanas pazīmēm, tad uzmēra tā koordinātes (LKS-92 sistēmā), savukārt, ja nogabalā atrasti vairāki aizdomīgi ozoli, piefiksē vismaz viena koka koordinātes. Ja ir iespējams jānofotografē šis ozols.

1.6. Apsekojuma rezultāti reģistrēti GNSS ierīcē. Apsekojamo koku koordinātas saglabā GNSS iekārtā kā punktu mērījumu (katram kokam), lai nodrošinātu datu sinhronizāciju ar VMD GIS serveri. Pēc aizdomīgo ozolu koordinātu saņemšanas, inženieris meža aizsardzības jautājumos veic paraugu ņemšanu no simptomātiskiem kokiem.

1.7. Lai veicot apsekojumus, atbilstoši ņemtu paraugus baktēriju *Gibbsiella quercinecans* un *Brenneria goodwinii* noteikšanai laboratorijā, svarīgi bija izstrādāt paraugu ņemšanas metodiku divu veidu paraugiem: mizai un eksudātam. Paraugu ņemšanas metodikas izstrādi veica VAAD Nacionālās fitosanitārās laboratorijas eksperti. Izstrādājot metodiku, tika ņemts vērā, ka parauga ņemšana mizai vai eksudātam ir atšķirīga. Izstrādātā metodika ietver informāciju, kuros gadījumos

ņem paraugu, pēc kādām pazīmēm nosaka to, kādam jābūt paraugam, ko ņem, kā arī kā notiek parauga uzglabāšana un nosūtīšana uz VAAD Nacionālo fitosanitāro laboratoriju.

## 2. Datu apkopošana.

Noslēdzoties apsekojumu veikšanai dabā, VMD veic visu iegūto datu apkopošanu. Konstatē reāli apsekoto nogabalu skaitu un apkopo rezultātus. Saņemot datus, no VAAD par baktēriju klātbūtni ņemtajos paraugos, apkopo datus par slimības izplatību Latvijas rietumu daļā. Iegūtie dati tiek apkopoti .SHP failu formātā un attēloti uz kartes.

## 3. Apsekojumu veikšana.

Apsekojumus, saskaņā ar izstrādāto metodiku, izvēlētajās mežaudzēs veica mežu apsaimniekotājs vai VMD. Apsekojumu veikšanā iesaistīti nacionālā meža monitoringa veicēji un privāto meža īpašnieki. VMD aizdomu gadījumā par simptomātisku koku klātbūtni, veica atkārtotus apsekojumus. Apsekojumi uzsākti 2018. gada otrā pusē – septembrī un oktobrī. Nākamajos gados apsekojumi veikti pavasarī, vasarā, rudenī. Pēc informācijas saņemšanas par aizdomīgiem ozoliem, apsekojumi veikti visas veģetācijas sezonas laikā.

## 4. Paraugu ņemšana no simptomātiskiem kokiem (miza un ekskudāts).

Paraugus ņēma VMD darbinieki no simptomātiskiem kokiem. Veicot plānotos apsekojumus vai saņemot informāciju par konstatētiem kokiem ar ozolu akūtās kalšanas raksturīgiem simptomiem, VMD speciālisti veica ārpuskārtas apsekošanu un nepieciešamības gadījumos ņēma paraugus.

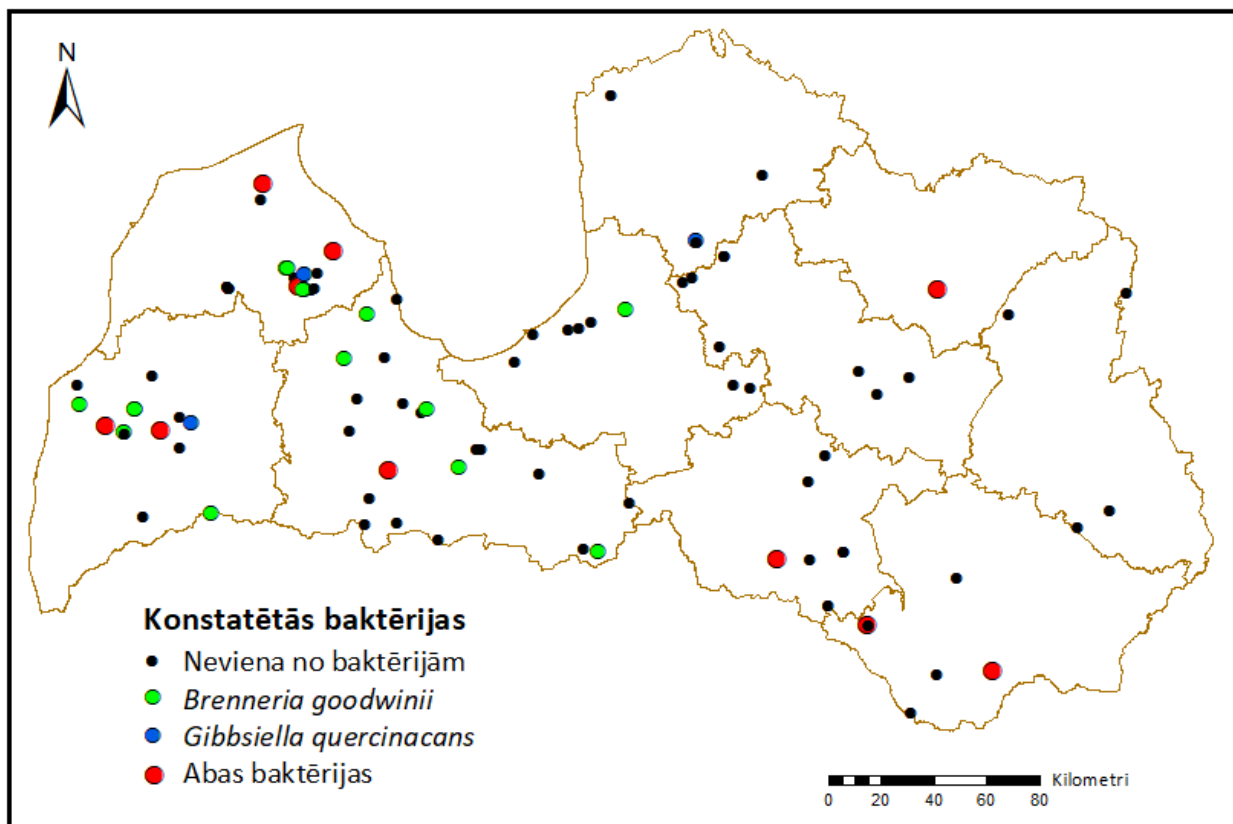
Paraugi, atbilstoši metodikai, nosūtīti uz VAAD Nacionālo fitosanitāro laboratoriju testēšanas veikšanai.

Paraugu ņemšana notika visa projekta īstenošanas perioda laikā.

1. tabula

Apsekojumu rezultāti projekta realizācijas periodā

Apsekojumu sezona	Apsekoto objektu skaits/ha	Noņemti paraugi	Konstatētas abas baktērijas	Konstatēta baktērija <i>Brenneria goodwinii</i>	Konstatēta baktērija <i>Gibbsiella quercinacans</i>
01.09. - 31.12.2018.	671/1292	23	7	12	0
01.01. - 21.10.2019.	436/765	28	3	1	2
21.10. - 15.09.2020.	17/nenoteikta platība	25	0	2	0
16.09. - 15.11.2021.	205/416	18	0	0	1



1.attēls. Vietas, kur Latvijas teritorijā projekta gaitā veikti apsekojumi un konstatētas ozolu akūtās kalšanas izraisošās baktērijas

#### 5. Paraugu testēšana.

Paraugu testēšanu veica VAAD Nacionālā fitosanitārā laboratorija.

Balstoties uz Lielbritānijas “*Forest research laboratory*” zinātnieku sniegtajām vadlīnijām, izveidota ievākto paraugu testēšanas metodika:

5.1. veikta reālā laika PCR metodes verifikācija *Gibbsiella quercinecans* testēšanai eksudātā;

5.2. veikta reālā laika PCR metodes verifikācija *Brenneria goodwinii* testēšanai eksudātā;

5.3. izstrādāta instrukcija bakteriālo paraugu sagatavošanai no baktēriju tīrkultūras;

5.4. izstrādāta instrukcija baktēriju izdalīšanai no vates kociņiem;

5.5. veikta baktēriju tīrkultūru izolēšanas metodes verifikācija no ozola mizas paraugiem.

Testēti simptomātisko ozolu mizas un eksudāta paraugi, ko paņēma VMD vai VAAD speciālisti.

Veikta paraugu (vates kociņu) testēšana uz baktērijām *Brenneria goodwinii* un *Gibbsiella quercinacans* ar reālā laika PCR metodi. Pozitīva rezultāta gadījumā, veikta baktēriju izolēšana no ozola mizas paneļiem un no vates kociņiem izdalītā eksudāta šķīduma.

Veicot uzsējumus uz dažāda sastāva bakteriālajām barotnēm noskaidrots, ka mērķa baktēriju kolonijas labāk atšķiramas, ja uzsējumi tiek veikti uz Saharozes barojošā agara (SNA) barotnes.

Baktēriju tīrkultūru apstiprināšana veikta izmantojot reālā laika PCR metodi. Izolētās baktēriju tīrkultūra ir nodotas LVMI "Silava" mikrobioloģisko pētījumu veikšanai.

6. Par inficētiem kokiem uzskaitīti tādi koki, kuros VAAD Nacionālā fitosanitārā laboratorija konstatējusi baktēriju klātbūtni.

7. Monitoringu parauglaukumu ierīkošana.

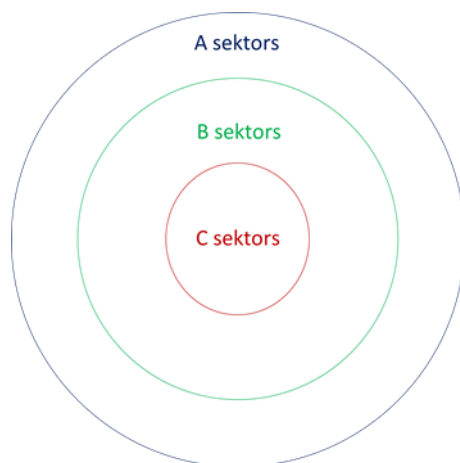
Monitoringa parauglaukumu ierīkošanu veica LVMI "Silava". Ierīkoti četri monitoringa parauglaukumi izolētās ozolu audzēs tādās vietās, kur ir augoši ozoli, kam konstatēta ozolu akūtā kalšana – Šķēde-1, Šķēde-2, Kazdanga, Cīrava. Izveidots mežaudžu apraksts – vecums, sugu sastāvs, meža tips. Novērtēta slimības progresija inficētiem kokiem, sadalot simptomus pa gradācijas klasēm un katru gadu sekots līdz jaunu infekcijas punktu (koku) veidošanās dinamikai laikā un telpā.

Katram parauglaukuma centram fiksētas ģeogrāfiskās koordinātes un tas dabā atzīmēts ar koka mietu.

Katrā audzē ierīko vienu 2000 m<sup>2</sup> (R=25,23 m) lielu parauglaukumu, ja, audzes (nogabala) konfigurācijas dēļ, nav iespējams ierīkot 2000 m<sup>2</sup> lielu parauglaukumu, tad ierīko divus 1000 m<sup>2</sup> (R=17,84 m) lielus parauglaukumus.

Parauglaukums tiek sadalīts trīs sektoros (2. attēls). A sektorā (visā parauglaukuma platībā) uzmērīti visus stāvošos ozolus (dzīvie un beigtie), kuru krūšaugstuma caurmērs ir lielāks par 10 cm. B sektorā uzmēra visus stāvošos kokus, kuru krūšaugstuma caurmērs ir lielāks par 10 cm, bet C sektorā uzmēra kokus, kuru krūšaugstuma caurmērs ir 6,1-10,0 cm.

Ja tiek ierīkoti divi 1000 m<sup>2</sup> lieli parauglaukumi, tad sektoru platības tiek samazinātas uz pusi.



2. attēls. Parauglaukumu shēma.

A sektors –  $R = 25,23$  m (2000 m<sup>2</sup>) vai 17,84 m (1000 m<sup>2</sup>), Ozoli  $D \geq 10,1$  cm; B sektors –  $R = 17,84$  m (1000 m<sup>2</sup>) vai 12,62 m (500 m<sup>2</sup>),  $D \geq 10,1$  cm; C sektors –  $R = 7,98$  m (200 m<sup>2</sup>) vai 5,64 m (100 m<sup>2</sup>),  $D \geq 6,1$  cm.

Katrs uzmērītais koks dabā numurēts, tam krūšaugstumā (1,3 m augstumā no sakņu kakla) pieskavots laminēts numurs. Uzmērītajiem kokiem fiksēts:

- ✓ koka numurs (unikāls parauglaukuma robežās);
- ✓ azimuts no parauglaukuma centra līdz koka sakņu kakla vidum (0,50 precizitāte);
- ✓ attālums no parauglaukuma centra līdz koka sakņu kakla vidum (1,0 cm precizitāte);
- ✓ sugu (sugas kods atbilstoši MSI klasifikatoram);
- ✓ krūšaugstuma caurmēru ar 0,1 cm precizitāti;
- ✓ stāvu (tas tiek fiksēts gan dzīviem, gan beigtajiem kokiem);
- ✓ krafta klasi (dzīvajiem kokiem) vai stāvokli (beigtajiem kokiem – sa vai st);
- ✓ bojājumu atbilstoši MSI klasifikācijai: bojājuma veids (2. tabula), bojājuma vieta (3. tabula), bojājuma intensitāte);
- ✓ baktēriju radītos bojājumus (5. tabula);
- ✓ sadalīšanās pakāpi (tikai beigtajiem kokiem) (4.tabula), beigtajiem kokiem atzīmē, ja koks uzmērīts bez mizas;
- ✓ koka augstumus ar 0,1 m precizitāti;
- ✓ koka vainaga sākuma augstumu tikai tādā gadījumā, ja tas ir skaidri saskatāms;
- ✓ piezīmēs var norādīt koka īpatnības.

B sektorā uzmēra celmus, tiem fiksējot azimutu un attālumu no parauglaukuma centra, sugu un caurmēru.



2. tabula

## Bojājumu veids

Nosaukums	Kods
Vējgāzes, vējlauzes, snieglauzes, snieglieces	10
Ūdens	20
Meža zvēri	30
Uguns	40
Slimības	50
Kaitēkļi	60
Mežizstrādes	70
Citi	80

3.tabula

## Bojājumu vieta

Nosaukums	Kods
Saknes un celmi līdz 30 cm virs sakņu kakla	10
Apakšējā stumbra daļa no celma līdz pirmajam zaļajam zaram	20
Viss stumbrs no celma augstuma līdz galotnei	30
Stumbra augšējā daļa no pirmā zaļā zara līdz galotnei	40
Galotne	50
Zari dzīvajā vainagā	60
Zari, kas izauguši no stumbra, resnāki par 2 cm	70
Pumpuri un dzinumi	80
Lapas un skujas	90

4.tabula

## Sadališanās pakāpe

Nosaukums	Kods
Svaigs koks ar mizu, lapas vai skujas saglabājušās	10
Cieta koksne bez mizas vai ar daļēji nokritušu mizu (izņemot bērzu)	20

Koksne nedaudz mīksta, tajā viegli var iedurt nazi 1 cm dziļumā	30
Koksne mīksta, tajā viegli var iedurt nazi 5 cm dziļumā	40
Koksne ļoti mīksta, tā drūp rokās	50

5.tabula

#### Baktēriju radītie bojājumi

Apraksts	Kods
Ozolam nav ozolu akūtās kalšanas simptomu	0
Ozolam ir senas brūces no kurām <b>neizdalās</b> eksudāts	1
Ozolam ir svaiga brūce no kuras <b>izdalās</b> eksudāts	2
Ozolam ir 2-3 svaigas brūces no kurām <b>izdalās</b> eksudāts	3
Ozolam ir vairāk par 3 svaigām brūcēm no kurām <b>izdalās</b> eksudāts	4

Ziņojumam pievienots pielikums ar monitoringa parauglaukumos ozolu mežaudžu aprakstu (vecums, sugu sastāvs, meža tips) un ikgadēji novērtētu slimības progresiju inficētiem kokiem, sadalot simptomus pa gradācijas klasēm un katru gadu sekots līdzī jaunu infekcijas punktu (koku) veidošanās dinamikai laikā un telpā.

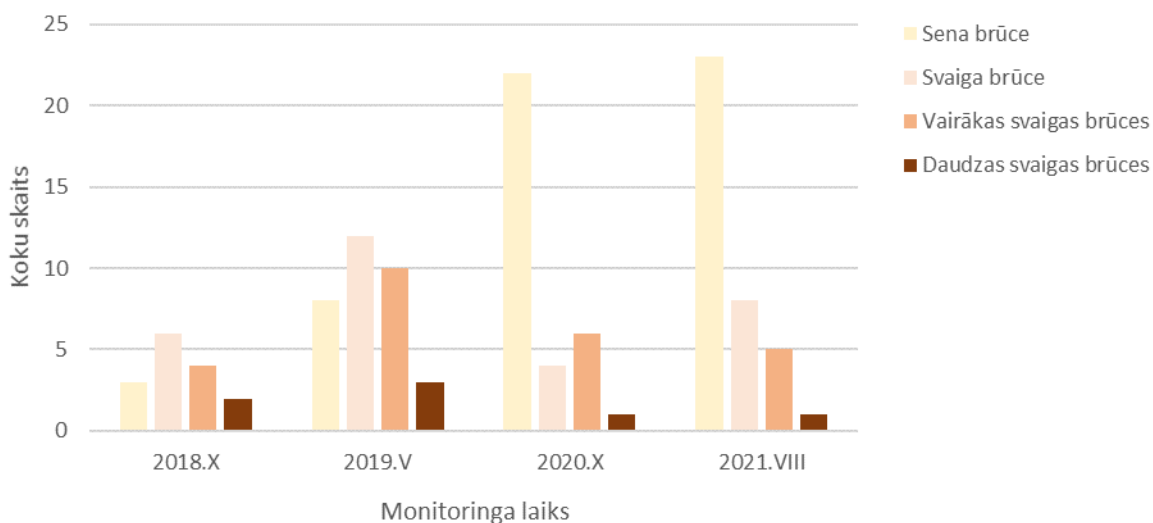
Veicot ievāktu datu statistisko analīzi, slimības simptomu raksturošanai izmantotas balles:

- 0- ozolam nav ozolu akūtās kalšanas simptomu
- 1- ozolam ir senas brūces no kurām neizdalās eksudāts
- 2- ozolam ir svaiga brūce no kuras izdalās eksudāts
- 3- ozolam ir 2-3 svaigas brūces
- 4- Ozolam ir vairāk par 3 svaigām brūcēm

Lai noteiktu slimības simptomu saistību ar koku dimensiņu, salīdzinātu izplatību starp parauglaukumiem un simptomu izmaiņas laikā, izmantota loģistiskā regresija, kas piemērota neparametrisku datu analīzei.

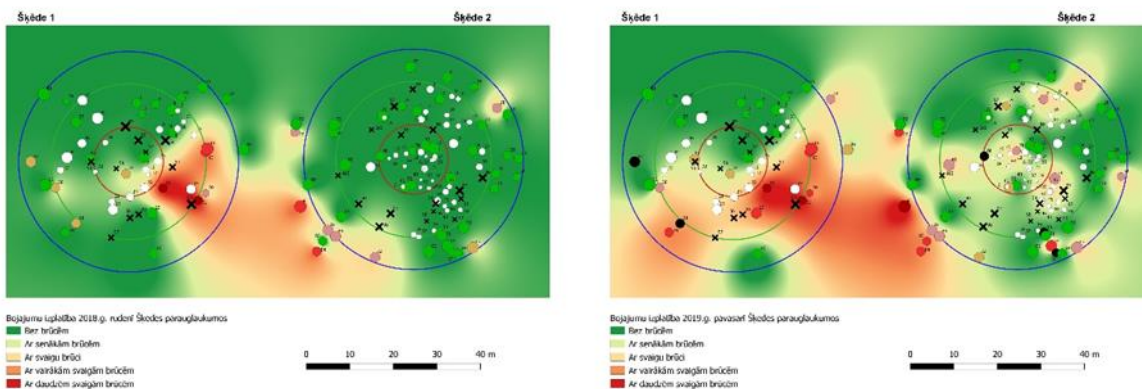
Veicot ozolu parauglaukumu apsekojumus 2021. gada augusta beigās, konstatēts, ka ozolu daudzums ar svaigu eksudātu, salīdzinot ar iepriekšējo gadu, nedaudz samazinājies. Tikai vienam kokam konstatētas daudzas sulojošās brūces un pieciem kokiem konstatētas vismaz divas brūces ar eksudātu. Ozolu ar slimības simptomiem sadalījums pa bojājuma klasēm parādīts 3. attēlā. 2021. gada rudens uzskaitē lielākajai daļai ozolu konstatētas senākas brūces, kuras vairs nesulojas. Arī

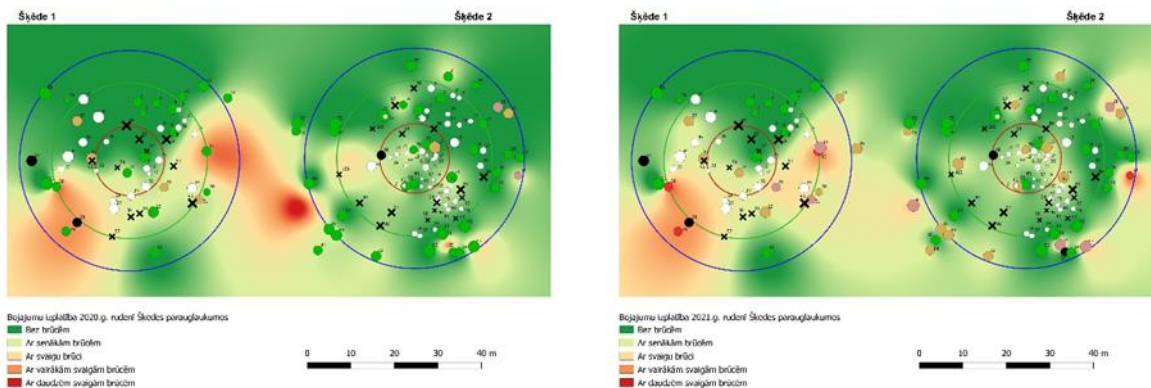
svaigo brūču sulošanās daudz mazāk izteikta salīdzinot ar 2019. gada pavasari. Kociem ir tendence atlabt.



3. attēls. Ozolu ar slimības simptomiem sadalījumu pa bojājuma klasēm izmaiņas laikā.

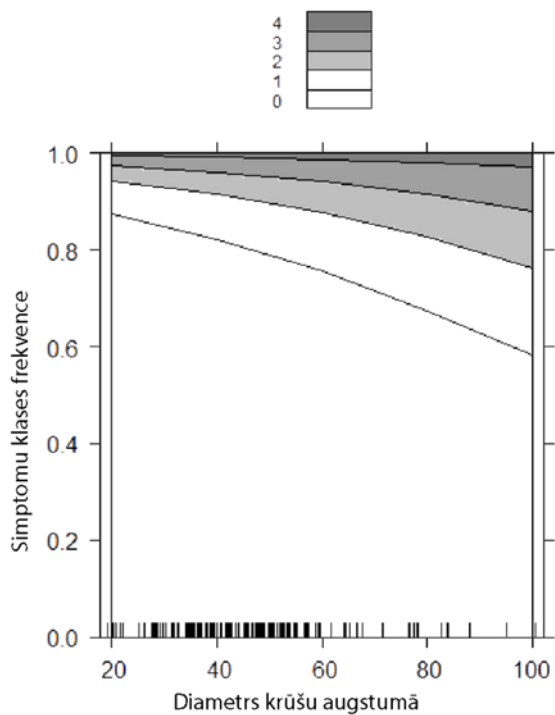
Novērtējot slimības izplatību Šķēdes parauglaukumos, var redzēt ka bojātie koki grupējas klasteros. Slimības maksimums ir 2019. gada pavasaris (4. attēls). 2019. gada pavasarī abos šķēdes parauglaukumos konstatēti svaigi nokaltuši ozoli.





4. attēls. Slimības simptomu un to izmaiņu telpiskais attēls (b-spline interpolation SAGA).

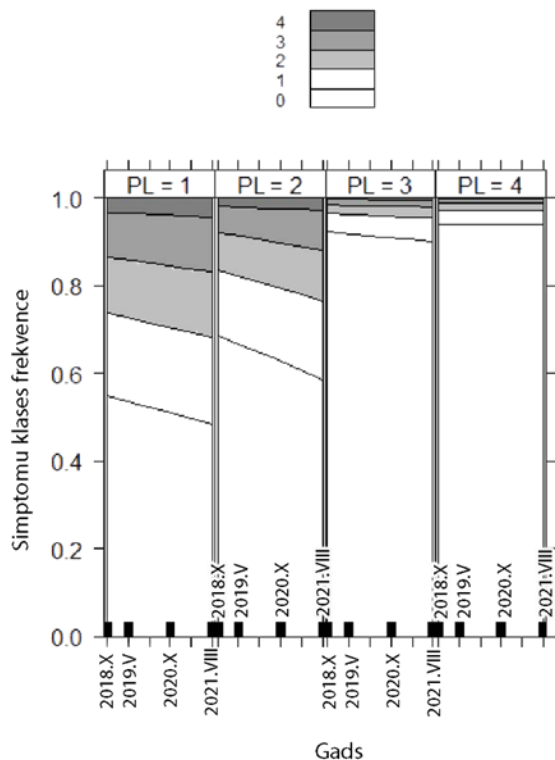
Novērtējot slimības pazīmju saistību ar koku diametru un izmaiņām laikā konstatēts, ka slimības izplatība būtiski atšķiras starp parauglaukumiem. Slimības izplatības izmaiņas pa gadiem nav statistiski būtiskas. Ozolu diametrs krūšu augstumā ietekmē simptomu sastopamību - resnākiem ozoliem slimības simptomi satopami biežāk (5. attēls).



5. attēls. Ozolu akūtās kalšanas slimības simptomu saistība ar ozolu diametru krūšu augstumā.

Novērtējot slimības izplatības reģionālās atšķirības var redzēt, ka Kazdangas un Cīravas parauglaukumos slimība izplatīta daudz mazāk nekā Šķēdes parauglaukumos (6.attēls). Lai arī

vizuāli slimības maksimums novērtēts kā 2019. gada pavasaris, statistiski būtiskas atšķirības starp slimības simptomu sastopamību starp gadiem netika konstatētas.



6. attēls. Akūtās ozolu kalšanas slimības simptomu atšķirība starp parauglaukumiem.

*Agrilus biguttatus* pētījumu ietvaros nav konstatēts pmonitoringa parauglaukumos vai citās apsekotās ozola audzēs.

8. Monitoringa parauglaukumos katru sezonu ievākti paraugi molekulāro pētījumu metodiku izstrādei.

6.tabula

Monitoringa parauglaukumos ievāktie paraugi pētījumu veikšanai

<p>Mizas paraugi indivīdiem ar slimības pazīmēm DNS izdalīšanai un paraugu uzglabāšanai ar nākotnes mērķi noteikt kopējo mikrobiālo profilu</p>	<p>2019. gads Ievākti 223 koksnes un mizas paraugi no 65 dažādiem ozola indivīdiem, un saglabāti pie -80°C 2020. gads</p>
---	---

	<p>Visi izdalītie DNS paraugi (25 augsnes, 25 zaru un dīgstu paraugi) reģistrēti un saglabāti pie -80°C.</p>
<p>Paraugi DNS izdalīšanai no nokaltušiem kokiem, augsnes un citiem augu audiem un apkārtējiem vides objektiem</p>	<p>2019. gads Kopumā ievākti 223 dažādi paraugi no 65 dažādiem ozola indivīdiem, kā arī koksnes un apkārtējās vides objektu. Papildus ievākti 48 augsnes paraugi</p> <p>2020. gads DNS izdalīts no 25 augsnes paraugiem ar iepriekš izstrādāta DNS izdalīšanas metodiku. Pirms DNS izdalīšanu no ozola zariem (pumpuriem) un dīgstiem, veikta virsmas sterilizācija. DNS izdalīta ar CTAB metodi.</p> <p>2021. gads DNS izdalīta no paraugiem, kuri ievākti no trīs ozolu akūtās kalšanas neskartām audzēm (Paplaka, Rudbārži un Ezere). Kopumā 24 koksnes paraugiem un 22 augsnes paraugiem noteikta <i>Gibbsiella quercinecans</i> un <i>Brenneria goodwinii</i> klātbūtne.</p>
<p>Koksnes un augsnes paraugi patogēno sēņu identificēšanai</p>	<p>2019. gads Katram inficētajam ozolam 2018. gada rudenī paņemts koksnes paraugs (33 paraugi), transportēts uz LVMI "Silava" laboratoriju, un paraugi uzglabāti +4°C temperatūrā</p> <p>2020. gads Šķēde-1 parauglaukumā ievākti 25 augsnes paraugi lineārā transektā, aptuveni divu metru attālumā. Ievākti uz zemes atrastās zaru galotnes ar pumpuriem un ozola dīgsti (divi dīgsti)</p>

	<p>2021. gads</p> <p>No ozolu akūtās kalšanas neskartām audzēm ievākti 24 koksnes paraugi un 22 augsnes paraugi no simptomātiski veselīgiem kokiem, lai novērtētu sēņu sugu sastāvu audzēs bez ozolu akūtās kalšanas</p>
<p>Patogēnās sēnes paraugu ievākšana un fitopatoloģiskā pārstrāde</p>	<p>2019. gads</p> <p>No 33 koksnes paraugiem sēņu micēliji izolēti un sargrupēti morfotipos. Kopā izdalīti 10 micēlija morfotipi. No katra morfotipa izvēlēts viens izolāts sugas noteikšanai</p> <p>2020. gads</p> <p>Sēņu sugu sastopamības salīdzinājums veselos un ar ozolu akūto kalšanu inficētos ozolos veikts, lai noskaidrotu, kādas sēņu sugas dabiski sastopamas ozolos kā to endofīti, un kuras varētu būt saistītas un/vai veicināt ar ozolu akūto kalšanu inficētu koku ātrāku bojāeju. Kopā ievākti un analizēti koksnes paraugi no 33 veselīgiem un 33 simptomātiskiem ozoliem.</p>
<p>Kāpuru un imago ievākšana no inficētiem ozoliem</p>	<p>2019. gads</p> <p>No parauglaukuma Šķēde-2 lauka darbu laikā atrasts un ievākts viens parastās otiņas (<i>Orgyia antiqua</i>) kāpurs. No parauglaukuma Šķēde-1 ievākts viens ērcu (<i>Ixodes spp.</i>) paraugs. Apsēkotos parauglaukumos <i>Agrilus biguttatus</i> nav konstatēts. Baktērijas <i>Brenneria goodwinii</i> klātbūtne konstatēta otiņas kāpurā, bet baktērijas <i>Gibbsiella quercinecans</i> analīze bija negatīva. Ērces parauga analīzes abām bakteriālām sugām bija negatīvas</p>

	2020. gads, 2021. gads <i>Agrilus biguttatus</i> , kā arī citi kukaiņu kaitēkļi apsekotos parauglaukumos netika konstatēti
--	--

**Baktērijas.** Monitoringa parauglaukumos ievākti paraugi molekulāro pētījumu veikšanai. Mērķis ir noteikt ar ozolu akūto kalšanu saistīto baktēriju (*Gibbsiella quercinecans* un/vai *Brenneria goodwinii*) klātbūtni vietās, kas nav tiešā veidā saistītas ar brūcēm ozola stumbros un eksudātā. Slimības izplatības ierobežošanas rekomendāciju izstrādei nepieciešams noteikt ar ozolu akūto kalšanu saistīto baktēriju atrašanos dažādos ozola koka audos, citās koku sugās, kā arī citos vides objektos (piem. nokaltušos ozola kokos, augsnē, u.c.). 2019.g. iegūtie dati liecināja, ka ar ozolu akūto kalšanu saistītas baktērijas atrastas gandrīz visos analizētos augsnes paraugos, bet arī atsevišķos citu veidu paraugos (citās koku sugās, nokaltušos ozola kokos, ozola zīlēs).

2020. gadā ar reālā laika PCR noteikta *Brenneria goodwinii* un *Gibbsiella quercinecans* klātbūtne DNS izdalīta no ozola zariem un dīgstiem (kopā 25 paraugi). *Gibbsiella quercinecans* pieci pozitīvi paraugi, 20 negatīvi. *Brenneria goodwinii* viens pozitīvs paraugs, negatīvie - 24. Visi pozitīvie rezultāti iegūti no zaru pumpuriem, kuri ievākti no zemes. Analizēti trīs ozola dīgsti, un visiem bija negatīvi rezultāti uz abām baktērijām. Analizēts viens dzīvs zars ievākts no ozolkoka stumbra, un iegūti negatīvi rezultāti abām baktērijām. Pozitīvie rezultāti abām baktērijām iegūti no atšķirīgiem paraugiem – nevienam paraugam nebija pozitīvs rezultāts abām baktērijām.

Ar reālā laika PCR noteikta *Brenneria goodwinii* un *Gibbsiella quercinecans* klātbūtne DNS izdalīta no augsnes paraugiem (25 paraugi). *Gibbsiella quercinecans* pozitīvie paraugi – septiņi, negatīvie - 17, jāatkārto analīzi vienam paraugam. *Brenneria goodwinii* pozitīvie paraugi – trīs, negatīvie - 22. Pozitīvs rezultāts abām baktērijām iegūts no diviem paraugiem. 2019. gadā augsnes analīzes uzrādīja pozitīvu rezultātu gandrīz viesiem analizētiem paraugiem. Tomēr šie paraugi tika ievākti pie ozola kokiem, salīdzinot ar 2020. gada paraugiem, kuri tika ievākti transektā, aptuveni 1 m attālumā caur Šķēdes-1 parauglaukuma centra. Cits iemesls atšķirīgiem rezultātiem varētu būt apstākļi, ka 2020. gadā ozolu akūtās kalšanas pazīmes visā Latvijā bija reti sastopamas, iespējams laika apstākļu ietekmē.

Kopumā, reālā laika analīzes dati par baktērijas sastopamību, liecina ka abas baktērijas nav izplatītas augsnē, bet tikai atrodamas dažos paraugos. Baktērijas nav izplatītas nokritušo zaru pumpuros, un analizētos ozola dīgstos un dzīvā zarā netika konstatēta nevienas baktērijas



klātbūtne. Iespējam 2020. gada rezultāti ietekmēti no tā, ka ozolu akūtās kalšanas pazīmes visā Latvijā bija reti sastopamas.

2021. gadā Šķēdes parauglaukumi apsekoti sešas reizes (21/05, 04/06, 09/06, 15/06, 21/06, 02/07). Eksudāts konstatēts tikai trīs dažādos indivīdos dažādos datumos. Kopumā ievākts un analizēts 21 eksudāta paraugs, no kuriem vienā konstatēja abas baktērijas, bet divos – tikai *Brenneria goodwinii*.

2021. gadā apsekotas trīs ozolu audzes, kurās ozolu akūtās kalšanas pazīmes nav novērotas – Paplaka, Rudbārži un Ezere. No katras audzes ar koka pieauguma urbi ievākti koksnes paraugi no astoņiem ozola indivīdiem. Blakus ozola kokiem, ievākti astoņi augsnes paraugi – Ezerē un Paplakā, Rudbāržos – seši paraugi. Koksne identificēts *Brenneria goodwinii* vienā paraugā (Rudbārži\_koksne\_2). Augsnē identificēts *Gibbsiella quercinecans* Ezerē (četros paraugos no astoņiem analizētiem), Paplakā (septiņos paraugos no astoņiem analizētiem), Rudbāržos (divos paraugos no astoņiem analizētiem). Augsnē identificēts *Brenneria goodwinii* vienā paraugā - Paplaka\_augsne\_3.

**Fitopatoloģija.** Ozolu akūtā kalšana ir kompleksa slimība, un dažādi faktori var ietekmēt inficētos kokus. Patogēnās sēņu sugas, kas inficē novājinātos, ar ozolu akūto kalšanu inficētos ozolus, iespējams, paātrina koku bojāeju. Dažādas sēņu sugas var arī pozitīvā veidā ietekmēt koka vitalitāti, piemēram, mikorizas. Iespējams, ka vitālāki indivīdi ir ar zemāku ozolu akūtās kalšanas sastopamību, vai arī izveseļošanās gaitu ozolu akūtās kalšanas inficēšanas gadījumos.

8.1.1. Sēņu sugu sastopamība ar ozolu akūto kalšanu inficētos un vizuāli veselos ozolos.

2018. gada rudenī četros ierīkotajos monitoringa parauglaukumos ar Preslera svārpstu pie sakņu kakla ievākti koksnes paraugi, lai analizētu sēņu sugu sastāvu ozolos ar ozolu akūtās kalšanas simptomiem un bez tiem. Kopā ievākti 66 koksnes paraugi: 33 no inficētiem un 33 no vizuāli veselām ozoliem. Urbumi laboratorijas apstākļos sterilizēti liesmā un uzlikti uz iesala-agara barotnes. No tiem augošais sēņu micēlijs izolēts atsevišķās Petri platēs, grupēts pēc morfoloģiskajām pazīmēm un noteikts līdz sugas vai ģints līmenim. Kopā identificētas 22 sēņu taksoni: līdz ģints līmenim noteikti četri, bet līdz sugas – 18 izolāti. Piecas sēņu sugas vai ģintis bija atrodamas gan inficētos, gan vizuāli veselos ozolos: *Ascocoryne cylichnium*, *Clonostachys rosea*, *Penicillium spp.*, *Mucor spp.* un *Trichoderma spp.* Kopā ar ozolu akūto kalšanu inficētos ozolos konstatēti 16 taksoni, bet vizuāli veselos kokos – 13. Sēņu sugu sastāvs veselos un inficētos kokos būtiski neatšķīrās.

Papildus 2021. gada rudenī ievākti koksnes paraugi 1,3 metru augstumā trīs ozolu audzēs bez ozolu akūtās kalšanas simptomiem Kurzemes dienvidu reģionā (Rudbārži, Paplaka un Ezere). Katrā audzē ievākti koksnes urbumi no astoņiem ozoliem. Paraugi apstrādāti pēc vienotas metodikas kā aprakstīts iepriekš. Kopā izdalītas 10 morfoloģiski atšķirīgas sēņu grupas (morfortipi), no kurām vairums raksturoja pelējuma sēnes.

8.1.2. Sēņu sugu sastāvs ar ozolu akūtās kalšanas inficētu ozolu brūču vietās.

2018. gada rudenī monitoringa parauglaukumos no ozoliem ar ozolu akūtās kalšanas pazīmēm ievākti 33 koksnes paraugi no brūču vietām, kur izdalās eksudāts. Koksnes paraugi ievākti un apstrādāti pēc vienotas metodikas kā aprakstīts 8.1.1. punktā. Kopā izdalītas deviņas sēņu sugas. Starp tām konstatētas trīs sēnes (*Fusarium spp.*, *Sporotrix sp.* un *Coniochaeta hoffmannii*), kas uzskatāmas par vājiem augu patogēniem. Konstatētās sēņu sugas neizraisa koku bojāeju, tomēr varētu veicināt ozolu aizsargspēju mazināšanos un uzņēmību pret citiem slimību izraisītājiem.

8.1.3. Sēņu sugu sabiedrības ar ozolu akūto kalšanu inficētās mežaudzēs.

2019. gada rudenī veikta monitoringam ierīkoto parauglaukumu apsekošana un sēņu augļķermeņu uzskaitē, lai noteiktu, vai un kādas patogēnās sēnes, kas varētu veicināt ozolu kalšanu, ir sastopamas audzē un vai audzēs sastopamas retas un aizsargājamas sēņu sugas, kuru dēļ jāizvērtē kalstošu un nokaltušu ozolu izvākšana. Apsekojuma laikā sēņu augļķermeņu sastopamība novērtēta gan uz visiem parauglaukumos esošiem ozoliem, gan uz zemesdzies parauglaukumu robežās. Uz koku stumbra un zemesdzies atrastie sēņu augļķermeņi ievākti un noteikti pēc tiem raksturīgajām morfoloģiskajām pazīmēm. Gadījumos, kad nebija iespējams noteikt sēņu sugu, tās noteiktas līdz ģints līmenim.

Visos parauglaukumos kopā konstatētas 63 sēņu sugas. Visbiežāk (visos četros parauglaukumos) atrastas divas sēņu sugas: *Hebeloma crustuliniforme* un *Mycena galericulata*. Abas ir Latvijā ļoti bieži sastopamas sugas, no kurām pirmā ir mikorizu veidojoša, savukārt otra – saprotrofa suga. Četras no konstatētajām sēņu sugām uzskatāmas par parazitāriem-saprotrofiem, kas spēj noārdīt gan dzīvu, gan nedzīvu koksni (*Armillaria sp.*, *Daedalea quercina*, *Grifola frondosa* un *Phellinus robustus*). Parauglaukumos konstatētas deviņas Latvijā reti vai ļoti reti sastopamas sēņu sugas, no kurām trīs (*Gymnopilus frondosa*, *Hymenopellis radicata* un *Otidea onotica*) iekļautas Ministru kabineta 2000. gada 14. novembra noteikumos Nr. 396 “Noteikumi par īpaši aizsargājamo sugu un ierobežoti izmantojamo īpaši aizsargājamo sugu sarakstu”. Iegūtie rezultāti

liecina, ka ozolu akūtās kalšanas monitoringa parauglaukumos ir daudzveidīgs sēņu sugu sastāvs, saimnieciskā darbība var ietekmēt sēņu sugu sastopamību un daudzveidību.

7. tabula

No ozolu sakņu kakla izdalītiem sēņu taksoniem monitoringa parauglaukumos

Sēņu taksons	Parauglaukums				Visi parauglaukumi, N=33 / 33
	Cīrava, N=3 / 3*	Kazdanga, N=3 / 2	Šķēde-1, N=14 / 13	Šķēde-2, N=13 / 15	
<i>Annulohyoxylon multiforme</i>			1 (7%)/ 0		1 (3%)/ 0
<i>Armillaria cepistipes</i>		0/ 1 (50%)			0/ 1 (3%)
<i>Ascocoryne cylichnium</i>		1 (33%)/ 1 (50%)	1 (7%)/ 1 (8%)	0/ 2 (13%)	2 (6%)/ 4 (12%)
<i>Cladosporium sp.</i>				0/ 1 (7%)	0/ 1 (3%)
<i>Clonostachys rosea</i>				1 (8%)/ 1 (7%)	1 (3%)/ 1 (3%)
<i>Coniochaeta hoffmannii</i>			0/ 1 (8%)		0/ 1 (3%)
<i>Coniophora puteana</i>				0/ 1 (7%)	0/ 1 (3%)
<i>Dothiorella sp.</i>			0/ 1 (8%)		0/ 1 (3%)
<i>Glutinomyces inflatus</i>	0/ 1 (33%)				0/ 1 (3%)
<i>Hypoxylon rubiginosum</i>				1 (8%)/ 0	1 (3%)/ 0
<i>Mariannaea elegans var. elegans</i>	1 (33%)/ 0				1 (3%)/ 0
<i>Metapochonia bulbilosa</i>				0/ 1 (7%)	0/ 1 (3%)
<i>Mucor spp.</i>	1 (33%)/ 1 (33%)		2 (14%)/ 0	4 (31%)/ 2 (13%)	7 (21%)/ 3 (9%)
<i>Mycena polygramma</i>				0/ 1 (7%)	0/ 1 (3%)
<i>Nemania serpens</i>				1 (8%)/ 0	1 (3%)/ 0
<i>Obolarina dryophila</i>				1 (8%)/ 0	1 (3%)/ 0
<i>Penicillium spp.</i>	2 (67%)/ 3 (100%)	2 (67%)/ 1 (50%)	12 (86%)/ 13 (100%)	13 (100%)/ 14 (93%)	29 (88%)/ 31 (94%)

<i>Simplicillium aegoshimaens</i>		1 (33%)/ 0	1 (7%)/ 0		2 (6%)/ 0
<i>Sporothrix sp.</i>	1 (33%)/ 0	2 (67%)/ 0			3 (9%)/ 0
<i>Trichoderma spp.</i>	2 (67%)/ 1 (33%)	2 (67%)/ 2 (100%)	3 (21%)/ 6 (46%)	2 (15%)/ 2 (13%)	9 (27%)/ 11 (33%)
<i>Trichoderma viride</i>	1 (33%)/ 0				1 (3%)/ 0
<i>Truncatella angustata</i>			0/ 1 (8%)		0/ 1 (3%)

\* stādu skaits, kam konstatēta attiecīgā sēņu suga: skaits veselā kokā (%) / skaits inficētā kokā (%).

#### 8.1.4. Ozolu īssakņu vitalitātes un mikorizācijas novērtējums

2019. gada rudenī ievākti augsnes paraugi no monitoringa parauglaukumiem, lai izvērtētu īssakņu vitalitāti un mikorizāciju kalstošo ozolu audzēs saistībā ar augsnes pH. Katrā monitoringa parauglaukumā ievākti līdzīgs skaits augsnes paraugu no simptomātiskiem un veselīgiem ozoliem. Kopā pētījumā iekļauti dati par 40 ozoliem (20 inficēti un 20 vizuāli veseli). Augsnes paraugi ievākti ar metāla augsnes zondi 5-10 cm dziļumā viena metra attālumā trīs atkārtojumos no katra koka. Saknes tika atdalītas no augsnes un to vitalitāte novērtēta zem stereomikroskopa. Papildus noteikts augsnes pH KCl izvilkumā.

Augsnes pH vidējā vērtība Cīravas un Kazdandas audzē bija 4, bet Šķēdes objektos – 5,1 un 4,3. Relatīvi augstāks augsnes pH bija paraugos no inficētajiem kokiem (respektīvi 4,7 inficētajos un 4,4 – neinficēto koku paraugos), taču atšķirības nebija būtiskas. Gan neinficēto, gan inficēto koku paraugos dominēja vitālās saknes (61% un 54%, attiecīgi neinficēto un inficēto koku paraugos). Sakņu vitalitāte starp audzēm būtiski neatšķīrās. Visi konstatētie mikorizu tipi atrasti kā inficēto, tā neinficēto koku paraugos. Iegūtie rezultāti neparāda būtiskas atšķirības starp inficētajiem kokiem un neinficētajiem ne augsnes pH, ne sakņu mikorizācijas ziņā. Līdz ar to secinām, ka ozolu kalšana nav tieši saistīta ar sakņu mikorizāciju un augsnes skābumu.

#### 9. Molekulāro metožu aprobācija/izstrāde.

8. tabula

#### Veiktie darbi pētījuma molekulāro metožu izstrādei

Metodikas izstrāde baktērijas tīrkultūras sekvenēšanai izmantojot MLST ( <i>Multilocus sequence typing</i> )	2019. gads Atlasīta metodika <i>Brenneria goodwinii</i> dažādu izolātu ģenētiskās daudzveidības noteikšanai
--	--

Izstrādāta metodika kopējās DNS izdalīšanai no nokaltušajiem kokiem	2019. gads DNS izdalīta ar CTAB metodi, kurā ieviestas modifikācijas
Izstrādāta metodika kopējās DNS izdalīšanai no ozola kambija, saknēm u.c. audiem	2019. gads DNS izdalīts no ozola kambija, u.c. audiem (t.sk. ozola zilēm un citu koku sugu lapām), izmantojot CTAB metodi
Izstrādāta metodika kopējās DNS izdalīšanai no vides objektiem (t.sk. augsne, vaboles, kāpuri)	2019. gads DNS izdalīta no augsnes paraugiem, izmantojot DNEASY POWERSOIL KIT (Qiagen), izmantojot ražotāja protokolu
Izdalītās DNS kvantitātes noteikšana un kvalitātes noteikšana izmantojot attiecīgos DNS praimerus	2019. gads DNS koncentrācija ar Nanodrop spektrofotometru, veikta reālā laika PCR analīze 2020. gads DNS koncentrācija ar Nanodrop spektrofotometru, veikta reālā laika PCR analīze
Baktēriju izdzīvotības noteikšanas nokaltušajos kokos un citos augu audos un apkārtējos vides objektos metodikas izstrāde	2019. gads Veikta sekmīga jauno <i>Gibbsiella quercinecans</i> detektēšanas praimeru aprobācija
Metodikas izstrāde baktērijas klātbūtnes noteikšanai <i>Agrilus biguttatus</i> (šaurspārņu krāšņvabolei)	2019. gads <i>Agrilus biguttatus</i> nav konstatēts apsekotajos parauglaukumos. Izmantojot reālā laika PCR, <i>Brenneria goodwinii</i> DNS klātbūtne konstatēta vienā parastās otiņastes kāpurā
Baktēriju tīrkultūru sekvenču noteikšana ar MLST (Multilocus sequence typing)	2019. gads Atlasīta metodika <i>Brenneria goodwinii</i> ģenētiskās daudzveidības noteikšanai
Baktēriju identificēšana monitoringa parauglaukumos atlasītajos paraugos	2019. gads Veiktas baktēriju reālā laika PCR analīzes. Analizēti 189 ozolu koksnes un apkārtējās vides objektu paraugi uz <i>Brenneria goodwinii</i> un <i>Gibbsiella quercinecans</i> klātbūtni
Patogēno sēņu identificēšana	2019. gads Patogēno sēņu identificēšanai zem ozolu akūtās kalšanas izraisītajām brūcēm, ievākts un tīrkultūrā septiņiem paraugiem izdalīts sēnes micēlijs. Sekvencēšana veikta uzņēmumā "Macrogen", Nīderlandē. Notiek iegūto datu apstrāde un analīze.
DNS izdalīšana no ozola indivīdiem ar slimības pazīmēm un veselīgiem ozoliem (ievāktie koksnes vai lapu paraugi),	2019. gads DNS izdalīta no 65 parauglaukumos atzīmētiem ozoliem

iegūstot ozola koka DNS paraugus	
DNS paraugu genotipēšana ar hloroplasta un kodola marķieriem	2019. gads Aprobēti ozola DNS marķieri, un atlasīti pieci mikrosatelītu un pieci hloroplasta marķieri turpmākai analīzei

## 10. Mikrobioloģiskie pētījumi

9.tabula

### Projekta gaitā veiktie mikrobioloģiskie pētījumi

Baktēriju tīrkultūru sekvenču noteikšana ar MLST ( <i>Multilocus sequence typing</i> )	2020. gads MLST metode izmantota, lai analizētu no VAAD iegūtas četras baktērijas tīrkultūras – 5T ( <i>Gibbsiella quercinecans</i> , Daugavpils), 7T ( <i>Gibbsiella quercinecans</i> , Vīdale), 6T ( <i>Brenneria goodwini</i> , Vīdale), 8T ( <i>Brenneria goodwini</i> , Daugavpils)
Baktēriju identificēšana monitoringa parauglaukumos atlasītajos paraugos	2020. gads Veiktas baktēriju reālā laika PCR analīzes. <i>Brenneria goodwinii</i> un <i>Gibbsiella quercinecans</i> klātbūtne analizēta izdalītā DNS no ozola zariem (pumpuriem) un dīgstiem (25 paraugi) un augsnes paraugiem (25 paraugi)
Patogēno sēņu identificēšana	2020. gads Parauglaukumos Šķēde-1, Šķēde-2, Kazdanga un Cīrava atrasti attiecīgi 15, 24, 18 un 39 sēņu taksoni
Ievākt koksnes un lapu paraugus ozola DNS izdalīšanai no indivīdiem ar ozolu akūtās kalšanas pazīmēm un veselīgiem ozoliem	2020. gads DNS izdalīta no paraugiem ar modificētu CTAB metodi.
izveidot ozola koka DNS kolekciju	2020. gads Koksnes paraugi ievākti no visiem ozoliem parauglaukumos, DNS izdalīta, un izveidota DNS kolekcija.
DNS izdalīšana no ozola indivīdiem ar slimības pazīmēm un veselīgiem ozoliem (ievāktie koksnes vai lapu paraugi), iegūstot ozola koka DNS paraugus	2020. gads DNS izdalīts no 25 ievāktiem ozola dīgstiem un pumpuriem
DNS paraugu genotipēšana ar hloroplasta un kodola marķieriem	2020. gads

	Aprobēti ozola DNS marķieri, un atlasīti pieci mikrosatelītu un pieci hloroplasta marķieri turpmākai analīzei
Ozolu sakņu vitalitātes novērtējums	2019. gads Izvērtēta īssakņu vitalitāte un mikorizācija kalstošās ozolu audzēs saistība ar augsnes pH.
Sēņu sugu sabiedrības veselos un inficētos ozolos	2019. gads Veikta monitoringam ierīkoto parauglaukumu apsekošana un sēņu augļķermeņu uzskaitē, lai noteiktu patogēnās sēnes, kas varētu veicināt ozolu kalšanu.
Augsnes paraugi	2020. gads Kopējā DNS izdalīta no augsnes ar PowerSoil komplektu (Qiagen) vai ekvivalentu.

11. Veikta informācijas iegūšana, apmaiņa un komunikācija ar ozolu akūtās kalšanas pētniekiem un citu valstu atbildīgiem dienestiem, komunikācija ar Polijas fitopatoloģijas ekspertiem, sarakste ar Lielbritānijas zinātniekiem, informēta sabiedrība – izveidots *Twitter* kots “Ozoliem būt”, sniegtas intervijas medijiem, sniegtas atbildes privātpersonām par ozolu akūto kalšanu:

11.1. Informēšana par ozolu akūtās kalšanas izplatību Latvijā starptautiskajās sanāksmēs un darba grupās:

- Ziemeļvalstu Fitopatologu sanāksmē Latvijā (prezentācijas);
- Ziemeļvalstu un Baltijas valstu laboratoriju sanāksmē Tallinā, Igaunijā (prezentācija);
- Ukrainas laboratorijas speciālistu iepazīstināšana ar ozolu akūto kalšanu, ES starptautiskās mērķsadarbības *Twining* projekta ietvaros (prezentācija);
- Eiropas un Vidusjūras reģiona valstu augu aizsardzības organizācijas (EPPO) laboratoriju vadītāju sanāksmē Parīzē (diskusija);
- *Zamieranie Drzewostanów w Polsce – Przyczyny i Konsekwencje*, LKP “*Puszcza Świętokrzyska*” *Acute Oak Decline – nowe zagrożenie dla drzewostanów dębowych w Polsce* (prezentācija sadarbībā ar M. Tkaczyk (*Forest Research Institute (IBL), Poland*)) Polijas mežu izpētes organizāciju sanāksmē, Varšavā, Polijā.

11.2. Piedalīšanās starptautiskajās zinātniskajās konferencēs:

- Viskrievijas Augu karantīnas centra starptautiskajā zinātniskā konference Maskavā, Krievijā (prezentācija un iesniegtas tēzes);

- II starptautiskajā konferencē “Mūsdienu problēmas mežu aizsardzībā un to iespējamie risinājumi” (*“Modern Problems of Forest Protection and Ways of their Solution”*) Minskā, Baltkrievijā (iesniegtas tēzes)
- Starptautiskā mežkopības foruma “Mežsaimniecība–2021” konferencē “Mežu ekosistēmas kā globālās biosfēras resurss: izaicinājumi, draudi, risinājumi” (*“Forest ecosystems as a global biosphere resource: challenges, threats, solutions”*) Voroneža, Krievija (iesniegtas tēzes)

#### 11.3. Publikācijas starptautiskās konferencēs:

- Brūna L., Burņeviča N., Gaitnieks T. (2019). *Fungal richness in Acute Oak Decline infected Quercus robur L. in Latvia. In: Mleczko P. (ed.), Abstract Book, XVIII Congress of European Mycologists, 16-21 September 2019, Warsaw-Białowieża, Poland. Polish Mycological Society, Warsaw, p. 193.*

#### 11.4. Publikācijas starptautiski citētos zinātniskajos žurnālos:

- Tkaczyk, M., Celma, L., Ruņģis, D. E., Bokuma, G. 2021. *First report of Brenneria goodwinii and Gibbsiella quercinecans bacteria, detected on weaken oak trees in Poland. Baltic Forestry. 27: 1, DOI: 10.46490/BF563.*
- Zalkalns, O., Celma, L. 2021. *The distribution of bacteria Gibbsiella quercinecans and Brenneria goodwinii in oak (Quercus robur L.) stands in Latvia. Forestry, IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science 875, DOI: 10.1088/1755-1315/875/1/012033.*

#### 11.4. Sabiedrības informēšana:

- izstrādāts informatīvs materiāls par ozolu akūtās kalšanas pazīmēm un ziņošanas kārtību;
- sociālajā tīklā Twitter izveidots konts “Ozoliem būt” (111 sekotāji), projekta laikā katru mēnesī veidoti kā minimums 20 ieraksti par ozolu akūto kalšanu, par projektā paveikto, kā arī interesanti fakti saistībā ar ozoliem, sniegtas atbildes uz iedzīvotāju jautājumiem;
- projekta laikā, projektā iesaistīto pušu ekspertu snieguši intervijas medijiem (TV, radio, drukātajiem un interneta izdevumiem).



12. Projekta ietvaros, VAAD Nacionālās fitosanitārās laboratorijas galvenā eksperte izstrādā doktordarbu “Baktēriju un apkārtējas vides faktoru nozīme ozolu akūtās kalšanas simptomu attīstībā Latvijas teritorijā augošajiem ozoliem”. Darba vadītājs dr.biol. Dainis Edgars Ruņģis.

Izstrādāts bakalaura darbs izmantojot pētījumā iegūtos rezultātus. - Vīcupa V. (2019). Sēņu sugu sastopamība ar ozolu akūtās kalšanas slimību inficētā parastā ozola *Quercus robur* L. koksnē. Bakalaura darbs, Latvijas Universitāte, 27 lpp.

### ***Kopsavilkums:***

1. Ozolu akūtā kalšana ir kompleksa saslimšana, kas var attīstīties vairāku atšķirīgu faktoru (ne tikai baktēriju) ietekmē. Tās attīstību var ietekmēt arī abiotiski faktori, piemēram, sausums.
2. Baktērijas *Gibbsiella quercinecans* un *Brenneria goodwinii* satopamas visā Latvijas teritorijā gan ozolu mežaudzēs, gan atsevišķi augošos kokos.
3. Apsekotos parauglaukumos šaurspārnu krāšņvabole *Agrilus biguttatus* (literatūrā minēts kā iespējamais baktēriju *Gibbsiella quercinecans* un *Brenneria goodwinii* pārnēsātājs) nav konstatēts.
4. Pazīmes – ekskudāta tecēšana no inficētiem kokiem – atkarīga no laika apstākļiem.
5. Baktērijas *Gibbsiella quercinecans* un *Brenneria goodwinii* vienmēr nav sastopamas eksudāta paraugos, un to sastopamība var mainīties vienas sezonas ietvaros.
6. Baktērijas *Gibbsiella quercinecans* un *Brenneria goodwinii* bieži sastopamas augsnes paraugos, ieskaitot augsnes paraugos, kuri ievākti no audzēm, kur ozola indivīdiem nav konstatētas ozolu akūtās kalšanas pazīmes. Baktērijas visbiežāk sastopamas augsnes paraugos, kuri ievākti tieši pie ozola indivīdiem.
7. Ar ozolu akūto kalšanu inficētie ozola koki ne vienmēr aiziet bojā.
8. Inficēto koku izciršana mežaudzēs neaptur ozolu akūtās kalšanas izplatību, bet var negatīvi ietekmēt sēņu sugu, tai skaitā retu un aizsargājamu sugu, sastopamību.
9. Sēņu sugu sastāvs inficētu un vizuāli veselu ozolu koksnē būtiski neatšķiras.
10. Ozolu akūtā kalšana nav tieši saistīta ar sakņu mikorizāciju un augsnes skābumu.
11. Pētījuma ietvaros nav noskaidrots slimības izplatīšanās vektors.

12. Iespējams, ka ozolu akūtās kalšanas slimībai un pazīmēm ir ciklisks raksturs (vairāku gadu periodā), tomēr pētījuma ietvaros nav atrastas korelācijas ar slimības izplatību un klimatiskiem apstākļiem.

***Secinājumi no parauglaukumu monitoringa:***

1. Slimības simptomu maksimums bija 2019. gada pavasarī. 2020. gadā un 2021. gadā slimības simptomu izplatība samazinās.
2. Bojātiem kokiem ir tendence grupēties klasteros.
3. Lielu dimensiju ozoliem slimību simptomi novērojami biežāk.

***Risinājumi (ieteikumi) ozolu akūtās kalšanas ierobežošanai Talsu paugurainē, kuri pēc nepieciešamības piemērojami arī pārējā Latvijas teritorijā:***

1. Zaļos inficētos ozola kokus necirst mežizstrādes laikā.
2. Veikt inficēto ozolu koku novērošanu – ekskudāta klātbūtni, kā arī kopējo veselības stāvokli (piemēram, vainaga vai zaru kalšanu). Ja inficēšanās pakāpe būtiski palielinās, sazināties ar VMD speciālistiem, kas novērtēs katra koka individuālo stāvokli un sniegs individuālas rekomendācijas.
3. Pievērst pastiprinātu uzmanību ozolu kokiem ar lielāku caurmēru, kas potenciāli var būt slimības upuri.
4. Kalstošie koki apbūves teritorijās un parkos, ja to vainagā ir sausie zari, jāapseko sertificētiem arboristiem un vienlaikus veicot vainaga sakopšanas darbus.
5. Nokaltušie ozola koki cērtami atbilstoši likumdošanas prasībām (ievērot arī dabas aizsardzības prasības).
6. Pēc saimnieciskiem darbiem Talsu paugurainē, tehniku un darbarīkus notīrīt.
7. Ārpus Talsu pauguraines, vietās (nogabalos) kur konstatēta ozolu akūtā kalšana, iespēju robežās neplānot saimniecisko darbību mežā, lai novērstu augsnes un augu daļu pārnesanu uz platībām, kas ir brīvas no ozolu akūtās kalšanas.