

ERAF projekts Nr. 2014/0025/2DP/2.1.1.1.0/14/APIA/VIAA/101
„Veģetatīvi pavairojamo ātraudzīgo koku sugu identifikācijas
tehnoloģijas izstrāde”


Dr. chem. I. Veinberga

31.08.2015.

Zinātniskā atskaite

Salaspils

2015.

KOPSAVILKUMS

Pēc enerģētiskās krīzes pagājušā gadsimta septiņdesmitajos gados sākās mērķtiecīgs darbs pie alternatīvā kurināmā ieguves iespējām, tika pētītas iespējas izmantot šim nolūkam ātraudzīgās koku un krūmu sugas. Visbiežāk ātraudzīgo lapu koku plantāciju ierīkošanai tiek izmantoti kārkli par pamatu ņemot dažādas liela auguma kārklu sugas, kas labi apsakņojas un strauji veido dažus liela auguma stāvus dzinumus.

Kārklu, vītolu ģints (*Salix*) ietilpst vītolu dzimtā (*Salicaceae*). Kokus dēvē par vītoliem, bet krūmus par kārkliem. Savvaļā Latvijā sastopamas 18 šīs ģints sugas. Bez tam ļoti izplatīta ir arī starpsugu hibridizācija, kas ļoti apgrūtina izvēlēta materiāla identifikāciju pēc to morfoloģiskajām īpašībām ātraudzīgo plantāciju ierīkošanai.

Latvijā kārklus izmanto arī tautas daiļamatniecībā veidojot daudzus un dažādus pinumu izstrādājumus. Katrs pinējs kā izejas materiālu izmanto vai nu savvaļā ievāktu, vai arī no ārzemēm ievestus kārklus, kas tiek atlasīti pēc pinumu izgatavošanai labākajām īpašībām (elastības, krāsas). Katra pinēja saimniecībā izveidotas veģetatīvu pavairojamu klūgu kārklu plantācijas. Klūgu kārkli tiek audzēti arī dažās kokaudzētavās. Tomēr šo kārklu sugas lielāko tiesu nav zināmas, netiek arī pārbaudīta plantāciju viendabība.

Kārklu ģints taksonomiskā ziņā ir ļoti sarežģīta. Sugu noteikšanu sarežģī daudzie hibrīdi, sugu morfoloģiskā daudzveidība un mainība konkrētos ekoloģiskos apstākļos. Tāpēc iegūtie paraugi pēc to morfoloģiskajām pazīmēm tika salīdzināti ar herbāriju. Arī tad visos gadījumos neizdevās identificēt sugu vai hibrīdus. Tāpēc papildus tika pētīta to ploīditāte, izmantojot plūsmas citometru. Atsevišķu sugu un to hibrīdu ploīditāte ir atšķirīga (pielikums Nr.7).

Izveidotajā Latvijas ātraudzīgo lapu klonu reģistrā iekļauti:

- Latvijas teritorijā esošo kārklu kloni ar vislabāko koksnes īpašību un ātraudzības kombināciju,
- Latvijas klūgu kārklu audzētāju rīcībā esošie ģenētiskie resursi,
- dažādu reģionu labāko kārklu audžu indivīdi, no kuriem paņemts materiāls un ierīkoti stādījumi turpmākai kārklu selekcijai nepieciešamā materiāla audzēšanai (mātes dārzi),
- Latvijā izveidoto klonu 'Monika' un 'Visvaldis' iezīmēti indivīdi,
- Latvijā ievestās un aprobētās ārzemju ātraudzīgo kārklu šķirnes,
- Latgales reģiona blīgzna (*Salix caprea*) un dažādu Latvijas reģionu baltā vītola (*Salix alba*) populāciju indivīdi, kuri paredzēti populāciju ģenētiskajai izpētei,
- alkšņu sēkļu plantācijas un no tām izveidotā stādījuma dažādas pakāpes hibrīdi,

Latvijā identificētie papeles (*Populus tremula*) kloni (Pielikums Nr. 1).

Kārķļu ātraudzīgās šķirnes-kloni ir veidoti no Latvijā sastopamām koku sugām, līdz ar to, to klonu atpazīšana pēc morfoloģiskajām pazīmēm ir ļoti sarežģīta un bieži kļūdaina.

Izmantojot DNS marķierus izstrādāta ātraudzīgo lapu koku šķirņu **molekulāri ģenētiskās identifikācijas metodika** (pielikums Nr. 2). Veģetatīvi pavairojamo ātraudzīgo sugu klonu identifikācija ar DNS marķieriem sniedz ievērojamas priekšrocības, salīdzinot ar identifikāciju pēc morfoloģiskajām pazīmēm.

Ar DNS marķieriem:

- iespējams noteikt klonu identitāti ar augstu izšķirtspēju un ticamības pakāpi;

- iespējams atšķirt tuvradnieciskus indivīdus;

- iespējams veikt analīzes jebkurā gada laikā un jebkurā augu attīstības posmā;

- klona identifikāciju iespējams veikt īsā laika periodā.

Molekulāri ģenētiskās identifikācijas metodikā izmantoti SSR (Simple Sequence Repeat) marķieri. Tie ir ļoti piemēroti klonu identifikācijai, jo ir informatīvi, atkārtojami un tiem ir augsta izšķirtspēja. Molekulārie marķieri parasti ir specifiski vienai sugai, tādēļ katrai analīzei pakļautajai sugai tie ir īpaši jāizstrādā vai jāaprobē.

Izstrādātā ātraudzīgo lapu koku identifikācijas metodika satur sekojošas nodaļas:

1. DNS izdalīšana (1., pielikums Nr. 2)

Izejmateriāls - kārķļu, alkšņu un papeļu lapas vai jauni zariņi. Protokolā izmanto Genomic DNA Purification Kitu. Iegūtā DNS preparāta koncentrāciju un kvalitāti pārbauda spektrofotometriski. Katram DNS paraugam tiek piešķirts numurs un tas ievietots **DNS kolekcijā** (pielikums Nr. 4).

DNS kolekcija atrodas LVMI Silava Ģenētisko resursu centra 158.telpā saldētavā "Haier Bio-Medical" -80°C.

DNS kolekcijā ievietoti:

1179 kārķļu (*Salix* spp.) DNS paraugi,

118 papeļu (*Populus tremula*) paraugi,

240 alkšņu (*Alnus* spp.) DNS paraugi.

Izveidotā Latvijas veģetatīvi pavairojamo ātraudzīgo koku sugu DNS kolekcija nākotnē dos iespēju salīdzināt jaunizveidotus vai iegūtus klonus ar esošiem kloniem, kā arī nodrošināt jau identificētu klonu atkārtotu analīzi gadījumos, kad tiek mainīta marķieru, reaģentu vai cita metodikas daļa. Kolekcijā esošo DNS materiālu būs iespējams izmantot ātraudzīgo lapu koku populāciju pētījumos, kā arī jaunu ātraudzīgo klonu

selekcijā.

2. Kārķļu (*Salix spp.*) genotipēšana

No literatūras datiem kārķļu genotipēšanai atlasīti un aprobēti 17 kodola DNS mikrosatelītu marķieri. No tiem atlasīti 8, ar kuriem iespējams iegūt labi identificējamus polimorfus amplikonus (Pielikums Nr. 3). Literatūrā aprakstītās kārķļu genotipēšanas analizē parasti katrā PCR reakcijā tiek izmantots tikai viens marķieris. Ar nolūku ietaupīt laiku, kas neieciešams kārķļu DNS mikrosatelītu analizēm, PCR reakcijas, kuras iepriekš tika veiktas katra ar savu marķieri, tika pārveidotas tā, lai vienā PCR reakcijā varētu lietot vairākus PCR praimerus, turklāt tādus, kuru produktus pēc tam iespējams vienlaicīgi analizēt uz ģenētiskā analizatora ABI PRISM 3130xl. Šādu PCR reakcijas pārveidošanu apgrūtina dažādo kārķļu SSR analizēs izmantoto praimeru atšķirīgā kušanas temperatūra (no 52 °C līdz 57,9 °C). Eksperimentāli tika atrasti PCR reakcijas apstākļi, kuri deva iespēju sadalīt marķierus trīs komplektos (analīzei uz ģenētiskā analizatora savstarpēji saderīgu praimeru pāru grupās).

Ar izstrādāto kārķļu genotipēšanas metodi

izstrādātas ģenētiskas identifikācijas pases (pielikums Nr. 5),
pārbaudīta šķirnes - klona 'Monika' stādījuma viendabība pirms materiāla nodošanas reģistrācijai (pielikums Nr. 6),

izanalizēta divu Latvijas kārķļu sugu - *Salix alba* un *Salix viminalis* populāciju ģenētiskā daudzveidība. Par to ziņots "8th International Conference on Biodiversity Research" Daugavpilī, 28.-30. 04.2015.

(pielikums Nr. 9).

sagatavoti dati ievadīšanai Datu bāzē.

3. Kārķļu (*Salix spp.*) hloroplastu DNS analīze

Līdz šim nav noskaidrots vai viena no visvairāk izplatītajām kārķļu sugām Latvijā *Salix alba* (baltais vītols) ir autohtonas floras elements vai arī ātri izplatoties, hibridizējoties ar citām sugām, ieguvusi vietējās sugas statusu. Lai to noskaidrotu, tika izstrādāta kārķļu *Salix alba* hloroplastu DNS analīze, kas dod iespēju identificēt izcelsmi, t.i. mātes kokus. No literatūrā atrastajiem un aprobētajiem 10 hloroplastu DNS mikrosatelītu marķieriem, metodikas iztrādei atlasīti 6 marķieri, kuri apvienoti divos komplektos (pielikums Nr. 3). Kombinējot iegūtos izcelsmes rezultātus ar analizējot iegūtajiem kodola DNS ģenētiskās daudzveidības rezultātiem, noskaidrots, ka *Salix alba* ir vietējās izcelsmes suga, atsevišķos rajonos notiek tā hibridizācija ar *Salix. fragilis*.

-Noteikta izcelsme klūgu audzētāju kārķļu stādījumiem.

-Sagatavots raksts "Genetic analysis of Latvian *Salix alba* L. and hybrid populations using nuclear and chloroplast DNA markers". Iesniegts žurnālā *Silvae fennica* (pielikums Nr. 10).

4. Alkšņu (*Alnus spp.*) genotipēšana.

Baltalkšņi (*Alnus incana*) un melnalkšņi (*Alnus glutinosa*) ir plaši izplatītas koku sugas Latvijas mežaudzēs. Literatūrā neizdevās atrast marķierus šo sugu genotipēšanai. Šim mērķim aprobēti 18 tuvas ģints *Betula spp.* zināmie kodola DNS mikrosatelītu marķieri. No tiem atlasīti 5 ar kuriem PCR reakciju rezultātā iespējams iegūt labi identificējamus amplikonus (pielikums Nr. 3). Bez tam viens no marķieriem Be 5 ir sugas specifisks, ar to iespējams atšķirt baltalkšni no melnalkšņa.

Ar izstrādāto alkšņu genotipēšanas metodiku izveidota baltalkšņu plantācijas molekulārā pase (pielikums Nr. 8)

Ziņots "8th International Conference on Biodiversity Research" Daugavpils, 28-30 April, 2015 (pielikums Nr. 9).

5. Alkšņu (*Alnus spp.*) hibridizācijas pakāpes noteikšana.

Baltalkšņi (*Alnus incana*) un melnalkšņi (*Alnus glutinosa*) ir plaši izplatīti Latvijas mežaudzēs. Šo sugu ziedēšanas laiki ir atšķirīgi (baltalkšnis uzdzied nedēļu ātrāk). Tomēr dažos gados klimatisko apstākļu dēļ ziedēšana abām sugām var notikt vienlaicīgi, kā rezultātā izveidojas abu sugu hibrīdi. Izvēloties sēklas plantāciju ierīkošanai nepieciešams ņemt vērā mātes koku hibridizācijas pakāpi, jo otrās paaudzes hibrīdi uzrāda zemākus augšanas parametrus.

Sugu noteikšanai, pamatojoties uz kodējošām sekvencēm, izveidoti 7 molekulārie marķieri. Noteikšanai izmantoja restrikcijas saišu polimorfismu (pielikums Nr. 11).

Sagatavoti dati par hibridizācijas pakāpi alkšņu sēklu plantācijā Kalsnavā un no tās izveidotā eksperimentālā audzē Skrīveros. Dati ievietoti Latvijas ātraudzīgo lapu koku klonu reģistrā (pielikums Nr. 1). No tiem būs iespējams atlasīt stādāmo materiālu ar visaugstāko hibridizācijas pakāpi.

Iesniegta un akceptēta publikācija Acta Biologica Universitatis Daugavpiliensis - Voronova A., Lazdina D., Korica A., Veinberga I., Liepins K., Rungis D. 2015. Evaluation of allelic content in an experimental alder (*Alnus spp.*) plantation. Acta Biol. Univ. Daugavp., 15 (1): 227 – 239.

6. Papeļu (*Populus tremula*) genotipēšana.

No literatūras datiem papeļu genotipēšanai atlasīti un aprobēti 17 kodola DNS mikrosatelītu marķieri. No tiem atlasīti 6 marķieri, ar kuriem iespējams iegūt labi identificējamus polimorfus amplikonus (pielikums Nr. 3). Marķieri apvienoti divos komplektos, kas dod iespēju vienlaicīgi PCR reakcijā izmantot trīs marķierus.

Papeles ir ātraudzīga koku suga un tās izmanto enerģētiskās koksnes plantācijās. Šīs sugas priekšrocība ir tā, ka to var pavairot ar stumbra spraudņiem. Ja koku selekcijas un krustošanas darbu rezultātā ir izdevies iegūt genotipu ar vēlamajām īpašībām, tad veģetatīvā pavairošana ir veids, kā īsā laikā un lielos apmēros iegūt identisku materiālu ar vēlamajām īpašībām – produktivitāti, koksnes īpašībām, stumbru formu utt. Tāpēc nepieciešams izveidot klonu ģenētiskās pases to juridiskai aizsardzībai.

Ar izstrādāto papeļu genotipēšanas metodiku

izstrādātas no ārzemēm ievesto papeļu klonu ģenētiskās identifikācijas pases (pielikums Nr. 5),

noskaidrots klonu skaits Zemgales audzē (pielikums Nr. 12).

Datu bāzē ievadīta sekojoša informācija:

savvaļā atrastie perspektīvie kārķļu kloni, kuri pārstādīti audzētavā, klūgu kārķli,

no ārzemēm ievestie kārķļu kloni,

reģistrācijai paredzētie kloni,

no ārzemēm ievesto papeļu kloni.

Datu bāze pieejama LVMI Silava bibliotēkā.

Iegūtie dati, būs publiski pieejami zinātniskām un citām organizācijām, kas varēs esošo informāciju izmantot veģetatīvi pavairojamo ātraudzīgo koku sugu klonu identifikācijai, pirms klonu reģistrācijas procesa Valsts Meža dienestā. Izmantota, saskaņā ar Ministru kabineta noteikumiem ievestā reproduktīvā materiāla kontrolei.

Lai noteiktu uz viengadīgām kārķļu (*Salix alba*) atvasēm ziemojošo kukaiņu klātbūtni un novērtētu to veidotos bojājumus īscirtmeta enerģētiskās koksnes stādījumos, kas ierīkoti sadarbībā ar LVMI Silava, Zemkopības zinātniskā institūta izpētes laukos Skrīveros 2015. gadā ievāca kārķļu viengadīgās atvases. Uz tām tika konstatēti sekojoši taksoni: laputis *Hemiptera aphididae*, blaktis *Hemiptera heteroptera*, cikādes *Hemiptera achenorrhyncha*, naktstauriņi *Lepidoptera heterocera*. Ziemojušo kukaiņu radītie bojājumi plaukstošajiem spraudņiem bija dažādi, tomēr tie nav raksturojami kā smagi. Konstatēti lapu grauzumi, tīklojumi, sūkumi, kā arī ziedu bojājumi.

Informācija par projektā veiktajām aktivitātēm ievietota "Meža Avīzē", "Latvijas Avīzē" un "Zīlē".

SATURS

1.Latvijā pieejamo ātraudzīgo lapu koku klonu reģistrs	8
2.Ātraudzīgo lapu koku identifikācijas metodika	38
2.1. DNS izdalīšana	40
2.2.Kārķu (<i>Salix spp.</i>) genotipēšana	43
2.3.Kārķu (<i>Salix spp.</i>) hloroplastu DNS analīze	45
2.4.Alkšņu (<i>Alnus spp.</i>) genotipēšana	47
2.5. Alkšņu (<i>Alnus spp.</i>) hibridizācijas pakāpe	50
2.6.Papeļu (<i>Populus tremula</i>) genotipēšana	54
3.Genotipēšanas marķieru atlase	56
4.DNS kolekcija	69
5. Stādāmā materiāla ģenētiskās identifikācijas pase	132
6. Klona " MONIKA " reģistrācija	152
7. Kārķu (<i>Salix spp.</i>) ploiditātes noteikšana	167
8. Baltalkšņu (<i>Alnus glutinosa</i>) plantācijas ģenētiskā pase	178
9.Referāti starptautiskās konferencēs	181
10.Zinātniskās publikācijas	184
11. Alkšņu hibridizācijas pakāpes noteikšana	220
12.Papeļu (<i>Populus tremula</i>) genotipēšana rezultāti	233

Referāti starptautiskās konferencēs

Genetic diversity, fingerprinting and population structure of the economically significant species *Salix alba* and *Salix viminalis*



Veinberga I.¹, Gailīte A.¹, Šķipars V.¹, Ļubinskis L.¹, Gaile A.¹, Sarkanābols T.², Skudra A.², Ruņģis D.¹, Lazdiņa D.²

1 - Genetic Resource Centre, Latvian State Forest Research Institute "Silava", 111 Rīgas st, Salaspils, Latvia, LV-2169 (ize.veinberga@silava.lv)
2 - Forest regeneration and establishment, Latvian State Forest Research Institute "Silava", 111 Rīgas st, Salaspils, Latvia, LV-2169 (dagnija.lazdina@silava.lv)

Introduction

Current estimations predict that the use of wood biomass for energy production will increase over the next decade. One way to meet the increased demand would be the establishment of short rotation plantations using willow, osier, alder and other species; given that Latvia has appropriate agroclimatic conditions for the cultivation of these species.

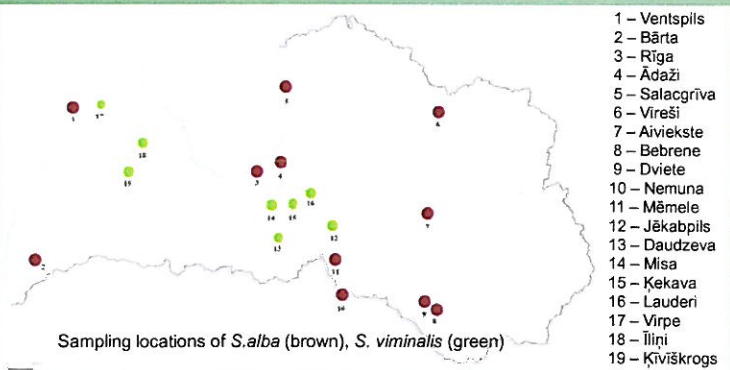
The willow and osier genus (*Salix*) is in the willow family (*Salicaceae*). Species with tree forms are designated as willows, but shrub forms - as osiers. There are 18 native *Salix* species in Latvia, of which *S. viminalis*, *S. triandra* and *S. dasyclados* could potentially be used for biomass production. In addition, the species *S. purpurea*, *S. alba*, *S. viminalis*, *S. triandra* and *S. acutifolia* are used for wicker production.

Materials and Methods

Samples of *S. alba* were collected within river catchments from 12 locations within Latvia. In addition, 8 *S. alba* samples from the National Botanic Gardens were analysed (*S. alba*, *S. alba* × *rubens* (2 samples), *S. alba* 'Vitelina', *S. alba* 'Sericea', *S. alba* 'Britzensis', *S. alba* 'Calva', *S. alba* 'Coccinea', *S. alba* 'Chermesina'). *S. viminalis* samples were collected from 3 locations in Kurzeme, 1 location in Latgale and 4 in Zemgale. The *S. viminalis* samples were collected from natural populations and artificially established plantings. Additionally, genetic profiles of foreign *Salix* cultivars commercially grown in Latvia were determined.

DNA was extracted from leaves and young branches using a modified Doyle & Doyle (1987) method. In order to determine the population structure 5 SSR chloroplast DNA markers: ccmp 2, ccmp 3, ccmp10, ccmp 7, ccmp 4, ccmp 6 (Weising et al, 1999) were used, and genetic diversity was determined with 6 nuclear SSR markers: SB 38, SB 80, SB 243, SB 201, SB 194, SB 199 (Barker et al 2003) using multiplex PCR (Solis BioDyne). Two additional nuclear SSR markers (SB24, SB93) were used for identification of foreign varieties.

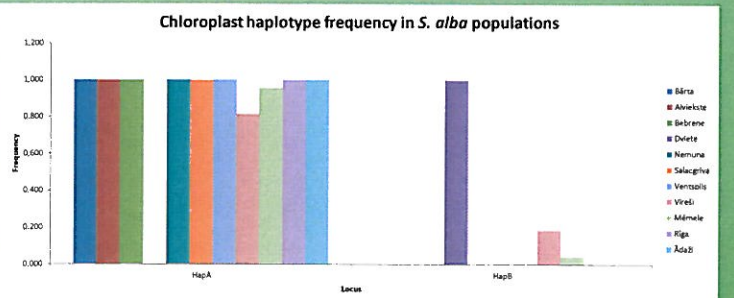
PCR products were analysed on an ABI PRISM 3130xl Genetic Analyser and genotyped using the GeneMapper programme. Analysis was performed with GenAIEx 6.5 (Peakall and Smouse, 2012) and STRUCTURE v2.3.4. (Pritchard et al, 2000).



Salix alba

Nuclear SSR markers - A total of 184 *S. alba* individuals were analysed with six SSR markers. The number of alleles detected by the SSR markers ranged from 6-14 (mean 11.2), but the number of effective alleles ranged from 2.3-6.9, indicating a fairly high number of low frequency alleles. The mean number of alleles with a frequency over 5% was 4.3. The inbreeding or fixation index F for the markers ranged from -0.212 to 0.463 (mean 0.166). Three of the markers had high F values - SB201 (0.463), SB194 (0.333) and SB199 (0.344), indicating an excess of heterozygotes. This could possibly be due to the presence of null alleles, however, further investigation will be required to confirm this. Analysis of molecular variance (AMOVA) analysis indicated that there was a high degree of differentiation between populations (Fst = 0.174, p<0.001). Pairwise Fst values ranged from 0.278 (Dviete - Ventspils) to 0.026 (Rīga - Ādaži). Approximately 58% of the analysed individuals had unique genotypes, and the remainder had an identical multi locus genotype with at least one other individual. Clonally propagated individuals were found only within each sampled population, and the largest number of individuals within one clone was 16 in the Ventspils population.

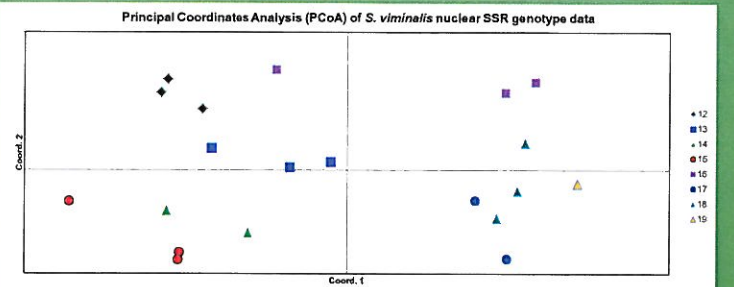
Chloroplast SSR markers - The same *S. alba* individuals were also genotyped with six chloroplast SSR markers. Of these, only two were polymorphic in the analysed populations - ccmp 3 and ccmp 10. Each polymorphic marker had two alleles, which were combined into two haplotypes (A and B). Haplotype A was found in almost 91% of the analysed individuals, and haplotype B in 9%. The distribution of the haplotypes was also highly structured, with the entire Dviete population consisting of individuals with the B haplotype. This haplotype was also found at a low frequency in the Vīreši and Mēmele populations (5 and 1 individuals, respectively).



Salix viminalis

Nuclear SSR markers - A total of 24 *S. viminalis* individuals were analysed with six SSR markers. The number of alleles detected by the SSR markers ranged from 5-12 (mean 8.2). This is similar to the diversity found in the *S. alba* populations, despite the much lower number of analysed individuals. However, the within population diversity was lower, with 34% of the genetic variation found between populations (p<0.001).

Chloroplast SSR markers - the diversity of haplotypes identified by the 6 chloroplast markers was much higher in *S. viminalis* than in *S. alba*. All of the chloroplast markers were polymorphic, except for ccmp 4. The polymorphic loci had 2-4 alleles each and a total of 7 haplotypes were found. Individuals collected from the same area shared the same haplotype, and only two locations shared the same haplotype.



Conclusions

Genotyping of Latvian populations of *Salix alba* and *S. viminalis* with nuclear and chloroplast SSR markers enabled investigation of the genetic diversity, population differentiation and the extent of clonal propagation. The investigated *S. alba* populations were less differentiated than the *S. viminalis* populations, which was also supported by the chloroplast data. Only two chloroplast haplotypes were found in *S. alba*, while seven were found in *S. viminalis*. Both species showed a high level of clonal propagation. The utilised nuclear SSR markers were also able to distinguish commercially cultivated *Salix* cultivars, confirming their utility for genetic fingerprinting.

References

- Barker JHA., Pahlich A, Trybush S, Edwards J, Karp A (2003) Microsatellite markers for diverse *Salix* species. Molecular Ecology Notes 3: 4-6
Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemistry Bulletin 19:11-15
Peakall R, Smouse PE. (2012) GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. Bioinformatics, 28:2537-2539
Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics, 155:945-959
Weising K, Gardner RC. (1999) A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. Genome, 42:9-19

This research was funded within the ERDF project Nr. 2014/0025/2DP/2.1.1.1.0/14APIA/VIAA/101 Development of identification technologies for vegetatively propagated short rotation tree species



Evaluation of allelic content in an experimental alder (*Alnus* spp.) plantation

Angelika Voronova¹, Dagnija Lazdina², Anna Korica¹, Ilze Veinberga¹, Kaspars Liepins², Dainis Rungis¹

¹Genetic Resource Centre, Latvian State Forest Research Institute "Silava", 111 Rīgas st, Salaspils, Latvia, LV-2169 (ilze.veinberga@silava.lv)

²Forest regeneration and establishment, Latvian State Forest Research Institute "Silava", 111 Rīgas st, Salaspils, Latvia, LV-2169 (dagnija.lazdina@silava.lv)

Introduction

Grey alder (*Alnus incana* (L.) Moench) and black alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn) belong to the birch family (*Betulaceae*) genus *Alnus*. *Alnus* species are monoecious wind-pollinated trees with an outcrossing breeding system. Most *Alnus* species are tetraploids ($2n = 4x = 28$). *Alnus incana* has been utilized for establishment of forest plantations of former farmlands due to rapid growth and low requirements regarding soil productivity. Alders have the ability to enrich the soil with nitrogen fixing bacteria that are propagated by root nodules. Unlike grey alder, black alder (*Alnus glutinosa*) prefers wet soils and has a longer life span. The timber of the black alder is valued higher compared to that of grey alder due to superior mechanical and decorative qualities.

Hybridisation of *A. incana* and *A. glutinosa* species occur naturally and has been reported in Latvia, Belarus, Poland, The Czech Republic, Sweden, Ireland and other countries. Hybridisation occurs usually due to environmental variables such as cold prolonged springs, which could alter the usual flowering times of the two species, which usually separated by one week. First generation hybrids often exhibit hybrid vigour, and *A. incana* x *A. glutinosa* hybrids were characterized as fast growing, with greater drought and pythium rot (*Fomes igniarius* f. *alni*) resistance (Kundzins 1957, Pirāgs 1962). Alder hybrids were of interest in Latvia as they are faster-growing and having superior stem quality than the parent species (Kundzins & Pirāgs, 1959). Improved characteristics usually are attributable to F1 hybrids, but plant hybrids in next generations tend to backcross to one of the parent species, and several generations of introgression could lead to a complex mixture of parental species' genes and alleles and outbreeding depression. From another point of view, even if fitness of F2 and backcross individuals is highly variable and on average lower than that of the parental species, some individual plants from advanced generation backcrosses may show reasonably fitness. Evolutionary studies suggest that almost 50% of all plant species originated via hybridization speciation. Polyploidy may confer evolutionary advantages for plant species, including lessening of hybrid outbreeding depression. Hybrids between alder species are difficult to distinguish from each other due to continuous phenotypic variation of distinguishing characteristics. The genetic status of hybrids is often associated with a risk of selecting naturally occurring hybrid or introgressed trees. Distinguishing characteristics of *A. incana* x *A. glutinosa* hybrids are the number of pinnules or unexamined, and classification based on morphological traits alone could lead to misclassification. Conventional selection of the best planting material from natural alder stands could be biased by leaf venation, leaf coefficient, upper angle of the leaf blade and others.

In this study, an experimental trial plantation was genotyped with species-specific molecular markers developed previously to identify black and grey alder species and their hybrids (Rungis *et al.*, 2010). The species-specific markers were developed from SNPs and indels (insertions/deletions) identified between *A. incana* and *A. glutinosa*. The experimental plantation was established utilizing seeds collected from a mother tree seed plantation, which contained a mixture of *A. incana* and *A. glutinosa* individuals, and possibly some hybrid individuals. The seeds were collected from morphologically identified *A. incana* individuals, however, due to the uncertainty of the provenance of the mother tree seed orchard, individuals from this seed orchard were also genotyped with the species-specific markers. This enabled differentiation of *A. incana* and *A. glutinosa* individuals, and to determine the extent of hybridisation within the experimental plantation as well as the mother tree seed plantation. Early stage growth parameters (height and diameter) were measured within the experimental plantation and compared to data from similarly aged pure *A. incana* and *A. glutinosa* plantations.

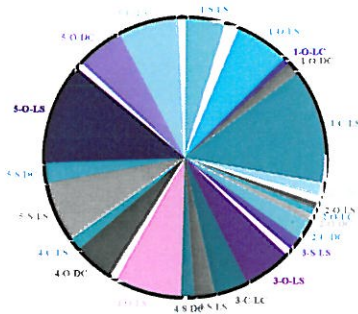
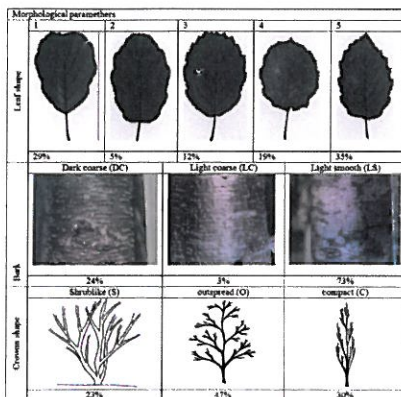
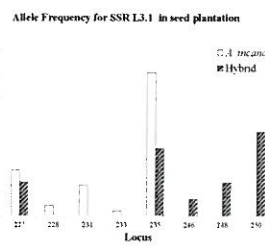
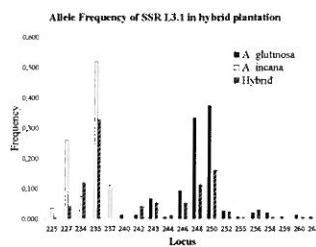


Table 1. Mean height and diameter values by seedling age and comparison with reference *A. incana* and *A. glutinosa* data.

Seedlings age	<i>A. incana</i> x <i>A. glutinosa</i> experimental plantation hybrids		Regenerated seedlings <i>A. incana</i> (Daugaviete 2010)		<i>A. incana</i> container seedlings (Liepins, unpublished data)		<i>A. glutinosa</i> container seedlings (Liepins, unpublished data)	
	Ht. m	Dc. cm	Ht. m	Dc. cm	Ht. m	Dc. m	Ht. m	Dc. m
4-year seedlings	1.71±0.93	2.09±0.48	4.38±0.64	2.94±0.63	3.37±0.61	2.78		
5-year seedlings	2.87±1.03	5.64±2.45	4.81±0.54	4.07±0.53	4.61±4.87	3.97		



The SSR marker L3.1 differentiates *A. incana* and *A. glutinosa* species by repeat size difference, with *A. incana* individuals having allele sizes of 237bp or smaller and *A. glutinosa* individuals having allele sizes of 240bp or more (Zhuk *et al.* 2008). Genotyping of the individuals from the experimental plantation revealed a large variation in allele representation and frequency. In the maternal tree seed plantation, variation at the L3.1 locus was lower and no individuals with only *A. glutinosa* alleles were identified.

Conclusion

Analysis of an experimental hybrid alder (*A. incana* x *A. glutinosa*) plantation revealed a high degree of variation in the allelic proportion of each parental species between individuals. Growth traits also demonstrated a high degree of variation in comparison to equivalent aged *A. incana* and *A. glutinosa* plantations. This high degree of variation can be attributed to segregation of alleles in advanced generation hybrid individuals. The mother tree seed plantation was also shown to contain advanced generation hybrids. Monitoring of the experimental plantation may reveal fitness advantages for these hybrid individuals in response to environmental or other conditions. The species-specific markers described in this report will be useful for further investigation of the extent and direction of natural hybridisation between *A. incana* and *A. glutinosa*.

Acknowledgements

This research was funded within the ERDF project Nr 2014/0025/2DP/2.1.1/0/14/APIA/VIAA/101 Development of identification technologies for vegetatively propagated short rotation tree species

Results

From the experimental plantation, seven trees had 100% *A. incana* alleles and two trees were heterozygous at all five loci. No individuals with 100% *A. glutinosa* alleles were identified in this sample set. 31 individuals had an equal proportion of alleles from both species, but with an uneven distribution (i.e. they were not F1 hybrids). 100 individuals had 60-90% *A. glutinosa* alleles and 47 individuals had 60-90% of *A. incana* alleles.

The 30 individuals analysed from the mother tree seed plantation identified one individual with 100% *A. glutinosa* alleles and three individuals with 100% *A. incana* alleles. 23 individuals had 60-80% *A. incana* alleles and three individuals were heterozygotes at each allele.

The control *A. incana* stand (24 individuals) have 22 individuals with 100% *A. incana* alleles, and two individuals with 90% *A. incana* alleles. No correlations were observed between growth parameters and allelic proportion. The correlation coefficient for tree height in 2014 and *A. glutinosa* allele proportion was 0.038, collar diameter and *A. glutinosa* allele proportion 0.126, growth increment and *A. glutinosa* allele proportion 0.0598.

No association was observed between *A. incana* and *A. glutinosa* or hybrid allele frequencies and height or diameter groups. Mean height (Hv) of hybrid 5-year seedlings was not correlated with *A. glutinosa* allele content. The height of individuals with an *A. glutinosa* allele content of 0% to 40% was 2.54 ± 1.19 m, with an equal *A. glutinosa* *A. incana* allele content $Hv = 2.60 \pm 1.04$ m, and with an *A. glutinosa* allele content from 60% to 90% $Hv = 2.57 \pm 1.13$ m.

References

- Daugaviete M. 2010. Biomass accumulation in young grey alder (*Alnus incana* (L.) Moench) stands. Forest Science, 21(54): 16-30. (in Latvian, abstract in English).
- Kundzins A.V. 1957. Melnalkšņa un baltalkšņa hibrīdi Latvijas PSR mežos (*Alnus glutinosa* and *Alnus incana* hybrids in forests of Latvian SSR). Latvijas PSR Zinātnu Akadēmijas Vēstis 2(115):69-74. (in Russian with abstract in Latvian).
- Kundzins A.V. 1968. Aikšņu mākslīgās hibrizācijas izmēģinājumi (Experiments on Artificial Hybridization of Alder. Gain in Forest Productivity Riga. Zinātne, 69-98. (in Russian with abstract in Latvian and German).
- Kundzins A.V., Pirāgs D. 1959. Hybrids of *Alnus glutinosa* and *A. incana* in the forests of the Latvian SSR and their anatomical wood properties. LPSR ZA Vēstis, 8: 145.
- Liepiņš K., Liepiņš J. 2010. Field performance of grey alder (*Alnus incana* L. (Moench)) and common alder (*Alnus glutinosa* L.) container seedlings in experimental plantation on former farmland. Forest Science, 21(54):4-14.
- Poikāns J. 2014. Baltalkšņa, melnalkšņa un to hibrīdu jaunie stādījumi (Young grey alder and hybrid plantations). (Bachelor thesis in Latvian; abstract in English), Jelgava.
- Rungis D., Veinberga I., Voronova A., Daugavietis M. (2010) Correlation of allelic content with tree characteristics in a hybrid alder stand. Forest Science, 21(54): 56-64. (in Latvian; abstract in English).
- Zhuk A., Veinberga I., Daugavietis M., Rungis D. 2008. Cross-species Amplification of *Benula pendula* Roth. Simple Sequence Repeat Markers in *Alnus* Species. Baltic Forestry, 14(2): 116-121.