

Hibridizācijas pakāpes ietekme uz hibridalkšņu taksācijas rādītājiem

D. Ruņģis^{1*}, I. Veinberga¹, A. Voronova-Petrova¹, M. Daugavietis¹

Ruņģis, D., Veinberga, I., Voronova-Petrova, A., Daugavietis, M. (2010). Correlation of allelic content with tree characteristics in a hybrid alder stand. *Mežzinātne | Forest Science* 21(54): 56-64.

Kopsavilkums. Pētījuma mērķis – noteikt hibridizācijas pakāpes ietekmi uz hibridalkšņa taksācijas rādītājiem. Hibridizācijas pakāpes noteikšanai izmantota LVMI „Silava” Ģenētisko resursa centrā izstrādātā metodika, kas paredz no stumbra aplievās koksnes izdalīt DNS un to genotipēt ar alkšņu sugu specifiskiem marķieriem.

Pētījumu materiāls (132 koki) iegūts 43 gadu vecā alkšņu audzē, kas pēc pieejamās informācijas ierikota, izmantojot stādus, kas izaudzēti no dabā sastopamo hibridalkšņu sēklām. Ņemot vērā, ka visu audzes koku augšanas apstākļi bijuši vienādi, augsta ticamība ir skaidrojumam, ka koku taksācijas rādītāju atšķirības noteikusi to hibridizācijas pakāpe.

Audzē sastopamajiem kokiem raksturīgs dažāds baltalkšņa un melnalkšņa alēļu skaits, t.sk. 100% baltalkšņa un 100% melnalkšņa alēļu (1. attēls). Vienāds baltalkšņa un melnalkšņa alēļu skaits ir tikai 5 kokiem (3,8%), no kuriem 3 (2,3%) varētu būt pirmās paaudzes hibridi (1. tabula).

Pētījumā konstatēts, ka hibridizācijas pakāpe būtiski ietekmē koku caurmēru un stumbra tilpumu (2. un 3. attēls). Alksnis ir gaismas prasīga suga, tomēr tā augstumu hibridizācijas pakāpe būtiski neiespaido. Lielākais heterozes efekts novērots kokiem ar baltalkšņa un melnalkšņa alēļu attiecību 1:1, kas atbilst hibridizācijas teorijai. Pētījuma rezultāti rāda, ka alkšņu hibridu audzēšana var nozīmīgi palielināt audžu ražību.

Nozīmīgākie vārdi: hibridalksnis, stādījums, taksācijas rādītāji, DNS marķieri.

•••

Ruņģis, M., Veinberga, I., Voronova-Petrova, A., Daugavietis, M., LSFRI “Silava”.

Correlation of allelic content with tree characteristics in a hybrid alder stand.

Abstract. The aim of this research was to determine the correlation between allelic content and tree characteristics in a hybrid alder stand. Common alder (*Alnus glutinosa*) and grey alder (*Alnus incana*) are found in natural stands throughout Latvia. *Alnus* species are not commercially grown; however there is interest in utilising these species for commercial plantations due to their rapid growth rate and ability to grow in, and to improve poor quality soils. Of particular interest are hybrids of these two species, as naturally occurring hybrids have been reported to be faster-growing and larger than the parent species. The use of molecular markers is becoming more common in

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

applied forestry studies, due to the decrease of the cost of genotyping, and more widespread access to genotyping facilities. Molecular markers have not been widely applied or developed in *Alnus* species, however we developed species-specific markers from sequences available in the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), as well as utilising simple sequence repeat (SSR) markers developed for a related species – *Betula pendula*. In this study, we utilised 7 species-specific markers (1 SSR marker and 6 SNP markers) to genotype a hybrid alder stand, and to determine correlation of the allelic content with tree characteristics of individuals from this stand.

The individuals used in this study were collected from a 43 year old alder stand, which according to available records was an established utilising seed from naturally occurring hybrids. Given the fact that the individuals in this stand have been subject to identical growing conditions, differences in tree characteristics could be attributed to differences in their allelic content.

These species-specific markers were used to characterise 132 individuals from the stand. The use of multiple species-specific markers allowed us to quantify the allelic content in hybrids. From the total number of individuals characterised, 19 (14.4%) were designated as pure common alder, 5 (3.8%) as grey alder, and 108 (81.8%) as hybrids with differing proportions of species contributions (Table 1). However, the proportion of 1st generation hybrids, with all markers in a heterozygous state was low – only 3 individuals (2.3%). The other hybrid individuals had differing ratios of species contributions, and these were distributed equally between an excess of common alder alleles (51 individuals, 38.6%) and an excess of grey alder alleles (52 individuals, 39.4%) (Figure 1). Given the allelic distribution found with these species-specific markers, it is probable that the seed used to establish this stand was obtained from a naturally occurring hybrid or hybrids, which were pollinated with an equal mix of common and grey alder pollen.

This research showed that there was a significant correlation between allelic content of these trees and both stem diameter and volume (Figures 2 and 3). Tree height was not correlated with allelic content, which could be due to the fact that alders are light-requiring species, and the tree crown height of within even-aged stands will be similar. The highest diameters and stem volumes were found in individuals that had a 1:1 ratio of common and grey alder alleles, which is consistent with the theoretical basis of heterosis. In conclusion, these results show that the use of hybrid alder material can increase the productivity of plantations.

Key words: hybrid alder, stand, tree characteristics, DNA markers.

•••

Руņģис Д., Вейнберга И., Воронова-Петрова А., Даугавиетис М., ЛГИЛН «Силава».
Влияние степени гибридизации на таксационных показателей гибридной ольхи.

Резюме. Цель исследований – выявить влияние степени гибридизации на

таксационные показатели гибридной ольхи. Для определения степени гибридизации использовалась методика, разработанная в Центре генетических исследований ЛГИАН «Силава» и предусматривающая выделение из стволовой древесины маркеров 6 SNP и 1 SSP.

Исследовательский материал собран в 43-летнем насаждении гибридной ольхи, созданном путем посадки саженцев, выращенных из семян гибридной ольхи.

Так как все деревья насаждения росли в идентичных условиях, с большой вероятностью можно предположить, что различия таксационных показателей обусловлены степенью гибридизации.

Деревьев насаждения характеризует весьма различное количество аллелей серой и черной ольхи, в.т.ч. – 100% серой и 100% черной ольхи (рис. 1).

Только 5 деревьев (3,8%) содержат одинаковое число аллелей, и всего 3 (2,3%) из них могут быть отнесены к гибридам первого поколения.

Исследования показывают, что степень гибридизации существенно влияет на диаметр и объем ствола (рис. 2 и 3.), а на высоту деревьев ольхи оказывает несущественное влияние, поскольку ольха порода светолюбивая, которая старается крону удерживать на первом ярусе насаждения.

Наибольший эффект гетероза проявляется у деревьев при соотношении аллелей серой и черной ольхи 50:50, что соответствует общим принципам теории гибридизации.

Исследования свидетельствуют, что выращивание гибридной ольхи может существенно повысить продуктивность насаждений.

Ключевые слова: гибридная ольха, насаждение, параметры таксации, маркеры ДНК.

Ievads

Melnalksnis (*Alnus glutinosa* L.) un baltalksnis (*A. incana* L. Moench) ir sastopams dabiskās audzēs visā Latvijas teritorijā. Baltalksnis aizņem vairāk nekā 10% no visas meža kopplatības, bet melnalksnis – aptuveni 5%. Šo sugu hibrīdi aug ātrāk un veido arī lielāku pieaugumu (Kundziņš, Pīrāgs, 1959), kas skaidrojams ar heterozes efektu (Li *et al.*, 1998). Heterozes efekts sevišķi spilgti izpaužas pirmajā hibrīda paaudzē, bet mazākā mērā ietekmē arī turpmākās paaudzes. Līdz šim Latvijā alkšņa taksācijas rādītāju saistība ar hibridizācijas pakāpi nav pētīta, jo nebija

specifisko DNS marķieru tās novērtēšanai.

DNS marķierus plaši pielieto meža koku populāciju daudzveidības un struktūras analīzei, ģenētiskajai pasportizācijai, sugu un hibrīdu identificēšanai (Bruford, Wayne, 1993). Pirms DNS marķieru izstrādes sugu identificēšanai un atšķiršanai izmantoja tikai to morfoloģiskās pazīmes, pēc kurām tika identificēti arī šo sugu hibrīdi. Tomēr tikai pēc morfoloģiskajām pazīmēm, kas parasti ir kvantitatīvas un pakāpeniski pāriet viena otrā, hibrīdi ir grūti identificējami. Daudz precīzāk tas izdarāms ar DNS marķieriem, jo tie izmantojami jebkurā koka dzīves posmā, turklāt marķierus neietekmē ne

apkārtējās vides, ne augšanas apstākļi, kas var būtiski izmainīt morfoloģiskās pazīmes (Khasa, Dancik, 1996).

Ar katru DNS marķieri iegūstama informācija par konkrētā indivīda ģenētisko sastāvu (alēlēm) vienā specifiskā genoma vietā (lokusā). Hibridu identificēšanai nepieciešami tādi DNS marķieri, kas uzrāda atšķirīgās alēles (dažādi īpatņi vienā lokusā) starp sugām. Katrs DNS marķieris var identificēt vienu no trim alēlēm – melnalkšņa, baltalkšņa vai hibrida. Hibrīdos šie marķieri atklāj abu sugu alēles heterozigotiskā stāvoklī. Pirmās paaudzes hibrīdiem katrs sugu specifiskais marķieris uzrāda heterozigotisku stāvokli. Nākamās paaudzes ir pakļautas genomiskiem rekombināciju procesiem, un pat tad, ja hibrids krustojies ar citu hibridu, visi marķieri heterozigotisku stāvoklī neuzrādīs. Tomēr melnalkšņa:baltalkšņa alēļu proporcija saglabāsies aptuveni 1:1. Ja hibrids krustosies ar meln- vai baltalkšni, tad sugas alēļu proporcija palielināsies atkarībā no krustošānās virziena. Jo vairāk marķierus iespējams izmantot, jo precīzāk nosakāma katras sugas alēļu proporcija potenciālajos hibrīdos.

DNS marķieru analīzei izmantota polimerāzes ķēdes reakcija (*polymerase chain reaction* – PCR), kas amplificē definētus genoma posmus (lokusus). Īsu sekvenču atkārtojuma (*Simple Sequence Repeat* – SSR) marķieri atklāj īsu (1-5 DNS nukleotīdu) atkārtojumu garuma polimorfismu. Tomēr, lai izmantotu šos marķierus, ir jāidentificē specifiskās DNS sekvences, kas atrodas ap SSR reģioniem, un šis process ir darbietilpīgs un dārgs. Alkšņu sugām šādi SSR marķieri

nav izstrādāti, toties zināmi ir radnieciskās sugas (bērza) SSR marķieri, kas aprobēti hibridalkšņa identifikācijai (Zhuk *et al.*, 2008). Cita veida DNS marķieri – viena nukleotīda polimorfisma (*Single Nucleotide Polymorphism* – SNP) marķieri – atklāj genoma DNS punktveida mutācijas, kur izmainīts ir viens no DNS nukleotīdiem. Šādas mutācijas sastopamas lielā daudzumā, tomēr, to identificēšanai nepieciešama informācija par DNS sekvencēm. Ierobežotā skaitā alkšņu DNS sekvences ir pieejamas GenBank datu bāzē (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), uz kā pamata izstrādāti jauni alkšņu marķieri. DNS sekvences noteiktas 8 melnalkšņu un 8 baltalkšņu indivīdiem, un turpmāk hibridalkšņa identifikācijai izmantoti tikai sugas iekšienē viendabīgi un starp sugām atšķirīgi marķieri.

Pētījuma mērķis – noteikt hibridizācijas pakāpes ietekmi uz hibridalkšņu taksācijas rādītājiem. Kalsnavas hibridalkšņu stādījuma koku raksturošanai un taksācijas rādītāju sakarības ar hibridizācijas pakāpi izvērtēšanai izmantoti 6 SNP marķieri un 1 SSR marķieris (Zhuk *et al.*, 2008).

Materiāls un metodika

Hibridalkšņu audžu raksturojums

Izpētes materiāls (132 koki) ievākts 43-gadīgā alkšņu stādījumā, kas ierikots ar stādiem, kuri izaudzēti no hibridalkšņu sēklām. Nogabalā visiem kokiem izmērīts krūšaugstuma caurmērs D , cm un augstums H , m. Izdarot urbumus stumbrā, DNS izdalīšanai iegūtas aplievas koksnes skaidiņas, kas ievietotas mēģenēs ar destilētu ūdeni. Katra koka stumbra tilpums aprēķināts pēc I. Liepas (1996) formulas (1):

$v = 0,7450 \cdot 10^{-4} L^{0,81295} d^{0,06935lgL+1,85346}$, kur (1)
 v – baltalkšņa stumbra tilpums m^3 ar mizu;
 L – stumbra garums, m;
 d – caurmērs krūšaugstumā, cm.

DNS izdalīšana

Ievāktie koksnes paraugi pirms izdalīšanas izturēti dejonizētā ūdenī (apm. 24 stundas). Pēc tam ūdens no parauga noliets un tas izžāvēts. Tad paraugs ievietots 2 ml ependorfa stobriņā ar metāla bumbiņu. Audi sasaldēti šķidrā slāpekli un kratīti mehāniskajā homogenizātorā Retsch MM400 ar frekvenci 30x/s 3 min. divos etapos. Paraugam pievienoti 600 μ l ekstrakcijas bufera (0,1M TrisHCl pH 8,0, 0,5M NaCl, 50mM Na₂EDTA, 1,24% SDS,) pH 7.5-8,0, kam neilgi pirms lietošanas pievienots: 0,38% Na bisulfīts, 4% polivinila piroolidons (PVP) un 400 μ l/100ml merkoptoetānola. Paraugi inkubēti 20 minūtes 65°C temperatūrā un ik pēc 10 minūtēm miksēti (vorteksējot). Tad pievienots 450 μ l atdzesēta 5 M amonija acetāta; paraugs miksēts invertējot un inkubēts 60 minūtes 0°C temperatūrā. Centrifugēti 20 min. 13000 rpm. Supernatants ievietots jaunā stobriņā un tam pievienots hloroforms: izožāmilspirta maisījums (1:24), attiecībā 1:1 pret supernatantu, un sakratīts. Centrifugēti 20 min. 13000 rpm. Ūdens fāze pārvietota jaunā stobriņā, pievienojot izopropanolu attiecībā 1:1, tad veikta mikšēšana invertējot. Inkubēti 10-20 minūtes istabas temperatūrā. Centrifugēti 20 min. 13000 rpm, pēc tam šķidrums uzmanīgi noliets. Nogulsnēm pievienoti 800 μ l 70% EtOH. Centrifugēti 15 min. 13000 rpm. DNS atkārtoti šķīdināti 50 μ l TE buferī.

Marķieru genotipēšana veikta, kā iepriekš aprakstīts Zhuk *et al.* (2008) un VPP pārskatos (http://www.silava.lv/userfiles/file/2009_Daugavietis_VPP.pdf). Izstrādāti regresijas vienādojumi hibridizācijas pakāpes jeb baltalkšņa gēnu īpatsvara ietekmes noteikšanai uz koku vidējo caurmēru un vidējo augstumu, kā arī vidējo stumbra tilpumu.

Rezultāti un diskusija

No 132 analizētajiem indivīdiem 5 bija tīri baltalkšņi un 19 tīri melnalkšņi. Tikai 5 indivīdiem tika atrastas 50% baltalkšņa alēles un 50% melnalkšņa alēles, savukārt tikai 3 no tiem bija iespējamie pirmās paaudzes hibrīdi (kuriem visi lokusi ir heterozigotiskā stāvoklī); 51 indivīdam pārsvarā konstatētas baltalkšņa alēles un 54 indivīdiem – pārsvarā melnalkšņa alēles. Analīzes rezultāti apkopoti 1. tabulā.

Kā rāda analīzes rezultāti, vairāk nekā 80% izpētīto indivīdu ir gan baltalkšņa, gan melnalkšņa alēles, bet ļoti maz ir tādu, kas varētu būt iespējamie pirmās paaudzes hibrīdi (2,3%).

Analīzes rezultātā iegūtie dati tika sadalīti pa baltalkšņa alēļu sastopamības klasēm, kur koki ar 0% baltalkšņa alēlēm atzīmēti kā tīri melnalkšņi, bet koki ar 50% baltalkšņa alēlēm – kā pirmās paaudzes hibrīdi (tad, ja visi marķieri uzrādīja heterozigotāto hibrīdu stāvokli), savukārt koki ar 100% baltalkšņa alēlēm – kā tīri baltalkšņi. No tiem 19 (14,4%) identificēti kā tīri melnalkšņi, 5 (3,8%) – kā tīri baltalkšņi un 105 (79,5%) – kā dažādas pakāpes abu sugu hibrīdi. Tikai 3 (2,3%) noteikti kā potenciālie pirmās paaudzes

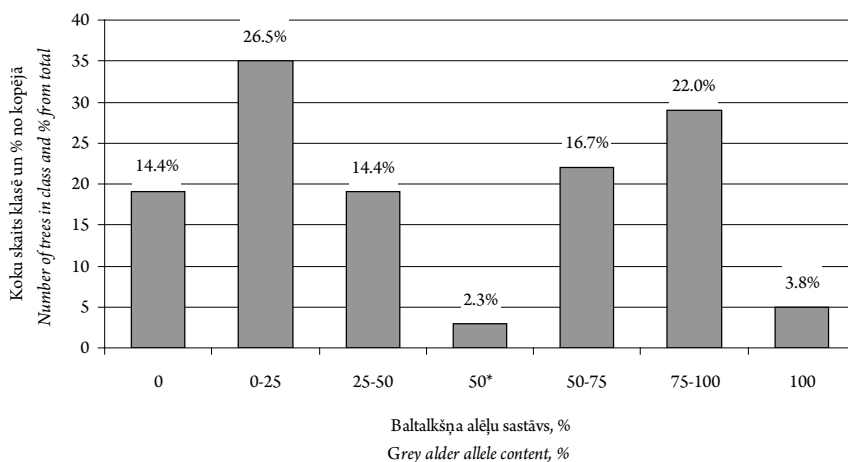
hibrīdi. Vairākumam hibrīdu baltalkšņu-melnalkšņu alēļu attiecība nebija 1:1. Šāda alēļu sadale sagaidāma gadījumā, ja pirmās paaudzes hibrīds ir krustojies ar

tīru melnalksni vai baltalksni, jo tad alēļu proporcija katrā nākamajā paaudzē samazinās par aptuveni 50%. Alēļu sadales rezultāti apkopoti 1. attēlā.

1. tabula, Table 1

Sugu specifisko marķieru analīzes kopsavilkums
Summary of species-specific marker analyses

	Skaits / Number	%
Analizētie indivīdi	132	
100% baltalkšņu alēles	5	3,8
100% melnalkšņu alēles	19	14,4
>50% baltalkšņu alēles	52	40,9
>50% melnalkšņu alēles	51	38,6
50% abu sugu alēles	5	3,8
Iespējamie pirmās paaudzes hibrīdi	3	2,3



1. attēls. Kalsnavas stādījuma koku sadalījums pēc baltalkšņa alēļu īpatsvara.

Figure 1. Distribution of individuals from the Kalsnava stand into grey alder allele frequency classes.

* – potenciālie pirmās paaudzes hibrīdi / potential 1st generation hybrids.

Vidējās taksācijas rādītāju vērtības dotas 2. tabulā: augstākās vērtības ir alkšņiem ar 50% melnalkšņa alēļu skaitu, zemākās konkrētajā audzes vecumā ir melnalksnim. Hibrīdalkšņu vidējais stumbra krūšaugstuma caurmērs pārsniedz baltalkšņu stumbra caurmēru par 9,3%, bet stumbra tilpumu – par 16,8%. Koku augstums alkšnim, kā gaismas prasīgai sugai, svārstās robežās no 23,5 līdz 24,8 m un būtiskas atšķirības

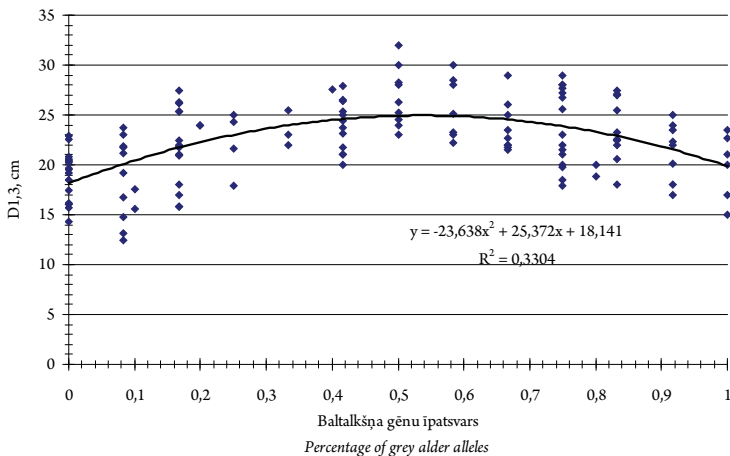
atkarībā no hibrīdizācijas pakāpes tam nav konstatētas (2. tabula).

Hibrīdizācijas pakāpes ietekmes raksturu uz koku vidējo krūšaugstuma caurmēru (2. att.) un koku stumbra vidējo tilpumu (3. att.) raksturo otrās pakāpes kvadrātvienādojumi, kas rāda, ka, pieaugot hibrīdizācijas pakāpei, koku taksācijas rādītāji palielinās.

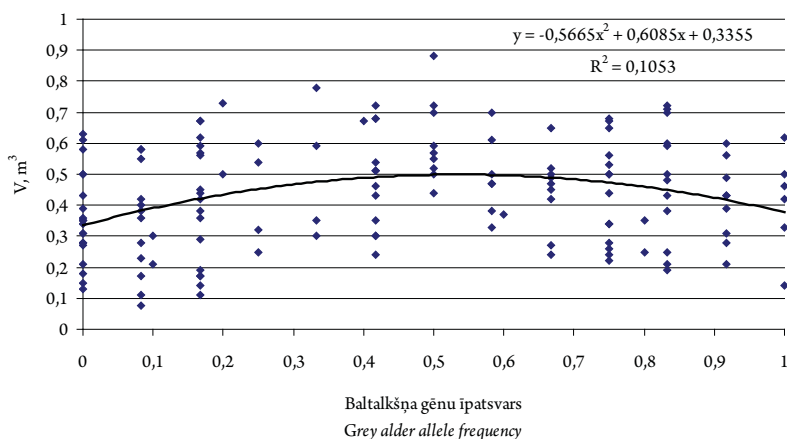
2. tabula, Table 2

Alkšņu vidējie taksācijas rādītāji
Forest inventory data of alders

Koku suga <i>Tree species</i>	Taksācijas rādītāji, vidēji <i>Average data</i>		
	DBH, cm / %	V, m ³ / %	Koku augstums, H, m/% <i>Tree height, H, m/%</i>
Baltalksnis <i>Grey alder</i>	23,00±3,14/100,0	0,499±0,25/100,0	23,5±2,8/100,0
Melnalksnis <i>Common alder</i>	20,08±4,22/87,3	0,338±0,15/67,7	23,1±1,7/98,3
Hibrīds (50:50) <i>Hybrid</i>	25,13±3,46/109,3	0,583±0,12/116,8	24,8±1,1/105,5



2. attēls. Koku krūšaugstuma caurmērs atkarībā no baltalkšņa alēļu īpatsvara.
Figure 2. Correlation of individual tree DBH with percentage of grey alder alleles.



3. attēls. Stumbra tilpums atkarībā no baltalkšņa alēļu īpatsvara.

Figure 3. Correlation of individual tree stem volume with frequency of grey alder alleles.

Izpētītā Kalsnavas hibrīdalkšņa stādījuma izcelsme nav skaidra, tomēr genotipēšanas dati liecina, ka vairākiem indivīdu atrodams abu sugu alēles. Ņemot vērā, ka tikai 3 indivīdi pēc genotipēšanas identificēti kā potenciālie pirmās paaudzes hibrīdi, varam secināt, ka šis hibrīdalkšņa stādījums nav ierīkots ar pirmās paaudzes hibrīdiem (t.i. no baltalkšņa un melnalkšņa krustojuma sēklām). Izpētajā stādījumā hibrīdie indivīdi sadalījās vienmērīgi divās grupās: (1), kur pārsvarā baltalkšņa alēles (52 indivīdi – 39,4%); (2), kur pārsvarā melnalkšņa alēles (51 indivīds – 38,6%). Alkšņu mākslīgās hibrīdizācijas pētījumos secināts, ka hibrīdizācija ir veiksmīga tikai tad, ja baltalkšnis izmantots kā mātes koks (Кундзиньш, 1968). Pēc mūsu pētījuma rezultātiem nav iespējams noteikt sākotnējo hibrīdizācijas virzienu, tomēr var secināt, ka pirmās paaudzes hibrīdu tālākai krustojšanai tikai baltalkšnis

kā mātes koks nav izmantots, jo pretējā gadījumā stādījuma indivīdos pārsvarā tiktu atrastas baltalkšņa alēles. Visticamāk, ka sēklas Kalsnavas stādījumam ir iegūtas, apputeksnējot hibrīdalkšni ar meln- un baltalkšņa putekšņu maisījumu. Šāda varianta iespējamību izskaidro arī genotipēšanas rezultāti, kad vairākiem hibrīdu pārsvarā atrastas vai nu baltalkšņa vai melnalkšņa alēles.

Kalsnavas stādījums nav ierīkots ar pirmās paaudzes hibrīdiem, kas dotu vislielāko heterozes efektu. Tomēr, pēc taksācijas rādītāju saistības ar hibrīdizācijas pakāpi, skaidri redzams, ka augstākie taksācijas rādītāji ir tiem indivīdiem, kuru hibrīdizācijas pakāpe ir 50%. Arī tad, ja pieņemam, ka šie indivīdi nav pirmās paaudzes hibrīdi, vienmērīgais abu sugu alēļu sadalījums liecina par augstu visa genoma heterozigotitāti un, tātad, par iespējami izteiktāku heterozes efektu.

Secinājumi

Kalsnavas alkšņu stādījumā ar izmantotajiem sugu specifiskajiem marķieriem, tikai 3 indivīdi (2,3%) identificēti kā potenciālie pirmās paaudzes hibrīdi. No 132 analizētajiem indivīdiem 108 (81,8%) atrastas gan baltalkšņa, gan melnalkšņa alēles, kas liecina par stādījuma hibrīdo izcelsmi. Hibrīdu vienmērīgais sadalījums divās grupās ļauj secināt, ka Kalsnavas stādījuma ierīkošanai acīmredzot izmantotas sēklas, kas iegūtas, hibrīdalksni apputeksnējot ar meln- un baltalkšņa putekšņu maisījumu. Pētījumā konstatēts, ka, hibrīdizācijas pakāpei pieaugot, koku taksācijas rādītāji palielinās un alkšņa hibrīdu taksācijas rādītāji pārsniedz gan melnalkšņa, gan baltalkšņa rādītājus.

Literatūra

- Bruford, M.W., Wayne, R.K. (1993). Microsatellites and their application to population genetic studies. *Current Opinion in Genetics and Development* 3: 939-943.
- Khasa, P.D., Dancik, B.P. (1996). Rapid identification of white-Engelmann spruce species by RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 92: 46-52.
- Kundziņš, A.V., Pīrāgs, D. (1959). Alkšņu hibrīdās formas Latvijas PSR (*Alnus glutinosa* x *Alnus incana*) un to koksnes anatomiskās īpatnības. *LPSR ZA Vēstis*, 8: 161-168.
- Li, B., Howe, G.T., Wu, R. (1998). Developmental factors responsible for heterosis in aspen hybrids (*Populus tremuloides* x *P. tremula*). *Tree Physiology* 18: 29-36.
- Liepa, I. (1996). Pieauguma mācība. Jelgava, LLU, 123 lpp.
- Zhuk, A., Veinberga, I., Daugavietis, M., Rungis, D. (2008). Cross-species amplification of *Betula pendula* Simple Sequence repeat markers in *Alnus spp.* *Baltic Forestry* 14: 116-121.
- Кундзиньш, А.В. (1968). Опыты искусственной гибридизации ольхи. Зинатне, Рига: Сборник «Повышение продуктивности леса», стр. 69-99.