

Klonu sastāvs parastās apses (*Populus tremula* L.) dabiski atjaunojušās jaunaudzēs

Jānis Smilga¹, Mārtiņš Zeps¹, Angelika Voronova-Petrova¹,
Baiba Džeriņa¹, Āris Jansons^{1*}

Smilga, J., Zeps, M., Voronova-Petrova, A., Džeriņa, B., Jansons, Ā. (2012). Clonal composition in young stands of common aspen (*Populus tremula* L.). Mežzinātne 26(59): 88-101.

Kopsavilkums. Parastā apse ir ātraudzīga pioniersuga ar nozīmīgu un potenciāli pieaugošu lomu koksnes ieguvē un vērtību bioloģiskās daudzveidības nodrošināšanā boreālajā un hemoboreālajā zonā. Parastās apses audžu klonu struktūra ir maz pētīta, izpratne par to ir nepieciešama, lai nodrošinātu viena no bioloģiskās daudzveidības līmeņiem – ģenētiskās daudzveidības – aizsardzību. Pētījuma mērķis ir novērtēt klonu skaitu un izvietojumu dabiski atjaunojušās parastās apses jaunaudzēs. Kopumā analizēti 505 koki, kas ievākti vēri, gāršā un platlapju kūdrenī 18 jaunaudzēs 6 Latvijas reģionos. Klonu skaita raksturošanai lietotas fenotipiskās pazīmes un mikrosatelītu marķieri.

Konstatēts, ka apses klonu identifikācija pēc to fenotipiskajām pazīmēm (lapu plaukšanas un dzeltēšanas laiks, mizas krāsa u.c.) nav precīza: šādi iespējams izdalīt tikai 44 ± 8 % klonu, kas identificējami, pielietojot 6 mikrosatelītu marķierus. Identificēto klonu skaits atkarīgs no izmantoto marķieru kvalitātes un skaita: konstatēts, ka ar 3 marķieriem vidēji iespējams izdalīt par 22 % mazāk klonu, nekā izmantojot 6 marķierus.

Analizētajās 18 apšu jaunaudzēs konstatēti vidēji $9,4 \pm 2,65$ kloni ha^{-1} . Atšķirības starp atsevišķām audzēm ir nozīmīgas: klonu skaits ir robežās no $5,3 \text{ ha}^{-1}$ līdz 22 ha^{-1} . Lielākā daļa klonu (79 %) pārstāvēti tikai ar 1 rametu. Tas liecina, ka ģenētiskā daudzveidība katras audzes ietveros ir samērā augsta – neviens no kloniem nav guvis būtisku pārsvaru.

Vidējais attālums starp viena klona rametiem ir $48 \pm 9,54$ m, maksimālais konstatētais attālums – 169,4 m. Tas liecina par dažu apšu klonu potenciālu, jo tie konkrētajos apstākļos izrādās piemērotāki nekā citi un aizņem samērā lielas platības, veidojot audzes ar zemu ģenētisko daudzveidību. Tādēļ ir būtiska klonu struktūras raksturošana un periodiska inventarizācija ģenētisko resursu aizsardzībai paredzētajās audzēs.

Nozīmīgākie vārdi: ģenētiskā daudzveidība, atjaunošanās, klonu identifikācija.

•••

Smilga, J.², Zeps, M.², Voronova-Petrova, A.², Džeriņa, B.², Jansons, Ā.^{2*} **Clonal composition in young stands of common aspen (*Populus tremula* L.).**

¹ LVMI Silava, Rīgas iela 111, Salaspils, LV-2169, Latvija; *e-pasts: aris.jansons@silava.lv

² Latvian State Forest Research Institute "Silava", 111 Rīga str., Salaspils, LV-2169, Latvia,

*e-mail: aris.jansons@silava.lv

Abstract. Common aspen is a fast growing pioneer species with a notable and potentially increasing role in wood production as well as substantial importance for biodiversity in boreal and hemiboreal forests. Currently in Latvia aspen-dominated stands occupy 244.7 thousand ha and it is the fifth most wide-spread species. Therefore areas for protection of the genetic resources of aspen have been established. However, important information to efficiently accomplish this task and preserve the diversity is lacking: clonal composition of aspen stands has not been studied in Latvia and the information available elsewhere is very limited. Therefore the aim of the study is to assess the number and distribution of clones in young stands of common aspen.

Sample trees for the study (altogether 505) were systematically (with distance 10-15 m) collected in 18 randomly selected stands of common aspen at the age of 5 to 10 years, located in 6 geographically distant regions with the highest proportion of common aspen. Stands were located on fertile mineral soil (17 stands) and fertile drained peat soil (1 stand). Clones were identified using a combination of phenotypic traits, assessed during the spring – leaves flush, colour of leaves, and during the autumn – coloration and fall of leaves as well as colour and texture of bark, crown shape and branch angle. Clones were identified also using SSR markers.

The results showed that clone identification using only phenotypic traits can be very misleading – only 44 ± 8 % of clones detected using 6 SSR markers were distinguishable by phenotypic traits. Both the quality and number of SSR markers employed affected the observed diversity of clones: using only 3 SSR markers it was possible to identify 22 % fewer clones than using 6 SSR markers.

On average 9.4 ± 2.65 clones ha⁻¹ occurred in the studied stands. Considerable differences between stands were detected, ranging from 5.3 to 22 clones ha⁻¹. The majority of clones (79 % on average with high variation among stands) were represented only by a single copy (ramet), indicating substantial within-stand diversity. Average distance between ramets of the same clone was 48 ± 9.5 m, largest distance – 169.4 m. This suggests that in favourable conditions, a few of the fittest clones have a potential to occupy large areas and to form stands with a very limited genetic diversity. Therefore clone structure must be assessed and monitored in the areas dedicated for protection of genetic diversity of common aspen.

Key words: genetic resources protection, regeneration, clone identification.

•••

Смилга, Я.³, Зепс, М.³, Воронова-Петрова, А.³, Джериня, Б.³, Янсонс, А.^{3*} **Состав клонов осины обыкновенной (*Populus tremula* L.) в естественно восстановившихся молодняках.**

Резюме. Осина обыкновенная является быстрорастущей породой-пионером и потенциально имеет возрастающую роль в добыче древесины и значимость в обеспечении биологического разнообразия в бореальной и гемобореальной зонах. Структура клонов

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

в насаждениях осины обыкновенной исследована мало, её осознание необходимо для защиты одного из уровней биологического разнообразия – генетического разнообразия. Цель исследования – оценка численности клонов и их размещения в естественно восстановившихся молодняках осины обыкновенной. В общем итоге анализировано 505 деревьев, которые срублены в кисличнике, в снытевом и в осушенном торфяном кисличнике в 16-ти молодняках в 6-ти регионах Латвии. Для характеризования численности клонов использованы фенотипические признаки и маркёры микросателитов.

Выяснено, что идентификация осиновых клонов по фенотипическим признакам является не точной по сравнению с использованием 6-ти маркёров микросателитов, потому что в первом случае можно обособить только 44 ± 8 % клонов. Число идентифицированных клонов зависит от качества и численности примененных маркёров: констатируется, что используя 3 маркёра в среднем можно обособить на 22 % меньше клонов нежели используя 6 маркёров.

В исследованных 16 молодняках осины распознано в среднем $9,4 \pm 2,65$ клонов га^{-1} . Различия между отдельными насаждениями являются существенными – число клонов находится в пределах от га^{-1} до 22га^{-1} . Большинство клонов (79 %) представлено только одним раметом. Это свидетельствует о том, что генетическое разнообразие в пределах каждого насаждения является высокой – ни один из клонов не добился существенного превосходства над другими: можно предположить, что на этих площадях осиновые насаждения были только в предыдущем (в одном) поколении. Среднее расстояние между раметами одного клона – $48 \pm 9,54$ м, определенное максимальное расстояние – 169,4 м. Это свидетельствует о потенциальных возможностях некоторых осиновых клонов, которые являются более пригодными в данных условиях произрастания и занимают сравнительно большие площади, образуя насаждения с низким генетическим разнообразием. Поэтому существенное значение имеет характеристика структуры клонов и периодическая инвентаризация насаждений, подлежащих охране генетических ресурсов.

Ключевые слова: генетическое разнообразие, восстановление, идентификация клонов.

Ievads

Parastā apse (*Populus tremula* L.) ir pioniersuga ar nozīmīgu lomu bioloģiskās daudzveidības nodrošināšanā boreālajā un hemoboreālajā zonā, kā arī saimniecisko vērtību enerģētiskās koksnes ieguvē un specifisku nišas produktu ražošanā. Latvijā tā ir piektā izplatītākā koku suga, kas aizņem 244,7 tūkst. ha (MSI dati).

Parastās apses vairošanos nodrošina liels sēkļu skaits, kuras pēc izmēriem ir mazas un spēj pārvietoties lielos attālumos. Sēkļu dīgtspēja saglabājas īsu laiku (2-3 diennaktis), sējeņu izdzīvotība ir zema (Latva-Karjanmaa *et al.*, 2003; Mangalis, 2004), toties sēkļu skaits ir liels un varbūtība, ka kāda iesēties labvēlīgā mikrobiotopā (kāds veidojas, piemēram, pēc meža ugunsgrēka) ir relatīvi augsta (Suvanto, Latva-Karjanmaa,

2005). Dabisko traucējumu trūkums, kas kavē sekmīgu (biežu) atjaunošanos ar sēklām, atzīmēts kā viens no galvenajiem apšu audžu ģenētiskās daudzveidības samazināšanās cēloņiem (Myking *et al.*, 2011).

Sugas saglabāšanos noteiktā platībā un izplatīšanos nelielos attālumos nodrošina atjaunošanās ar sakņu atvasēm, kas pēc koku nociršanas veidojas ļoti intensīvi – biežums var sasniegt pat 100000 ha⁻¹ (Smilga, 1968). Tāpat konstatēts, ka klona aizņemtā platība un klonu skaits dažādos ģeogrāfiskajos apgabalos ir atšķirīgs – virzienā uz ziemeļiem palielinās atjaunošanās ar sakņu atvasēm īpatsvars kopējā apšu audžu platībā. (Peck *et al.*, 1998). Atjaunojoties tikai ar atvasēm, ģenētiskā daudzveidība audzē pakāpeniski samazinās, jo:

- a) notiek intensīva konkurence starp kloniem, kā rezultātā izdzīvo tikai piemērotākie (Eriksson, 1989);
- b) atvasēja veidošanās kavē jaunu genotipu sēklu nokļūšanu platībā un samazina dīgstu izdzīvošanas iespējas (Jelinski, Cheliak, 1992).

Parastās apses audžu klonu struktūra ir maz pētīta. Amerikas apsei (*Populus tremuloides* Michx.) konstatēts, ka viens klons aizņem līdz pat 43,3 ha un ir pārstāvēts ar 47000 rametu (Kemperman & Barnes, 1976). Klona izplatību ierobežo slimības, novecošanās, kaitīgu mutāciju uzkrāšanās un klonu savstarpējā konkurence (Steinger *et al.*, 1996), kā arī konkurence paša klona ietvaros, kas ietekmē tā pārstāvību – rametu skaitu (Krasny & Johnson, 1992; Peterson & Jones, 1997).

Klona vecuma noteikšana ir komplicēta, jo kloni spēj saglabāties,

nomainoties vairākām rametu paaudzēm. Rametu vecumstruktūra var sniegt informāciju par audzes attīstības vēsturi un klona izplatības dinamiku (Harper, 1977). Šos datus kombinējot ar klona aizņemto platību, iespējams gūt aptuvenu priekšstatu par klona vecumu (Steinger *et al.*, 1996). Teorētiski kloni var būt tikpat veci kā pirmās apses, kas iesējušās pēc ledus laikmeta, ap 10000 gadu senā pagātnē (Suvanto, 2005). Līdzīgi secinājumi izdarīti, analizējot Amerikas apses audzes (Kemperman & Barnes, 1976).

Klonu identificēšanai izmanto fenotipiskās pazīmes un ģenētiskos marķierus. Biežāk lietotās fenotipiskās pazīmes ir stumbra forma, mizas krāsa un robojums, zarojuma veids, lapu plaukšanas laiks un iekrāsošanās (Suvanto, 2005). Taču šāda klonu identificēšana nav precīza (Rogstadt *et al.*, 1991), jo fenotipiskās atšķirības, pēc definīcijas, nosaka ne tikai ģenētiskie, bet arī vides faktori, turklāt tām raksturīgas izmaiņas līdz ar koka vecuma palielināšanos. Vēl jāņem vērā, ka pazīmēm ļoti reti ir raksturīgi izteiktas gradāciju klases, jo mainība parasti ir pakāpeniska un vērtētāja lēmums ir subjektīvs, piemēram, ka šī koka mizas krāsa uzskatāma par pelēku, bet blakus koka par gaiši zaļpelēku – tātad tas radies no cita klona.

Klonu identifikācijai lieto dažādas molekulārās analīzes metodes: izoenzīmu analīzi un DNS salīdzinošās metodes, tādas kā nejauši amplificēto DNS fragmentu variācija (RAPD, no angļu valodas: *Random Amplified Polymorphic DNA*) (Lin *et al.*, 1994; Rajora, Rahman, 2003), amplificēto fragmentu garuma variācijas (AFLP no angļu valodas: *Amplified Fragment Length*

Polymorphism) (Fossati *et al.*, 2005) un mikrosatelītu atkārtojumu variācija (SSR no angļu valodas: *Simple Sequence Repeat*) (Rajora, Rahman, 2003; Suvanto, 2005). Salīdzinājumā ar izoenzīmu analīzi, DNS analīzes metodes neietekmē ne koku vecums, ne augšanas apstākļi. Izoenzīmu variācija bieži vien ir ļoti neliela (Lin *et al.*, 1994), kas apgrūtina radniecīgi tuvu indivīdu atšķiršanu. Nespecifiskie RAPD un AFLP marķieri ir dominanti, taču liels amplifikācijas joslu skaits šo trūkumu atsvēr. Minēto marķieru uzrādītie dati var atšķirties pat atkarībā no izmantotās DNS ekstrakcijas metodes (Benjak *et al.*, 2006; Koivuranta *et al.*, 2008). Ar AFLP metodi arī var iegūt neskaidrus rezultātus, tādēļ to izmantot klonu identifikācijai neiesaka (Fossati *et al.*, 2005; Koivuranta *et al.*, 2008). Salīdzinājumā ar šīm metodēm mikrosatelītu marķieri ir specifiski, kodominanti, jo sniedz informāciju par augsti polimorfem lokusiem. SSR metode tehniski ir vieglāk izpildāma, turklāt iegūtie rezultāti ir precīzi un salīdzināmi starp laboratorijām, un tādēļ metode ir rekomendējama klonu identifikācijai.

Precīzāko informāciju par klonu izvietojumu audzē iespējams iegūt, analizējot visu koku DNS datus, tomēr šāda pieeja saistīta ar apjomīgu analizējamo paraugu skaitu un lielām izmaksām, tādēļ visu iepriekšējo mūsu parastās apses pētījumu pamatā ir paraugkoku izvēle un to analīze.

Ņemot vērā nepieciešamību nodrošināt efektīvu ģenētisko resursu aizsardzību un iepriekšējas informācijas trūkumu par klonu daudzveidību un tās telpisko sadalījumu apšu audzēs Latvijā, pētījuma mērķis ir novērtēt klonu skaitu un izvietojumu dabiski atjaunojušās parastās apses jaunaudzēs.

Metodika

Klonu izvietojuma telpiskās struktūras vērtēšanai izvēlēti reģioni, kur ir augsts parastās apses audžu īpatsvars. No tām pēc taksācijas datiem atlasītas paraugaudzes, kas apsektas nejaušā secībā, un tad ņemta pirmā audze, kas atbilst mūsu izvirzītajiem kritērijiem – tā ir 5 līdz 10 gadus veca apses tīraudze vismaz 1 ha platībā relatīvi nemainīgos augsnes apstākļos – viena auglīga meža tipa (vēris, gārša, platlapju kūdrenis) ietvaros. Apsektās teritorijas izvēlētas tā, lai būtu pārstāvēti visi Latvijas reģioni.

Kopumā atlasītas 18 audzes: 13 vēri, 4 gārša un 1 platlapju ārenī. Katrā audzē, iespējami regulārā tīklā ik pēc 15 soļiem (10 līdz 15 m), izvēlēts paraugkoks, kura tālākai analīzei fiksētas GPS koordinātes. Paraugkoki audzes ietvaros numurēti, no tiem ievākts materiāls DNS izdalīšanai un atkārtoti (pavasārī pumpuru plaukšanas laikā un rudenī lapu dzeltēšanas periodā 2 reizes) veikts vairāku fenotipisko pazīmju izvērtējums: tikko izplaukušu lapu krāsa, pumpuru plaukšanas stadija, mizas krāsa un tekstūra, vainaga forma un zaru leņķis, lapu dzeltēšanas un nobiršanas laiks. Visu pazīmju kopums izmantots, subjektīvi definējot klonu skaitu un to rametus katrā audzē.

SSR analīzei DNS izdalīta no apses lapām ar modificētu CTAB metodi (Doyle & Doyle, 1987). Ekstrakcijas buferim pievienots polivinilpirolidons (PVP) un β-merkaptotetanolis (Porebski *et al.*, 1997). Parastās apses (*Populus tremula* L.) genotipēšanai izmantoti deviņi SSR marķieri, kas iepriekš izveidoti melnajai papelei (*Populus nigra* L.): WPMS_5 (Schoot *et al.*, 2000), WPMS_8, WPMS_10, WPMS_12,

1. tabula / Table 1

Pētījuma veikšanai izvēlētās apšu audzes
Aspen stands analysed in the study

Reģions Region	Audze Stand	Ģeogrāfiskās koordinātas Geographical coordinates	Platība, ha Area, ha	Meža tips Forest type	Vecums, gadi Age, years
Lisene	Lisene	N56°40' E26°47'	2,2	<i>Oxalidosa</i>	8
	Lisene		3,9	<i>Mercurialis mel.</i>	8
	Strumpnīca		3,7	<i>Oxalidosa</i>	7
Koknese	Koknese	N56°42' E25°33'	4,6	<i>Oxalidosa</i>	8
	Koknese		4,2	<i>Oxalidosa</i>	6
	Ogre		1,5	<i>Oxalidosa</i>	8
Limbaži	Limbaži	N57°29' E24°36'	1,5	<i>Aegopodiosa</i>	8
	Limbaži		1,8	<i>Oxalidosa</i>	4
	Limbaži		2,8	<i>Oxalidosa</i>	8
Žiguri	Žiguri	N57°09' E27°47'	5	<i>Oxalidosa</i>	7
	Žiguri		3,6	<i>Oxalidosa</i>	6
	Žiguri		4,9	<i>Oxalidosa</i>	8
Dundaga	Dundaga	N57°31' E22°31'	3,1	<i>Oxalidosa</i>	5
	Dundaga		3,6	<i>Oxalidosa</i>	6
	Dundaga		2,6	<i>Oxalidosa</i>	5
Auce	Auce	N56°27' E23°00'	2,8	<i>Oxalidosa</i>	5
	Auce		1,2	<i>Oxalidosa</i>	8
	Auce		2,5	<i>Oxalidosa</i>	5

WPMS_14, WPMS_15, WPMS_20, WPMS_18, WPMS_16 (Smulders *et al.*, 2001). Trīs marķieri, ar labas kvalitātes amplifikāciju, pielietoti visu 18 apses audžu genotipēšanai, trīs nākamie labākie (tātad kopā seši) – 15 audžu genotipēšanai. Tiešie praimeri iezīmēti ar 6-FAM, HEX vai NED fluorescento iezīmi amplifikācijas produktu vizualizēšanai. SSR amplifikācija veikta 20 µL reakcijas tilpumā ar šādu sastāvu: 50 ng DNS parauga, 1xTaq buferis (*Fermentas*), 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,1 µM no katra praimera, 0,08 mg BSA (*Fermentas*), 0,5 U Taq polimerāzes (*Fermentas*). Amplifikācijas reakcijas apstākļi: sākotnējā denatu-

rācija 3 minūtes 95°C; 38 reizes atkārtots cikls ar denaturāciju 30 sek. 95°C, praimeru hibridizāciju 30 sek. 55°C, sintēzi 30 sek. 72°C; beigu elongācija 10 minūtes 72°C. Amplifikācijas produkti atdalīti un vizualizēti ar ABI Prism 3130x-Avant Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*), hromatogrammas analizētas ar GeneMapper v. 4. (*Applied Biosystems*). Datu statistiskai analīzei izmantots GenAEx v.6.41 (Peakall, Smouse, 2006).

Kopumā analizēti 505 koki, kas novērtēti pēc fenotipiskajām pazīmēm, kā arī ar 3 līdz 6 mikrosatelītu marķieriem.

Rezultāti un diskusija

Klonu identificēšana

Klonu identifikācija pēc to fenotipiskajām pazīmēm nav precīza salīdzinājumā ar identifikāciju, pielietojot 6 mikrosatelītu marķierus, jo pirmajā gadījumā ir iespējams izdalīt (atpazīt) tikai 44 ± 8 % klonu (2. tab.). Visās audzēs kopā pēc fenotipa atpazīti 208 kloni, savukārt izmantojot ģenētisko marķieru datus – 385 kloni. Vērojamas nozīmīgas precizitātes atšķirības starp audzēm, jo, nosakot genotipu pēc fenotipiskajām pazīmēm, identificēti 11 % līdz 75 % no klonu skaita. Konstatēts, ka visprecīzāk kloni izdalāmi:

- a) pumpuru briešanas un lapu plaukšanas laikā. Šī perioda sākums arī relatīvi tuvu esošām audzēm var atšķirties līdz pat 2 nedēļām, tādēļ, lai plaukšanas sākumu nenokavētu, nepieciešama regulāra un bieža audžu apsekošana;
- b) lapu dzeltēšanas un nobiršanas laikā; taču šī perioda garumu būtiski ietekmē mikroklimatiskie faktori (piemēram, rudens salnas), un tam raksturīga augsta mainība starp audzēm un novērojumu gadiem.

Citas pazīmes (stumbra mizas krāsa, tekstūra, vainaga forma, zaru leņķis) izmantojamas tikai kā papildus informācijas avots klonu identifikācijas precizēšanai. Līdzīgi secinājumi izdarīti Somijā (Suvanto & Latva-Karjanmaa, 2005).

Genotipu (kloni) skaita noteikšanai pielietotie mikrosatelītu marķieri sākotnēji izstrādāti *Populus tremuloides* un *Populus nigra* klonu identificēšanai, bet ir sekmīgi izmantojami arī parastajai apsei (Koivuranta

et al., 2008, Suvanto *et al.*, 2005). Par to liecina arī marķieru daudzveidības indekss (Simpson, 1949), kura vērtība ir robežās no 0,56 līdz 0,83 (3. tab.). Tajā pašā laikā redzam, ka visi marķieri nav vienlīdz informatīvi: par kvalitatīvākiem uzskatāmi WPMS05, WPMS16 un WPMS14. Šajā aspektā secinājumi atbilst konstatētajam pētījumos Somijā (Koivuranta *et al.*, 2008). Izmantotajiem marķieriem alēļu skaits variēja no 9 līdz 25, identiska genotipa varbūtība (P_{gen} indekss) visos gadījumos bija mazāka par 0,000002.

Identificēto klonu skaitu nosaka ne tikai tas, cik informatīvs ir pielietotais marķieris, bet arī izmantoto marķieru skaits. Analizējot identificēto klonu skaitu saistībā ar izmantoto marķieru skaitu un izvērtējot visas iespējamās kombinācijas, konstatēts, ka ar 3 marķieriem vidēji iespējams izdalīt par 22 % mazāk klonu, nekā izmantojot 6 marķierus (1. att.). Ierobežota marķieru skaita izmantošana atsevišķos gadījumos var radīt ievērojamas neprecizitātes, piemēram, Auce-2 audzē pēc fenotipa izdalīts tikai 1 klons, pēc 3 marķieru datiem – 2, bet pēc 6 marķieru – 9 kloni (2. tab.). Identifikācijas precizitātes pieaugums, pievienojot katru nākamo marķieri, pakāpeniski samazinās, piemēram, palielinot marķieru skaitu no 5 līdz 6, identificēto klonu skaits palielinās tikai par 3,6 %.

Klonu skaits

Analizētajās apšu audzēs konstatēts relatīvi neliels klonu skaits: izmantojot 6 mikrosatelītu marķieru datus, konstatēts, ka vidēji uz ha ir $9,4 \pm 2,65$ kloni. Lielākais klonu skaits konstatēts Kokneses (11,3) un

2. tabula / Table 2

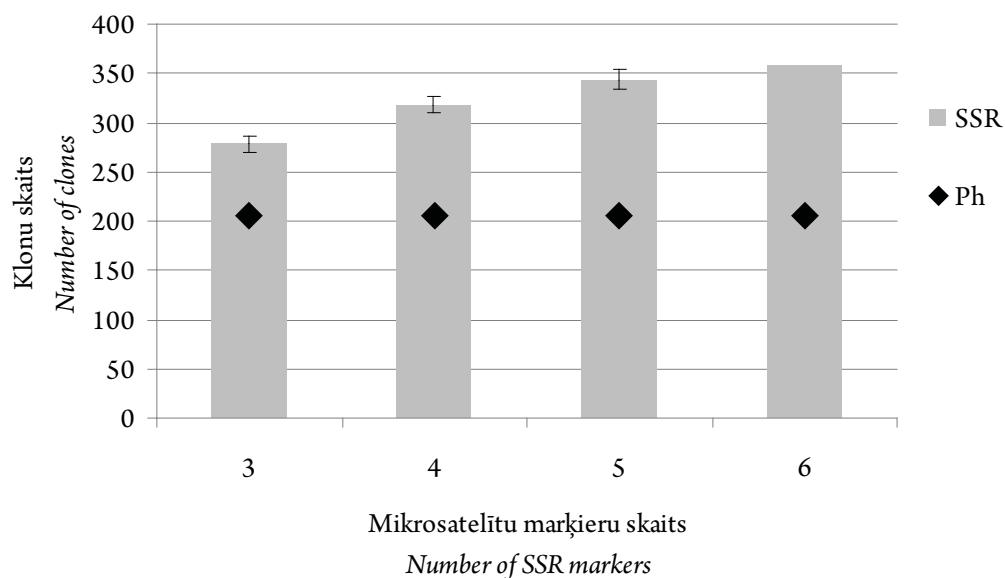
Klonu skaits parastās apses audzēs
Number of clones in common aspen stands

Reģions Region	Audze Stand	Paraugu skaits Number of samples	pēc fenotipa by phenotype	Klonu skaits, identificēts Number of clones, identified	
				izmantojot 3 mikrosatelītu marķierus using 3 SSR markers	izmantojot 6 mikrosatelītu marķierus using 6 SSR markers
Lisene	Lisene-1	37	16	21	30
	Lisene-2	29	12	25	26
	Strumpnīca	39	13	24	31
Koknese	Koknese-1	32	12	24	28
	Koknese-2	30	8	18	28
	Ogre	28	10	8	21
Limbaži	Limbaži-1	35	12	13	21
	Limbaži-2	22	10	7	13
	Limbaži-3	44	15	23	31
Žiguri	Žiguri-1	37	16	18	27
	Žiguri-2	31	10	19	25
	Žiguri-3	39	12	22	30
Dundaga	Dundaga-1	29	9	14	-
	Dundaga-2	32	12	22	-
	Dundaga-3	34	15	23	-
Auce	Auce-1	33	11	15	26
	Auce-2	22	1	2	9
	Auce-3	34	10	18	28
Vidēji audzē Mean in stand		32	10,9	17,1	24,1

Limbažu (10,8) reģionā, mazākais – Žiguru reģionā 6,2 kloni ha⁻¹. Vērtējot atsevišķas audzes, klonu skaits ir robežās no 5,3 ha⁻¹ līdz 22 ha⁻¹.

Klonu skaits parastās apses audzēs līdz šim izvērtēts tikai dažos pētījumos. Analizējot paraugus no 186 kokiem 4,6 ha platībā, Eastons (1997) identificējis 21 klonu – tātad vidēji 4,6 klonus ha⁻¹. Tādu pašu klonu skaitu

uz ha fiksējuši Culot *et al.* (1995), 3 ha lielā audzē ievācot datus no 25 paraugkokiem. Iespējamie Latvijā iegūto rezultātu atšķirību iemesli ir izmantotie marķieri – pētījumos klonu identifikācija veikta ar četriem (Culot *et al.*, 1995) un septiņiem (Easton, 1997) izoenīzmu marķieriem. Pielietojot 9 mikrosatelītu marķierus un analizējot 9 audzes (kopā 219 paraugkoki), Suvanto un



1. attēls. Identificēto klonu skaits saistībā ar pielietoto mikrosatelītu marķieru skaitu.
 Figure 1. Number of identified clones depending on the number of SSR makers used.

3. tabula / Table 3

Klonu identificēšanai pielietoto mikrosatelītu marķieru raksturojums
 Characteristics of microsatellite markers used for identification of clones

Mikrosatelītu marķieris SSR marker	DI*	Alēļu skaits Number of alleles	Genotipu skaits Number of genotypes
WPMS05	0,76	25	54
WPMS14	0,65	16	41
WPMS15	0,67	9	21
WPMS20	0,56	14	30
WPMS18	0,83	13	31
WPMS16	0,76	17	45

* DI – daudzveidības indekss (Simpson, 1949) / diversity index (Simpson, 1949)

Latva-Karjanmaa (2005) Somijā konstatējuši vidēji 12,7 klonus uz hektāra, kas ir vairāk nekā mūsu pētījumā. Autori, novērtējot parasto apsi Somijā un tai radniecīgo Amerikas apsi Kanādā (Namroud *et al.*, 2005; Wyman *et al.*, 2003), norāda, ka augstu ģenētisko daudzveidību audzēs nodrošinājuši atjaunošanās ar sēklām. Platībās, kur apstākļi sējeņu attīstībai nav labvēlīgi un atjaunošanās notiek tikai veģetatīvi, ģenētiskā daudzveidība var būt ļoti zema, piemēram, konstatēts, ka no 25 analizētajām Amerikas apses audzēm 17 ir monoklonālas (Dixon, 2012). Dažāds sēkļu materiāls (genotipu skaits) varētu būt iemesls minētajos pētījumos konstatētajām klonu skaita atšķirībām, kā arī atšķirībām starp audzēm mūsu veiktās izpētes ietvaros. Tāpat atšķirības varētu būt ietekmējuši klonu savstarpējā konkurence, ko nosaka klonu vecums un izvietojums. Pētījumam netika ievākta informācija par klonu skaitu iepriekšējā paaudzē, nav pieejami arī dati par mežaudzes sastāvu vairāk nekā vienu paaudzi iepriekš, un tādēļ nav izdarāma šo ietekmju matemātiska analīze. Tāpat, izvērtējot rezultātu (klonu skaits) atšķirības starp audzēm un salīdzinot mūsu un citu autoru pētījumos iegūtos datus, jāņem vērā, ka paraugi netika ievākti no visiem audzes kokiem, un tāpat faktiskais klonu skaits varētu būt lielāks par konstatēto.

Klonu aizņemtā platība

Pētījuma ietvaros apses klona aizņemto platību iespējams raksturot tikai ar attālumu starp tā rametiem. Konstatēts, ka vidējais attālums starp viena klona rametiem ir $48 \pm 9,54$ m. Mazākais vidējais attālums starp viena klona rametiem konstatēts Lisenēs

reģiona pirmajā audzē – 22 m, bet lielākais – 85,6 m – Kokneses reģiona pirmajā audzē. Lielākie attālumi starp viena klona rametiem konstatēti Limbažu reģiona pirmajā audzē (169,4 m) un Auces (136,3 m) reģiona otrajā audzē, kas būtiski pārsniedz citu valstu pētījumos fiksēto – maksimāli 60 m (Suvanto *et al.*, 2005). Starp klona rametu skaitu un attālumu starp rametiem pastāv cieša korelācija ($r = 0,77$, $p < 0,05$).

Interpretējot rezultātus, jāņem vērā, ka no kopējā identificēto klonu skaita 385 gab. (79 %) pārstāvēti ar 1 rametu. Vērojamas nozīmīgas atšķirības starp audzēm: otrajā Limbažu audzē ar vienu rametu pārstāvēti 54 %, bet otrajā Kokneses audzē – 96 % no kloniem. Tikai 5 kloni pārstāvēti ar vairāk nekā 5 rametiem. Tas norāda, ka vidēji katra klona aizņemtā platība ir neliela un tuva paraugkoku savstarpējam attālumam (10-15 m). Rezultāts saskan ar pētījumu datiem par apšu atjaunošanos, kas liecina, ka lielākais atvašu biezums ir 10-15 m rādiusā ap celmu (Suvanto, Latva-Karjanmaa, 2005). Tādējādi iegūtie rezultāti netieši norāda, ka analizētajās apšu audzēs neviens no kloniem nav guvis būtisku pārsvaru. Iespējams, ka šajās platībās apses audzes bijušas tikai vienu vai dažas paaudzes; tāpat iespējams, ka notiek papildus atjaunošanās ar sēklām, nodrošinot jaunu klonu ienākšanu mežaudzēs un līdz ar to palielinot to ģenētisko daudzveidību.

Citu autoru pētījumos klonu, kurus pārstāv tikai viens ramets, īpatsvars bijis zemāks – no 16 % (Suvanto, Latva-Karjanmaa, 2005) līdz 64 % (Easton, 1997). Likumsakarīgi, ka arī vidējais rametu skaits klonam bijis samērā augsts – no 1,8, Easton (1997) līdz 9,8 (Culot *et al.*, 1995).

Klonu pārstāvība parastās apses audzēs
Representation of clones in common aspen stands

Reģions Region	Kloni ar vairāk nekā 1 rametu, gab. Number of clones with more than 1 ramet	Attālums starp klona rametiem, m Distance between ramets of clone, m			Klonu ar 1 rametu īpatsvars, % Proportion of clones with 1 ramet
		minimālais minimal	vidējais average	maksimālais maximal	
Lisene	16	10,3	21,94	45,7	81
Auce	15	13,1	46,5	136,3	79
Limbaži	14	9,3	58,9	169,4	69
Žiguri	18	12	27,4	61,5	79
Koknese	3	41,4	85,6	111,5	90
Kolka*	19	13,6	36,3	86,2	66

* kloni identificēti ar 3 mikrosatelītu marķieriem / clones identified with 3 microsatellite markers

Viena klona aizņemto platību ietekmē ne tikai izplatīšanās (koka sakņu sistēmas īpatnības), bet arī audzes vēsture (cik paaudzēs konkrētajā vietā apse aug), konkurence ar citām koku sugām (piemēram, egli) un dabiskie traucējumi un/vai apsaimniekošanas režīms, kas var ierobežot jaunu klonu ieviešanās iespējas. Piemēram, ASV, analizējot Amerikas apses audzes, norādīts, ka viens klons pārsvarā neaizņem vairāk par 400 m² (Kemperman & Barnes, 1976), jo mežaudzes parasti tiek atjaunotas ar stādiem, kas iegūti no sēklām (tātad ir ģenētiski daudzveidīgi). Atjaunošana ar stādiem vai dabiskā atjaunošanās ar sēklām (kas reti kad ir sekmīga) ir vienīgie jauna

ģenētiskā materiāla ieneses veidi (Soane & Watkinson, 1979). Nozīmīgākā genotipu skaita samazināšanās jaunajās audzēs (īpaši, ja notikusi dabiskā atjaunošanās) novērota dažās pirmajās veģetācijas sezonās. Piemēram, Amerikas apses atvasāju izpētē konstatēts, ka pirmajā gadā iet bojā pat 50 % koku (Krasny & Johnson, 1992). Arī turpmākā audzes attīstības laikā, kā arī nomainoties paaudzēm, izdzīvo tikai piemērotākie genotipi un klonu skaits pakāpeniski samazinās (Watkinson & Powel, 1993), savukārt katrs klons aizņem aizvien lielāku platību. Piemēram, izvērtējot Amerikas apses audzes ASV konstatēts, ka viens klons aizņem pat 43 ha lielu platību (Kemperman & Barnes, 1976).

Secinājumi

1. Analizētajās 18 apšu jaunaudzēs konstatēti vidēji $9,4 \pm 2,65$ kloni ha^{-1} . Atšķirības starp atsevišķām audzēm ir nozīmīgas – klonu skaits ir robežās no $5,3 \text{ ha}^{-1}$ līdz 22 ha^{-1} .
2. Lielāko daļu klonu (79 %) paraugkopā, kas iegūta, izvēloties paraugkokus 10-15 m attālumā vienu no otra, pārstāv tikai 1 ramets. Tas liecina, ka analizētajās apšu audzēs neviens no kloniem nav guvis būtisku pārsvaru un saglabājas salīdzinoši augsta ģenētiskā daudzveidība. Sākotnējo daudzveidību nodrošina atjaunošanās ar sēklām, un tās saglabāšanās liecina, ka pētījumā aptvertajās platībās apses bijušas relatīvi nesenas (nelielā skaitā paudzju) un/vai papildus atvasēm platībā ar sēklām regulāri nonāk un labvēlīgās mikrobiotās izdzīvo jauni genotipi.
3. Vidējais attālums starp viena klona rametiem ir $48 \pm 9,54$ m, maksimālais konstatētais – 169,4 m, kas apliecina apšu spēju ar sakņu atvasēm izplatīties relatīvi lielā attālumā un veidot arī dažu klonu audzes vairāku ha platībā.

Pateicība: pētījums veikts LVMI Silava realizētā ESF projekta „Ģenētisko faktoru nozīme adaptētās spējīgu un pēc koksnes īpašībām kvalitatīvu mežaudžu izveidē” (Nr. ESF 2009/0200/1DP/1.1.1.2.0/09/APIA/VIAA/146) ietvaros.

Literatūra

- Benjak, A., Kondradi, J., Blaich, R., Forneck, A.** (2006). Different DNA extraction methods can cause different AFLP profiles in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Vitis*, 45, 14-21.
- Culot, A., Vekemans, X., Lefebvre, C., Homes, J.** (1995). Taxonomic identification and genetic structure of populations of the *Populus tremula* L., *P. alba* L. and *P. x canescens* (Ait.) sm. Complex using morphological and electrophoretical markers. In: Population Genetics and Genetic Conservation of Forest Trees. 113-119.
- Dixon, G. B.** (2012). Relationship between genetic diversity, clonal structure and sudden aspen decline in Kaibab national forest Arizona: thesis. Western Carolina University, USA, 103 p.
- Doyle, J. J., Doyle, J. L.** (1987). A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, p. 11-15.
- Easton, E.** (1997). Genetic variation and conservation of the native aspens (*Populus tremula* L.) resource in Scotland. PhD thesis, University of Edinburgh, UK.
- Eriksson, O.** (1989). Seedling dynamics and life histories in clonal plants. *Oikos*, 55, 231-238.
- Fossati, T., Zapelli, I., Bisoffi, S., Micheletti, A., Vietto, L., Sala, F., Castiglione, S.** (2005). Genetic relationships and clonal identity in a collection of commercially poplar cultivars assessed by AFLP and SSR. *Tree Genetics and Genomes*, 1, 11-19.
- Harper, J.** (1977). Population Biology of plants. Academic Press, London, 892 p.

- Jelinski, D. E., Cheliak, W. M.** (1992). Genetic diversity and spatial subdivision of *Populus tremuloides* (*Salicaceae*) in a heterogeneous landscape. *American Journal of Botany*, 79, 728-736.
- Kemperman, J., Barnes, B.** (1976). Clone size in American aspens. *Canadian Journal of Botany*, 54, 2603-2607.
- Koivuranta, L., Leinonen, K., Pulkkinen, P.** (2008). Marketing of forest reproductive material: the use of microsatellites for identification of registered tree clones in Finland. Working papers of the Finnish Forest research institute. URL <http://www.metla.fi/julkaisut/workingpapers/2008/mwp077.htm>.
- Krasny, M., Johnson, E.** (1992). Stand development in aspen clones. *Canadian Journal of Forest Research*, 2, 1424-1429.
- Kulju, K., Pekkinen, M., Varvio, S.** (2004). Twenty-three microsatellite primer pairs for *Betula pendula* (*Betulaceae*). *Molecular Ecology Notes*, 4, 471-473.
- Latva-Karjanmaa, T., Suvanto, L., Leinonen, K., Rita, H.** (2003). Emergence and survival of *Populus tremula* seedlings under varying moisture conditions. *Canadian Journal of Forest Research*, 33, 2081-2088.
- Lin, D., Hubbes, M., Zsuffa, L.** (1994). Differentiation of poplar and willow clones using RAPD fingerprints. *Tree Physiology*, 14, 1097-1105.
- Mangalis, I.** (2004). Meža atjaunošana un ieaudzēšana. "et cetera", 453 lpp.
- Myking, T., Bøhler, F., Austrheim, G., Solberg, E. J.** (2011). Life history strategies of aspen (*Populus tremula* L.) and browsing effects: A literature review. *Forestry*, 84, 61-71.
- Namroud, M., Park, A., Tremblay, F., Bergeron, Y.** (2005). Clonal and spatial genetic structures of aspen (*Populus tremuloides* Michx.). *Molecular Ecology*, 14, 2969-2980.
- Peakall, R., Smouse, P. E.** (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6, 288-295.
- Peck, J., Yearsley, J., Waxman, D.** (1998). Explaining the geographic distributions of sexual and asexual populations. *Nature*, 391, 889-892.
- Peterson, C. J., Jones, R. H.** (1997). Clonality in woody plants: a review and comparison with clonal herbs; in *The Ecology and Evolution of Clonal Plants* (eds. H. de Kroon & J. van Groenendael). Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands, pp. 263-289.
- Porebski, S., Bailey, L. G., Baum, B. R.** (1997). Modification of a CTAB DNA Extraction Protocol for Plants Containing High Polysaccharide and Polyphenol Components. *Plant Molecular Biology Reporter*, 15 (1), 8-15.
- Rajora, O., Rahman, M.** (2003). Microsatellite DNA and RAPD fingerprinting, identification and genetic relationships of hybrid poplar (*Populus x canadiensis*) cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 106, 470-477.
- Rogstad, S., Nybom, H., Schaal, B.** (1991). The tetrapod DNA fingerprinting M13 repeat probe reveals genetic diversity and clonal growth in quaking aspen (*Populus tremuloides*, *Salicaceae*). *Plant Systematic and Evolution*, 175, 115-123.

- Simpson, E. H.** (1949). Measurement of diversity. *Nature*, 163, 688 p.
- Steinger, T., Korner, C., Schmid, B.** (1996). Long-term persistence in a changing climate: DNA analysis suggest very old ages of clones of alpine *Carex curvula*. *Oecologia*, 105, 94-99.
- Suvanto, L. I., Latva-Karjanma, T. B.** (2005). Clone identification and clonal structure of the European aspen (*Populus tremula*). *Molecular Ecology*, 14, 2851-2860.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S.** (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731-2739.
- Watkinson, A., Powell, J.** (1993). Seedling recruitment and the maintenance of clonal diversity in plant populations – a computer simulation of *Ranunculus repens*. *Journal of Ecology*, 81, 707-717.
- Wyman, J., Bruneau, A., Tremblay, M. F.** (2003). Microsatellite analysis of genetic diversity in four populations of *Populus tremuloides* in Quebec. *Canadian Journal of Botany*, 81, 360-367.