
Parastās priedes populāciju fenoloģisko atšķirību ģenētiskie aspekti

U. Neimane^{1*}, I. Baumanis¹, I. Veinberga¹, V. Šķipars¹, D. Ruņģis¹

Neimane, U., Baumanis, I., Veinberga, I., Šķipars, V., Ruņģis, D. (2009). Genetic aspects of phenological distinctions in Scots pine populations. *Mežzinātne / Forest Science* 19(52): 49-63.

Kopsavilkums: Parastās priedes (*Pinus sylvestris* L.) populāciju ziedēšanas fenoloģiskās īpatnības pētītas, 2008. gada pavasarī veicot novērojumus divās priežu sēkļu plantācijās – Dravu plantācijā Latvijas rietumdaļā (pārstāvēti 65 Misas populācijas kloni) un Sāvienas plantācijā Latvijas austrumdaļā (pārstāvēti 76 Misas un 86 Smiltenes populācijas kloni). Fenoloģiskie novērojumi veikti 6 reizes laika periodā no 12. maija līdz 3. jūnijam. Katrā novērojumā reizē reģistrēta sievišķo un vīrišķo strobilu ziedēšanas fenoloģiskā fāze. Pēc sievišķo strobilu ziedēšanas kloni klasificēti piecās grupās (izteikti vēlu ziedošs, vēlu, vidēji, agri un izteikti agri ziedošs), pēc vīrišķo strobilu ziedēšanas – trīs grupās (vēlu, vidēji, agri ziedošs). Konstatēts, ka pastāv nozīmīgas ziedēšanas fenoloģiskās atšķirības gan starp dažādām populācijām, gan starp vienas populācijas atsevišķiem kokiem. Aptuveni puse klonu pieskaitāmi grupai „vidēji ziedošs”. Kopumā apstiprinājies pieņēmums, ka atšķirīgos augšanas apstākļos vienas populācijas agri un vēlu ziedošie kloni saglabā savas fenoloģiskās īpatnības (Misas kloni Sāvienas un Dravu plantācijās), un vienādos augšanas apstākļos atšķiras dažādu populāciju pēcnācēju ziedēšanas laiks (Misas un Smiltenes kloni Sāvienas plantācijā). Tātad pamatoti uzskatīt, ka šīs īpatnības, vismaz daļēji, ir ģenētiski nosacītas. Ģenētisko atšķirību noskaidrošanai starp dažādām ziedēšanas dinamikas grupām, veikta Misas klonu DNS analīze, izmantojot hloroplastu marķierus: rezultātā ne starp sievišķās, ne vīrišķās ziedēšanas dinamikas grupām atšķirības netika konstatētas, ko varētu skaidrot tādējādi, ka hloroplastu marķieri ir „neitrāli”, un tie nav saistīti ar morfoloģiskajām un fenoloģiskajām pazīmēm. Tādēļ turpmākajos fenoloģisko īpatnību pētījumos būtu nosakāma ziedēšanā iesaistīto gēnu ekspresija un alēļu atšķirības.

Nozīmīgākie vārdi: populācija, fenoloģija, ziedēšana, DNS analīze.

...

Neimane, U., Baumanis, I., Veinberga, I., Šķipars, V., Ruņģis, D., LSFRI „Silava”. **Genetic aspects of phenological distinctions in Scots pine populations.**

Abstract: The most important aim of seed orchards is the production of genetically superior seed material. Scots pine population flowering time phenology is especially important when selecting clones for seed orchard establishment. In order to obtain the highest quality seed material from seed orchards, it is important that all clones represented in the orchard contribute to seed production. Therefore, synchronisation of flowering time is important. The phenological characteristics of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) clones were investigated with

¹ LVMI “Silava”, Rīgas iela 111, Salaspils, LV-2169, Latvija; e-pasts: una.neimane@riga.lv

observations during the spring of 2008 in two seed orchards – Dravas in the western part of Latvia (containing 65 Misa population clones), and Sāviena in the eastern region of Latvia (containing 76 Misa population clones and 86 Smiltene population clones). Phenological observations were made 6 times in the period between the 12th of May and the 3rd of June. At each observation time, the development stage of both male and female strobiles was noted. The pine clones were categorized into 5 female flowering groups (very late, late, medium, early, very early), and 3 male flowering groups (late, medium, early). It has been established, that significant flowering time differences occur both between populations and within populations between different clones. About half of the clones fell into the medium category for both male and female flowering time. Of the Misas clones, 39% of clones fell into the medium category for female flowering time in the Sāvienas seed orchard and 45% in the Dravas seed orchard, while 74% of the Smiltenes clones fell into the medium category for female flowering time (average 53%). The average values for the female flowering groups “very late”, “late”, “early” and “very early” were 5%, 27%, 13% and 1%, respectively. With regard to male flowering time, the size of the medium group in both populations was very similar – 56-57%. The remaining clones were all classified as early flowering, except for one clone from the Misas population, and one from the Smiltenes population. No correlation was found between male strobile number and either male or female flowering time. Overall, the flowering time observations confirmed the hypothesis that early and late flowering clones maintained their phenological characteristics in differing environments (the Misa population clones in the Sāviena and Dravas seed orchards), and that progeny of different populations maintained phenological differences in the same growing conditions (the Misa and Smiltene clones in the Sāviena seed orchard). Therefore, the conclusion can be drawn that these phenological differences are at least partly genetically determined. DNA analysis using chloroplast markers was performed on the Misa clones to determine if population differences could be found between various flowering time groups. The DNA marker analysis showed, that utilising the chloroplast markers, no differences could be detected between either the male or the female flowering groups. This lack of population structure found using the chloroplast markers could be explained by the fact that they are “neutral” markers, which do not influence morphological or phenological traits. Therefore, gene expression and allele differences of candidate genes involved in control of flowering time should be investigated in further studies of phenological traits.

Key words: population, phenology, flowering, DNA analysis.

...

Неймане У., Бауманис И., Вейнберга И., Шкипарс В., Рунгис Д., ЛГИЛН «Силава».
Генетические аспекты фенологических различий между популяциями сосны обыкновенной.

Резюме: Фенологические особенности цветения популяций сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) исследованы в двух семенных плантациях сосны весной 2008 года – в плантации «Дравас» в западной части Латвии (представлено 65 клонов популяции «Миса»)

и в плантации «Савиена» в восточной части Латвии (представлено 76 клонов популяции «Миса» и 86 клонов популяции «Смилтене»). Проводилось 6 фенологических наблюдений в периоде с 12 мая по 3 июля. Каждый раз зарегистрирована фаза развития мужских и женских стробиллов. По цветению женских стробиллов, клоны классифицированы в пять групп (особенно поздно, поздно, средне, рано и особенно рано цветущие), по цветению мужских стробиллов – в трех группах (поздно, средне и рано цветущие). Обнаружены существенные отличия динамики цветения как между разными популяциями, так и между деревьями в пределах одной популяции. Примерно половина клонов зачислена в группу «средне цветущий». Подтвердилось предположение, что рано и поздно цветущие клоны одной популяции в различных растительных условиях сохраняют свое фенологическое своеобразие (клоны «Миса» в плантациях «Савиена» и «Дравас»), и в одинаковых растительных условиях потомства различных популяций отличаются временем цветения (клоны «Миса» и «Смилтене» в плантации «Савиена»). Поэтому можно предположить, что эти своеобразия, во всяком случае частично, генетически обусловлены. Чтобы выяснить, существуют ли генетические различия между разными группами динамики цветения, произведен анализ ДНК клонов популяции «Миса», используя маркеры хлоропластов. В результате различия динамики цветения не найдены ни между женскими, ни мужскими группами. Это можно объяснить тем, что использованные маркеры хлоропластов являются «нейтральными» и не влияют на морфологические и фенологические признаки. Поэтому в последующих исследованиях фенологических особенностей популяций необходимо выяснить экспрессию генов, связанную с цветением, и различия между аллелями.

Ключевые слова: популяция, фенология, цветение, анализ ДНК.

Ievads

Parastās priedes (*Pinus sylvestris* L.) populāciju ziedēšanas fenoloģisko īpatnību izpēte ir sevišķi nozīmīga, izvēloties klonus sēkļu plantāciju ierīkošanai, kur tiek īstenoti divi galvenie mērķi – sēkļu materiāla ieguve un šo sēkļu ģenētiski noteiktā vērtība. Tātad priedes klonu ziedēšana plantācijās vērtējama gan no ekonomiskā, gan no ģenētiskā viedokļa. Augstvērtīga materiāla ieguve sēkļu plantācijā iespējama, ja tajā pārstāvētie kloni savstarpēji apputeksnējas. Tādēļ nozīmīga ir klonu ziedēšanas sinhronitāte un līdz ar to klonu fenoloģisko īpatnību izpēte (Mátyás, 1991).

Sēkļu plantāciju ierīkošanai atlasītajiem

kloniem jābūt ne tikai produktīviem un kvalitatīvas sēklas ražojošiem, bet arī tādiem, kas nodrošina normālas intensitātes sinhronu sievišķo ziedēšanu (Пирарс et al., 1990).

Parastās priedes ģeneratīvās attīstības cikls turpinās trīs veģetācijas sezonas un ilgst 28-30 mēnešus (Laura, 1975). Pirmajā veģetācijas sezonā notiek vīrišķo un sievišķo strobilu aizmetņu veidošanās (attiecīgi jūnija beigās un jūlija beigās), kas nosaka ziedēšanas intensitāti un līdz ar to sēkļu kvantitāti (Laura, 1973). Ģeneratīvās attīstības cikla otrajā veģetācijas sezonā (ziedēšanas gadā) nozīmīgākie attīstības etapi ir ziedputekšņu veidošanās vīrišķajos un sēklaizmetņu veidošanās sievišķajos strobilos, ziedēšana un apputeksnēšanās (maiņā, jūnijā). Šo procesu

norise nosaka sēkļu ražas kvalitāti. Ģeneratīvās attīstības cikla trešajā veģetācijas sezonā (čiekuru nobriešanas gadā) notiek intensīva sēklaizmetņa attīstība, apaugļošanās (jūnija beigās) un sēklas nobriešana (Laura, 1975).

Veicot novērojumus sēkļu plantācijās, noskaidrots (Laura, 1973a), ka ģeneratīvās attīstības cikla pirmajā veģetācijas sezonā dažādu klonu kokiem vīrišķo ziedu aizmešanās laiki nedaudz atšķiras, ko varētu skaidrot ar katra klona iedzimtajām īpašībām. Arī ziedputekšņu nogatavošanās un izsēšanās laiks dažādiem sēkļu plantācijas kloniem ir atšķirīgs. Tomēr atšķirības mikrosporoģenēzes procesu fenoloģijā parādās arī starp viena klona kokiem, kaut gan tās nav tik krasi izteiktas. Tas nozīmē, ka ziedputekšņu veidošanās atkarīga ne tikai no koka iedzimtajām īpašībām, bet var būt saistīta ar augšanas apstākļiem un barošanās režīmu. Arī dažādu klonu sievišķās ziedēšanas fenoloģiskās fāzes nesakrīt. Klonu ar agru un vēlū ziedēšanu plantācijās parasti ir nedaudz, un to apjoms ir līdzīgs. Piemēram, Smiltenes sēkļu plantācijā (Aaypa, 1978) agri, vidēji un vēlū ziedošu klonu īpatsvars konstatēts attiecīgi 28%, 45% un 27%. Autore atzīmē, ka fenoloģisko grupu (agrs, vidējs, vēlū) izdalīšanu apgrūtina tas, ka pazīme – klona ziedēšanas sākums – ir nepārtraukti variējoša. Ilglaicīgie novērojumi rāda, ka klonu ziedēšanas īpatnības dažādos gados saglabājas, kas liecina par šīs pazīmes ģenētisko nosacītību. Galvenais ziedēšanas procesu ietekmējošais faktors ir temperatūra. Latvijā priedes ziedēšana sākas, aktīvo temperatūru (virs +5°C) summai pārsniedzot 180°C. Sievišķo strobilu gatavība iestājas pie zemākas aktīvo temperatūru summas nekā vīrišķajiem strobiliem. Turklāt vīrišķo strobilu putēšana

ir atkarīga arī no relatīvā gaisa mitruma. Pat tad, kad ziedputekšņi jau ir pilnīgi nobrieduši, vīrišķie strobili neatveras, kamēr relatīvais gaisa mitrums nav zemāks par 50% (Sarvas, 1962). Starpība starp agro un vēlū klonu ziedēšanu var būt pat līdz 14 dienām (Aaypa, 1978). Vienas un tās pašas fenoloģiskās fāzes garums variē gan pa veģetācijas sezonām, gan starp kloniem. Dažādi kloni atšķirīgi reaģē uz temperatūras paaugstināšanos, turklāt klonu ziedēšanas īpatnības spilgtāk izpaužas pavasaros, kad temperatūras paaugstināšanās notiek lēnāk. Agri un vēlū ziedošiem kloniem ir salīdzinoši augsta pašapputes iespēja, un tādēļ tiem ir zemāks pilno sēkļu iznākums.

Pētījumu rezultāti par priedes sievišķās un vīrišķās ziedēšanas intensitātes ģenētisko nosacītību nav viennozīmīgi. Kroon et al. (2007) konstatējuši ciešu korelāciju ($r=0,8$) starp plantācijas klonu čiekuru ražošanas intensitāti dažādos gados (no 15 līdz 30 gadu vecumam). Arī Savolainen et al. (1993) pētījumā konstatēta cieša korelācija starp strobilu daudzumu dažādos gados gan sievišķajiem, gan vīrišķajiem strobiliem. Citā eksperimentā (Biril, 2006b) autori noskaidrojuši, ka sievišķās un vīrišķās ziedēšanas intensitātes variācija klonu iekšienē vairāk nekā divas reizes pārsniedz šo pazīmi variāciju starp kloniem. Nav konstatēta sakarība starp pluskoku čiekuru daudzumu un attiecīgo klonu sievišķās ziedēšanas intensitāti (Lindgren et al., 2007). A. Dreimanis (1973) norādījis, ka atsevišķu klonu starpā vienādā vecumā vērojamas lielas čiekuru ražošanas atšķirības. Piemēram, Smiltenes plantācijā 6 kloni katru gadu (četrus gadu laikā) saražojuši 48-64% no visiem sēkļu plantācijas čiekuriem, bet pārējie 22 kloni – apmēram tikai tādu

pašu čiekuru daudzumu. Arī E. Ronis (1975) atzīmējis, ka atsevišķi kloni stipri atšķiras pēc sievišķo un vīrišķo strobilu daudzuma, un šis īpatnības saglabājas katru gadu. Biril et al. (2006a) konstatējuši ciešu korelāciju ($r=0,80$) starp sievišķās un vīrišķās ziedēšanas intensitāti.

Priedes ziedēšanas laika īpatnību molekulāri ģenētiskajai izpētei, ņemot vērā, ka ziedēšanas laika atšķirības var būt ietekmētas arī ģenētiski, noteiktās ziedēšanas laika grupas analizētas ar DNS marķieriem. Ikvienā fenotipa-genotipa asociācijas pētījumā vispirms noskaidrojams, vai fenotipiskās atšķirības saistītas ar populāciju izcelsmi vai tās struktūru, jo citādi adaptīvās selekcijas sekas genomā var sajaukt ar populācijas izcelsmi (Neale, Savolainen, 2004).

Latvijas teritorijā ilgā laika periodā veikta meža mākslīgā atjaunošana, un stādmateriāls ticis ievests arī no citām valstīm, ļoti bieži bez attiecīgas dokumentācijas. Tādēļ, uzsākot priežu ziedēšanas laika molekulāri ģenētisko izpēti, lai noskaidrotu iespējamo populācijas struktūru vai diferenciāciju starp ziedēšanas laika grupām, analīzei izmantoti hloroplasta DNS marķieri.

Hloroplasti skuju kokos tiek pārmantoti caur putekšņiem (Mogensen, 1996). Hloroplastu DNS marķieri ir „neitrāli”, jo uzrāda DNS fragmentus, kas neietekmē auga fenotipu. Hloroplasti nav pakļauti genomiskās rekombinācijas procesiem, un to ģenētiskā daudzveidība veidojas tikai mutācijas procesu gaitā. Tā kā šie marķieri uzrāda lielāku populācijas struktūru vai diferenciāciju nekā kodola genoma marķieri, tos plaši izmanto populāciju struktūras un diferenciācijas izpētei (Bruford, Wayne, 1993; Scotti et al., 2006).

Gadījumā, ja fenotipiskās atšķirības saistītas ar populācijas struktūru vai diferenciāciju, tad „neitrālie” marķieri šo diferenciāciju arī uzrādīs. Ja populācijas struktūra ar minētajiem marķieriem netiek atklāta, tad, iespējams, ziedēšanas laiku ietekmējusi tikai adaptīvā selekcija, un tās molekulāri ģenētiskais pamats meklējams specifisku gēnu alēļu atšķirībās.

Šajā pētījumā priedes ziedēšanas īpatnības izziņātas, veicot gan fenoloģiskos novērojumus, gan molekulāri ģenētisko izpēti ar hloroplastu DNS marķieriem.

Materiāls un metodes

Fenoloģiskie novērojumi

Dažādas izcelsmes priežu pēcnācēju ziedēšanas fenoloģiskās atšķirības pētītas, 2008.gada pavasarī veicot atkārtotus novērojumus divās priežu sēklu plantācijās dažādos Latvijas reģionos – Dravu sēklu plantācijā Latvijas rietumdaļā un Sāvienas sēklu plantācijā Latvijas austrumdaļā. Katrā novērojumu reizē reģistrēta sievišķo un vīrišķo strobilu fenoloģiskā fāze, kā arī vīrišķo strobilu relatīvais daudzums kokā. Sievišķo strobilu ziedēšanas dinamikas novērošanai izvēlētas un marķētas sievišķo strobilu grupas koka vidusdaļā, dienvidu pusē. Sievišķo strobilu fenoloģiskā fāze noteikta šādi (Laura, 1975):

0. fāze – „ziemas miers”; sievišķo strobilu aizmetņus un augšanas konusu blīvi nosedz pumpurzviņas;

1. fāze – „atsegto pumpuru fāze”; sievišķo strobilu un augšanas konusu nesedz pumpurzviņas, sievišķais strobils redzams blakus augšanas konusam, ir cieši tam pieguļošs vai arī ir atvirzījies, pārklāts ar segzviņām, konusveidīgs;

2. fāze – „nobriešanas fāze”; sievišķais strobils

atvirzījies no augšanas konusa, stāv paralēli tam, strobila virsotne noapaļojas un pakāpeniski atbrīvojas no segzvīņām;

3. fāze – „atvērto strobilu (ziedēšanas) fāze” – sievišķais strobils atbrīvojies no segzvīņām, spraugas starp sēklzvīņām pilnīgi atvērušās;

4. fāze – „slēgto strobilu fāze”; sēklzvīņas piebriest, spraugas starp sēklzvīņām aizveras, strobils maina ziedēšanas pozīciju – noliecas paralēli zemei vai pilnīgi uz leju.

Vīrišķo strobilu attīstības fāze noteikta šādi:

1. fāze – vīrišķos strobilus pilnībā nosedz segzvīņas;

2. fāze – vīrišķos strobilus segzvīņas nosedz daļēji;

3. fāze – vīrišķie strobili pilnībā atbrīvojušies no segzvīņām;

4. fāze – sākusies vīrišķo strobilu putēšana;

5. fāze – vīrišķo strobilu putēšanas kulminācija;

6. fāze - vīrišķo strobilu putēšana izbeigusies.

Vīrišķo strobilu relatīvais daudzums noteikts šādi:

1 – maz vīrišķo strobilu salīdzinājumā ar citiem plantācijas kokiem;

2 – vidēji daudz vīrišķo strobilu;

3 – daudz vīrišķo strobilu.

Sāvienas sēklu plantācijā pārstāvēti 86 Smiltenes (S) un 76 Mīsas populācijas kloni (M), bet Dravu sēklu plantācijā – 65 Mīsas populācijas kloni (M), kas abās plantācijās pārsvarā ir vairākos atkārtojumos. Novērojumi veikti 6 reizes laikā no 12. maija līdz 3. jūnijam.

Katrā novērojumu reizē, nosakot izmēģinājumā klona sievišķās ziedēšanas vidējo fāzi, aprēķināta visu atkārtojumu koku

vidējā fāzes vērtība, pēc tam katrā novērojumā atsevišķi klonu iekļaujot kādā no piecām grupām:

1 – izteikti vēlu ziedošs;

2 – vēlu ziedošs;

3 – vidēji ziedošs;

4 – agri ziedošs;

5 – izteikti agri ziedošs.

Nosacījumi klonu klasifikācijai grupās katrā sēklu plantācijā ir atšķirīgi, jo Latvijas rietumdaļā izvietotajā Dravu sēklu plantācijā priedes ziedēšana sākusies par 3-4 dienām agrāk nekā Sāvienas sēklu plantācijā, savukārt Sāvienas plantācijā Smiltenes klonu ziedēšana kopumā sākusies agrāk nekā Mīsas klonu ziedēšana. Klona galīgais vērtējums plantācijā izdarīts, aprēķinot vidējo vērtību no klonam atsevišķos novērojumos piešķirtajām grupu vērtībām, par izšķirošo uzskatot 3. fāzes iestāšanās brīdi.

Pēc vīrišķās ziedēšanas dinamikas kloni klasificēti trijās grupās:

1 – vēlu ziedošs;

2 – vidēji ziedošs;

3 – agri ziedošs.

Grupās „vēlu ziedošs” un „agri ziedošs” ieskaitīti kloni, kam vīrišķo strobilu putēšana (4. fāze) sākusies vēlāk vai agrāk nekā vairumam attiecīgās populācijas klonu plantācijā.

Mīsas klonu sievišķās ziedēšanas īpatnību salīdzināšanai divos ekoloģiskajos fonos lietota Vilkoksona metode. Izmantojot Mann-Whitney U-testu un 24. maijā veiktā ceturrtā novērojuma datus, salīdzinātas divu populāciju – Mīsas un Smiltenes – klonu sievišķās ziedēšanas īpatnības Sāvienas sēklu plantācijā. DNS analizē noskaidrots, vai pastāv ģenētiska diferenciacija starp dažādām ziedēšanas grupām.

DNS izdalīšana no priedes skujām

Atsevišķu priežu koku skujas (apm. 200 mg) sasaldē -70°C temperatūrā, un no tām izdala DNS ar „Fermentas” genomisko DNS izdalīšanas kitu. Paraugam pievieno 400 µl lizējošā šķiduma no DNS izdalīšanas komplekta „Fermentas”. Inkubē vienu stundu 65°C temperatūrā. Pievieno 350 µl atdzesēta 5M nātrija acetāta šķiduma, samaisa un inkubē ledus vannā 0°C temperatūrā vienu stundu. Centrifugē 20 min. ar 13000 apgr./min. Atdala supernantu, sajauc ar 650 µl hloroforma un centrifugē 20 min. ar 13000 apgr./min. Atdala supernantu un pie tā, DNS izgulsnēšanai, pievieno 500 µl izopropilspirta. Iztur 20°C temperatūrā 12 stundas. Centrifugē 15 min. ar 1500 apgr./min, nolej supernantu, un iegūtās DNS nogulsnes mazgā ar 1 ml 70% metanola. Centrifugējot atdala etanola slāni, iegūto DNS preparātu izžāvē istabas temperatūrā un izšķīdina 50 µl TE bufera. DNS kvantitāte un kvalitāte pārbaudīta gan ar spektrofotometru,

gan agarozes gēlos elektroforēzē.

Genotipēšana

Priežu paraugu genotipēšanai izmantoti šādi mikrosatelītu praimeru pāri: (1. tabula). Praimeris Pt71936, Pt26081 un Pt63718 atrodami Vendramin et al., (1996); praimeris CP30277 un PCP71987 – Provan et al., (1999).

Genotipēšanas polimerāzes ķēdes reakcijas (PĶR) apstākļi

Izmantots šāds PĶR reakcijas režīms: 95°C 5 min, 38 cikli 95°C 30 sek, 55°C 30 sek, 72°C 30 sek, 72°C 10 min.

PĶR reakcijas maisījums: kopējais tilpums 20 µl, kas satur 50 ng izejas DNS, 1xPCR bufersšķiduma, 2mM MgCl₂, 0,2mM dNTP mix, 0,5U Taq polymerase (“Fermentas”), 0,2 µl tiešā un reversā praimera.

Fragmentu analīze

Apvieno pa 1 µl katru PCR amplificēto fragmentu ar atšķirīgām krāsvielu iezīmēm (6-FAM, HEX, NED),

1. tabula, Table 1

pievieno 0,7 µl GeneScan TM-350 ROX Size Standard un 8 µl Hi-Di TM formamīda. Denaturē termociklera aparātā 95°C temperatūrā 5 minūtes.

Strauji atdzesē līdz 0°C.

Genotipē ar Applied Biosystems ģenētisko analizatoru 3130XL.

Ģenētiskā analīze

Veikta ar GenAlEx v6.1 programmu (Peakall, Smouse, 2006).

Hloroplastu praimeru sekvences

Chloroplast primer sequences

Praimeris Primer	Sekvence Sequence
Pt71936 _F	5'-[FAM]- TTC ATT GGA AAT ACA CTA GCC C
Pt71936 _R	5'- AAA ACC GTA CAT GAG ATT CCC
Pt26081 _F	5'- [HEX]- CCC GTA TCC AGA TAT ACT TCC A
Pt26081 _R	5'- TGG TTT GAT TCA TTC GTT CAT
Pt63718 _F	5'- [NED]- CAC AAA AGG ATT TTT TTT CAG TG
Pt63718 _R	5'- CGA CGT GAG TAA GAA TGG TTG
PCP30277 _F	5'- [NED]- TGT TGA TGT CGT AGC GGA AG
PCP30277 _R	5'- AGT AAA TGA ATC ACT TCC CCC
PCP45071 _F	5'- [FAM]- ACT GGT CTG ATC GAC CCA AT
PCP45071 _R	5'- TTC TAC ACT TGC GGA AAC CC
PCP71987 _F	5'- [HEX]- TCT TTG CAA GAA GGA TGG CT
PCP71987 _R	5'- GGG GAG TAA TCC GTG GAA TT

Rezultāti un diskusija

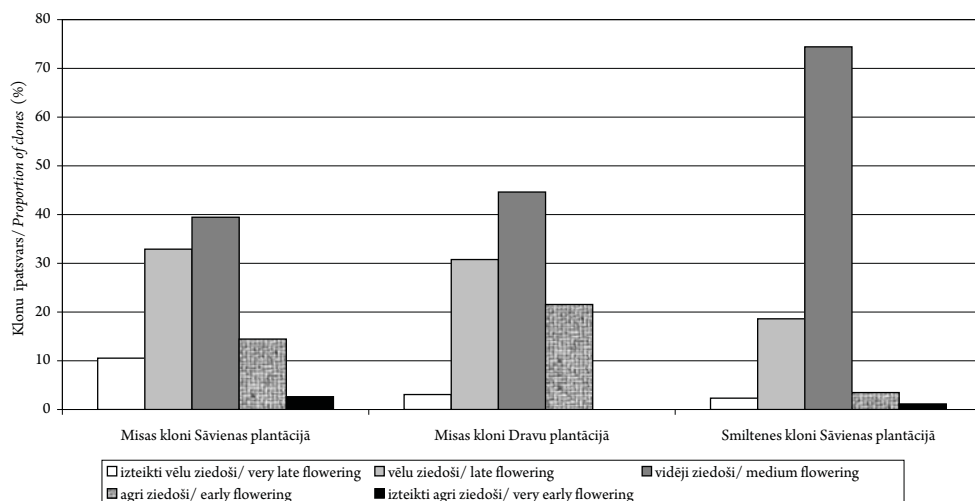
Sievišķo un vīrišķo strobilu ziedēšanas dinamikas novērojumi liecina, ka pastāv nozīmīgas fenoloģiskas atšķirības gan dažādu populāciju, gan vienas populācijas atsevišķu koku starpā. Aptuveni puse klonu pieskaitāmi grupai „vidēji ziedošs”, līdzīgi kā agrākajos pētījumos (Λαγπα, 1978). No Smiltenes kloniem par „vidēji ziedošiem” sievišķās ziedēšanas ziņā atzīti 74% klonu. Par „vēlu ziedošiem” uzskatāmi 19% klonu, bet divi kloni ir „izteikti vēlu ziedoši” (S133, S21). Konstatēti trīs „agri ziedoši” kloni (S102, S5, S15) un viens „izteikti agri ziedošs” (S11). No Misas kloniem Sāvienas plantācijā par „vidēji ziedošiem” uzskatāmi 39%, bet Dravu plantācijā – 45% klonu (1. att.).

Misas klonu sievišķās un vīrišķās ziedēšanas dinamikas novērojumu kopsavilkums dots 2. tabulā.

Abos objektos vairāki Misas kloni uzrādījuši vienādu vai līdzīgu sievišķās

ziedēšanas grupu, līdz ar to šo klonu piederība grupai šaubas nerada. Galīgajā vērtējumā izceļas divi kloni, kas atzīti par „izteikti vēlu ziedošiem” (M240, M254), un divi kloni, kas atzīti par „agri ziedošiem” (M170, M251). Konstatēti vairāki kloni, kas Sāvienas plantācijā ir relatīvi agrāk ziedoši nekā Dravu plantācijā, un kloni, kas Dravu plantācijā ir relatīvi agrāk ziedoši nekā Sāvienas plantācijā. Jāatzīmē, ka klonu sadalījums grupās atkarībā no sievišķo strobilu ziedēšanas dinamikas pazīmes nepārtrauktās mainības dēļ ir nosacīts, un vairāki kloni ieņem starpstāvokli starp vidēji/agras un vidēji/vēlas ziedēšanas nosacītajām iedalījuma grupām, kā norādīts arī agrāk veiktajos pētījumos (Λαγπα, 1978). Tādēļ nelielas novirzes grupu piederībā abos objektos būtu uzskatāmas par pieļaujamām. Savukārt, lai noskaidrotu cēloņus klonu ziedēšanas atšķirībām par divām vai pat trim grupām, izdarāmi papildus pētījumi.

Misas klonu sievišķās ziedēšanas



1. attēls. Klonu sadalījums sievišķās ziedēšanas fenoloģiskajās grupās.

Figure 1. Division of clones in groups of female flowering.

2. tabula, Table 2

Misas populācijas klonu ziedēšanas laika grupas
Flowering time groups of Misa population clones

Klons Clone	Ziedēšanas laika grupa Flowering time group				Klons Clone	Ziedēšanas laika grupa Flowering time group			
	sievišķā ziedēšana female flowering		vīrišķā ziedēšana male flowering			sievišķā ziedēšana female flowering		vīrišķā ziedēšana male flowering	
	Sāvienta	Dravas	Sāvienta	Dravas		Sāvienta	Dravas	Sāvienta	Dravas
44	2	2	2	2	230	nav	4	nav	3
52	2	3	2	2	231	3	4	3	3
55	2	nav	2	nav	232	3	3	3	3
62	2	2	3	2	233	3	nav	2	nav
63	3	2	2	2	234	nav	3	nav	3
106	4	3	3	2	235	3	3	3	3
108	nav	3	nav	3	236	1	nav	3	nav
110	3	nav	3	nav	237	3	nav	3	nav
123	4	2	3	3	238	2	2	3	3
126	2	3	2	3	239	2	3	2	2
131	3	3	2	3	240	2	1	2	2
146	3	3	2	2	241	3	nav	3	nav
158	3	2	2	2	242	1	4	2	2
162	3	3	3	3	243	3	nav	3	nav
163	5	3	3	2	244	3	nav	2	nav
165	nav	3	nav	2	245	2	3	2	2
166	3	4	3	3	246	2	nav	2	nav
168	3	3	2	2	247	5	3	3	2
169	3	2	2	2	248	4	3	2	2
170	4	4	3	3	249	4	3	2	3
175	3	4	3	3	250	1	4	2	2
176	2	4	2	3	251	4	4	2	2
177	3	nav	3	nav	252	3	3	2	2
178	3	4	3	3	253	2	3	3	2
185	3	3	3	2	254	1x	2	nav	2
186	3	nav	3	nav	255	nav	3	nav	3
189	4	3	2	3	256	3	3	3	2
192	2	2	1	1	257	2	2	2	2
196	4	2	3	2	258	2	nav	2x	nav
198	2	2	2	2	259	3	1	2	2
202	1	nav	2	nav	260	2	2	2	2
210	4	3	3	2	261	3	nav	3	nav
220	2	5	2	3	262	3	2	2	2

2. tabula (turpinājums), Table 2 (continued)

Klons <i>Clone</i>	Ziedēšanas laika grupa <i>Flowering time group</i>				Klons <i>Clone</i>	Ziedēšanas laika grupa <i>Flowering time group</i>			
	sievišķā ziedēšana <i>female flowering</i>		vīrišķā ziedēšana <i>male flowering</i>			sievišķā ziedēšana <i>female flowering</i>		vīrišķā ziedēšana <i>male flowering</i>	
	Sāviens	Dravas	Sāviens	Dravas		Sāviens	Dravas	Sāviens	Dravas
221	3	nav	2	nav	263	4	2	2	3
222	3	4	2	2	264	2	3	3	3
223	2	4	3	3	346/8	2	3	2	3
224	1	3	3	3	347/11	3	nav	2	nav
225	2	2	2	2	348/18	1	nav	2	nav
226	2	2	2	nav	349/13	nav	2	nav	3
227	2	4	3	2	359/14	1	2	2	2
228	2	3	2	3	486	nav	2	nav	2
229	4	nav	2	nav					

īpatnību salīdzināšanai divos ekoloģiskajos fonos izmantota Vilkoksona metode. Testa rezultāti apstiprinājuši pieņēmumu, ka nav būtisku (pie būtiskuma līmeņa $\alpha=0,01$) atšķirību starp klonu sievišķās ziedēšanas grupu Sāvienas un Dravu plantācijā (p-vērt. $0,386>0,01$).

Izmantojot Mann-Whitney U-testu un 24. maijā veiktā ceturktā novērojuma datus, salīdzinātas divu populāciju – Misas un Smiltenes – klonu sievišķās ziedēšanas īpatnības Sāvienas sēklu plantācijā. Konstatētas būtiskas atšķirības starp abām populācijām (p-vērt. $0,00<0,01$), un secināts, ka kopumā Smiltenes populācijas kloni sievišķās ziedēšanas ziņā ir būtiski agrāk ziedoši nekā Misas populācijas kloni.

Maija beigās abos objektos, īpaši Dravu plantācijā, konstatēti ievērojami sala bojājumi, no kā visvairāk cietuši Dravu plantācijas pirmajā atkārtojumā augošo koku sievišķie strobili un vismazāk – otrā atkārtojuma dienviņu stūra koku strobili, kas skaidrojams ar lokālajām vides īpatnībām – galvenokārt mikrolielu. Piemēram, M242 klons otrajā

atkārtojumā iestādīts divās vietās, kur labvēlīgajos apstākļos sievišķie strobili nav apsaluši, bet nelabvēlīgajos – stipri apsaluši. Tomēr konstatēti atsevišķi kloni, kas abos atkārtojumos bijuši noturīgi pret sala bojājumiem – klons M163 („vidēja” sievišķā ziedēšana) un it īpaši – klons M240 („izteikti vēla” sievišķā ziedēšana). Fiksēti arī kloni, kas abos atkārtojumos izcēlušies ar paaugstinātu jutību pret sala bojājumiem – kloni M168, M235, M249, M252 (visiem „vidēja” sievišķā ziedēšana). Pieņēmums, ka salnu laikā vēlāk ziedošie kloni vēl nebija sasnējuši 3. fāzi, tādēļ cietuši mazāk, apstiprinājies tikai daļēji. Jāatzīmē, ka rezultātu novērtēšanu apgrūtināja tas, ka Dravu plantācijā 2008. gada maijā salnas novērotas vairākkārtīgi, tātad kokus skārušas dažādās sievišķo strobilu attīstības fāzēs.

Vīrišķās ziedēšanas ziņā Sāvienas plantācijā „vidēji ziedošo” Smiltenes klonu ir 56%, „agri ziedošo” – 43%, konstatēts arī viens „vēlu ziedošo” klons – S13 ; savukārt „vidēji ziedošo” Misas klonu Sāvienas plantācijā ir 57%, „agri ziedošo” – 41%. Dravu plantācijā

„vidēji ziedošo” un „agri ziedošo” Misas klonu īpatsvars ir līdzīgs kā Sāvienas plantācijā (attieciņi 56% un 42%). Īpaši atzīmējami ir divi kloni (M166, M224), kas uzrāda sevišķi agru ziedēšanu abos objektos, un viens kloni (M192), kas abos objektos zied izteikti vēlu. Tāpat kā sievišķo strobilu ziedēšanas dinamikas pētījumos, arī vīrišķās ziedēšanas novērojumos konstatēti kloni, kas Sāvienas plantācijā ir relatīvi agrāk ziedoši nekā Dravu plantācijā, un otrādi.

Vairumam koku vīrišķo strobilu relatīvais daudzums novērtēts ar „2” (vidēji daudz vīrišķo strobilu) vai „3” (daudz vīrišķo strobilu). Konstatēti tikai daži kloni, kam vērojama mazāka vīrišķo strobilu daudzuma tendence, piemēram, Sāvienas plantācijā tādi ir M263, M346/18, M246, S108, S132. Kloniem, kuru vīrišķie strobili ir sārtā krāsā, bieži raksturīgs liels vīrišķo strobilu daudzums (piemēram, M253). Sakarība starp klona vīrišķo strobilu daudzumu un piederību sievišķās vai vīrišķās ziedēšanas dinamikas grupām netika konstatēta. Aptuveni 70% klonu, kam vismaz vienā atkārtojumā noteikts mazs vīrišķo strobilu daudzums, gan sievišķo, gan vīrišķo strobilu ziedēšanas grupa novērtēta kā vidēja, bet pārējo 30% klonu starpā ir gan agri, gan vēl ziedoši kloni.

Kopumā sievišķo un vīrišķo strobilu attīstības gaitas novērojumu rezultātā apstiprinājusies hipotēze, ka agri un vēl ziedošie kloni atšķirīgos augšanas apstākļos savas fenoloģiskās īpatnības saglabā, bet dažādu populāciju pēcnācēji – tās saglabā vienādos augšanas apstākļos. Tātad pamatoti uzskatīt, ka fenoloģiskās īpatnības ir ģenētiski nosacītas.

Veicot ģenētisko analīzi, Misas populācijas bloka klonu haplotipi tika sadalīti

grupās pēc to ziedēšanas dinamikas. Kloni pēc sievišķo strobilu ziedēšanas laika grupās iedalīti sekojoši: 1. grupā – 7 kloni, 2. grupā – 24, 3. grupā – 29, 4. grupā – 11 un 5. grupā – 2 kloni. Turpmākajā analīzē 5. grupas kloninētiku iekļauti. Kloni pēc vīrišķo strobilu ziedēšanas laika iedalīti trīs grupās: 1. grupā – 1, 2. grupā – 41 un 3. grupā – 31 kloni. No turpmākās analīzes izslēgta 1. grupa. Haplotipu alēļu frekvenču sadalījums pa ziedēšanas grupām vīrišķajiem strobiliem redzams 3. tabulā, sievišķajiem – 4. tabulā. Alēļu frekvences ir vienmērīgi sadalītas starp grupām, bet unikālas alēles ir tikai ar zemu frekvenci. Lielākās frekvenču atšķirības atrastas sievišķo strobilu ziedēšanas laika pirmajā grupā (zs1), ko varētu skaidrot ar analizētās grupas skaitliski mazo sastāvu (7 indivīdi).

Izmantojot AMOVA analīzi, iegūts ģenētiskās daudzveidības sadalījums starp ziedēšanas grupām un arī grupu iekšienē. Abu veidu strobiliem nav atrasta ģenētiskā diferenciācija starp ziedēšanas dinamikas grupām. Kā piemērs 2. attēlā parādīts vīrišķo strobilu ģenētiskās daudzveidības iedalījums, kur redzams, ka 100% ģenētiskā daudzveidība novērojama ziedēšanas grupas ietvaros, bet ģenētiskā atšķirība starp grupām ir 0%.

Iegūtie dati liecina, ka ar izmantotajiem hloroplasta DNS marķieriem nav noteikta populācijas struktūra vai diferenciācija starp ziedēšanas dinamikas grupām. Tātad ziedēšanas laika ģenētiskā nosacītība nav saistīta ar izcelsmes dažādību un ir atkarīga no atšķirībām specifiskajos gēnos un to alēļu kombinācijās. Turpmākajā darbā, uz analizētā materiāla bāzes, tiks pētīta šo īpašo ziedēšanu kodējošo gēnu ekspresija un to sekvenču polimorfisms.

3. tabula, Table 3

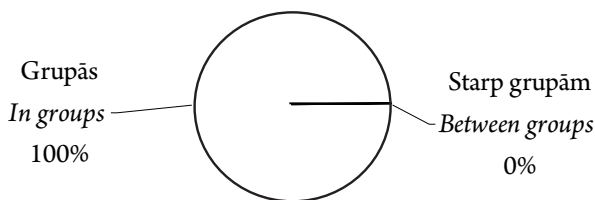
Virišķo strobilu ziedēšanas laika grupu alēļu frekvences
Allele frequencies of male flowering time groups

Lokuss Locus	Alēle Allele	Virišķo strobilu ziedēšanas laika grupas Male flowering time groups		Lokuss Locus	Alēle Allele	Virišķo strobilu ziedēšanas laika grupas Male flowering time groups	
		zv2	zv3			zv2	zv3
Pt71936	145	0,270	0,161	PCP30277	133	0,139	0,000
	146	0,378	0,548		134	0,139	0,345
	147	0,297	0,194		135	0,583	0,276
	148	0,054	0,097		136	0,083	0,241
Pt26081	106	0,081	0,138		137	0,056	0,138
	107	0,486	0,483	PCP71987	108	0,200	0,100
	108	0,378	0,379		109	0,400	0,600
	109	0,054	0,000		110	0,350	0,200
Pt63718	89	0,947	0,724		111	0,050	0,100
	90	0,053	0,276				

4. tabula, Table 4

Sievišķo strobilu ziedēšanas laika grupu alēļu frekvences
Allele frequencies of female flowering time groups

Lokuss Locus	Alēle Allele	Virišķo strobilu ziedēšanas laika grupas Male flowering time groups				Lokuss Locus	Alēle Allele	Virišķo strobilu ziedēšanas laika grupas Male flowering time groups			
		zs1	zs2	zs3	zs4			zs1	zs2	zs3	zs4
Pt71936	145	0,143	0,227	0,286	0,100	PCP30277	133	0,286	0,130	0,000	0,000
	146	0,429	0,545	0,357	0,600		134	0,000	0,217	0,308	0,333
	147	0,286	0,227	0,286	0,100		135	0,286	0,478	0,423	0,556
	148	0,143	0,000	0,071	0,200		136	0,143	0,130	0,192	0,111
Pt26081	106	0,167	0,174	0,074	0,000		137	0,286	0,043	0,077	0,000
	107	0,500	0,522	0,407	0,600	PCP71987	108	0,143	0,174	0,143	0,182
	108	0,333	0,304	0,444	0,400		109	0,429	0,522	0,464	0,545
	109	0,000	0,000	0,074	0,000		110	0,286	0,304	0,321	0,091
Pt63718	89	0,571	0,913	0,889	0,900		111	0,143	0,000	0,071	0,182
	90	0,429	0,087	0,111	0,100						



2. attēls. Ģenētiskās daudzveidības iedalījums vīrišķo strobilu ziedēšanas laika grupās.

Figure 2. Partitioning of genetic polymorphism within and between male flowering time groups.

Secinājumi

1. Dažādu parastās priedes populāciju klonu sievišķās un vīrišķās ziedēšanas fenoloģiskajos novērojumos konstatēts, ka pastāv nozīmīgas ziedēšanas fenoloģijas atšķirības gan dažādu populāciju, gan vienas populācijas atsevišķu koku starpā.
2. Aptuveni puse klonu pieskaitāmi grupai „vidēji ziedošs”. No Misas populācijas kloniem Sāvienas plantācijā par sievišķās ziedēšanas ziņā „vidēji ziedošiem” atzīti 39% klonu, no Misas populācijas kloniem Dravu plantācijā – 45%, no Smiltenes populācijas kloniem – 74% (vidēji 53% klonu). „Izteikti vēlu ziedošo”, „vēlu ziedošo”, „agri ziedošo” un „izteikti agri ziedošo” klonu vidējais īpatsvars ir attiecīgi 5%, 27%, 13% un 1%.
3. Vīrišķās ziedēšanas ziņā „vidēji ziedošo” klonu īpatsvars abām populācijām abos objektos ir līdzīgs – Smiltenes kloniem Sāvienas plantācijā 56%, Misas kloniem Sāvienas un Dravu plantācijā – attiecīgi 57% un 56%. Pārējie ir „agri ziedoši” kloni, izņemot vienu Misas un vienu Smiltenes populācijas klonu. Sakarība starp klona vīrišķo strobilu daudzumu un piederību sievišķās vai vīrišķās ziedēšanas fenoloģijas grupām netika novērota.
4. Novērtējot divu populāciju – Misas un Smiltenes – klonu sievišķo ziedēšanu Sāvienas sēklu plantācijā, konstatētas būtiskas atšķirības starp dažādu populāciju ziedēšanas fenoloģiskajām īpatnībām vienādos ekoloģiskajos apstākļos.
5. Salīdzinot Misas klonu sievišķās ziedēšanas grupas Sāvienas un Dravu plantācijā, konstatēts, ka populācijas kloni saglabā savas fenoloģiskās īpatnības dažādos ekoloģiskajos fonos, kas liecina par pazīmes ģenētisko nosacītību.
6. Ģenētiskās analīzes rezultāti rāda, ka ģenētiskā diferenciācija starp izdalītajām ziedēšanas fenoloģijas grupām nav konstatēta. Visa ģenētiskā daudzveidība ir ziedēšanas grupas ietvaros, nevis starp grupām, kaut arī sievišķo un vīrišķo strobilu attīstības novērojumi rāda, ka klonu fenoloģiskās īpatnības ir ģenētiski nosacītas. Ziedēšanas laika atšķirības nenosaka izcelsmes atšķirības, kas liecina, ka ziedēšanas laiku ietekmējusi adaptīvā selekcija.

Literatūra

- Bilir, N., Kang, K-S., Lindgren, D. (2006a). Fertility variation and gene diversity in a clonal seed orchard of *Pinus sylvestris*. Proceedings of the IUFRO Division 2 Joint Conference: Low Input Breeding and Conservation of Forest Genetic Resources: Antalya, Turkey, 9-13 October 2006. Ed. by Fikret Isik. 21-27.
- Bilir, N., Prescher, F., Ayan, S., Lindgren, D. (2006b). Growth characters and number of strobili in clonal seed orchards of *Pinus sylvestris*. *Euphytica* 152, 293-301.
- Bruford, M.W., Wayne, R.K. (1993). Microsatellites and their application to population genetic studies. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3, 939-943.
- Dreimanis, A. (1973). Čiekuru ražas dažās priežu sēklu plantācijās. *Mežsaimniecība un Mežrūpniecība*, 3, 13.-16. lpp.
- Kroon, J., Prescher, F., Wennström, U., Lindgren, D. (2007). Cone set over time for different clones in a seed orchard. – Precher, F. Seed orchards – genetic considerations on function, management and seed procurement. Doctor's dissertation, Umeå, 75.
- Laura, M. (1973). Priedes ģeneratīvo orgānu morfoģenēze. *Jaunākais Mežsaimniecībā*, 15, 7.-13. lpp.
- Laura, M. (1973a). Priedes sēklas attīstības cikls. *Mežsaimniecība un Mežrūpniecība*, 2, 12.-14. lpp.
- Laura, M. (1975). Priedes sēklas attīstības cikls. Priedes klonu ziedēšanas fenoloģisko fāzu noteikšana. Meža koku sēklu plantāciju apsaimniekošana un klonu ģenētiskā vērtēšana. Apskats, Rīga, 25.-30. lpp.
- Lindgren, D., Tellalov, Y., Prescher, F. (2007). Seed set for Scots pine grafts is difficult to predict. Proceedings of the IUFRO Division 2 Joint Conference: Low Input Breeding and Conservation of Forest Genetic Resources: Antalya, Turkey, 9-13 October 2006. Ed. by Fikret Isik. 139-141.
- Mátyás, C. (1991). Seed orchards. - Giertych M. (eds) *Genetics of Scots pine. Developments in plant genetics and breeding*, 3, Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo, 125-145.
- Mogensen, H. L. (1996). The hows and whys of cytoplasmic inheritance in seed plants. *American Journal of Botany* 83(3), 383-404.
- Neale, D.B., Savolainen, O. (2004). Association genetics of complex traits in conifers. *Trends in Plant Science*, 9, 325-330.
- 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.
- Provan, J., Soranzo, N., Wilson, N.J., Goldstein, D.B., Powell, W. (1999). A low mutation rate for chloroplast microsatellites. *Genetics*, 153, 943-947.
- Ronis, E. (1975). Klonu reprodūktīvo spēju vērtēšana. Meža koku sēklu plantāciju apsaimniekošana un klonu ģenētiskā vērtēšana. Apskats, Rīga, 31.-33. lpp.

- Savolainen, O., Kärkkinen, K., Harju, A., Nikkanen, T., Rusanen, M. (1993). Fertility variation in *Pinus sylvestris*: a test of sexual allocation theory. *Am. J. Bot.* 80, 1016-1020.
- Sarvas, R. (1962). Investigations of the flowering and seed crop of *Pinus sylvestris*. *Comm. Inst.For.Fenn.*, 53.4, 198.
- Scotti, I., Paglia, G., Magni, F., Morgante, M. (2006). Population genetics of Norway spruce (*Picea abies* Karst.) at regional scale: sensitivity of different microsatellite motif classes in detecting differentiation. *Annals of Forest Science*, 63, 485-491.
- Vendramin, G.G., Lelli, L., Rossi, P., Morgante, M. (1996). A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. *Molecular Ecology*, 5, 595-598.
- Лаура, М. (1978). Цветение клонов сосны на семенных плантациях. Лесоселекционные исследования. Тезисы межреспубликанского совещания, Рига, с. 68-69.
- Пирагс, Д., Бауманис, И., Смилга, Я. (1990). Динамика развития селекционного семеноводства лесных древесных. Роль селекции в улучшении латвийских лесов, Зинатне, Рига, с. 3-11.