

Næste generation i forædlingsprogrammet for nordmannsgran



Figur 1. Kontrollerede krydsninger med pollenmiks ultimo april 2009. I alt blev der påsat over 150 af de hvide poser medio april 2009, og disse blev fyldt med pollenmiks to gange ultimo april 2009.

– lavet ved hjælp af pollenmiks-krydsninger

Af Ole K. Hansen¹⁾, Ulrik B. Nielsen¹⁾ og Martin Jensen²⁾

1) Institut for Geovidenskab og Naturforvaltning, Københavns Universitet

2) Institut for Fødevarer, Aarhus Universitet.

I artiklen beskrives fremstillingen af det første 2. generationsmateriale for nordmannsgran baseret på kontrollerede krydsninger. De bedste kloner, udvalgt på baggrund af feltforsøg, er krydset sammen, så der fremkommer fuldsøskende-familier. Her fra kan der udvælges de bedste juletræer, som på sigt kan blive næste generation i klonfrøplantagerne. På kort sigt kan vi

teste om, der er specifikke kombinationer (krydsninger) blandt klonerne i første generation, der giver særligt gode juletræer.

Som beskrevet i forrige artikel af forfatterne om forædlingsprogrammet for nordmannsgran, så kan fremtidens frøplantager tænkes at indeholde få kloner. For at få indblik i bestøvningsforhold i sådanne frøplantager med et lille antal kloner, samt mindske antallet af frøpartier, der skulle holdes styr på, er krydsningerne lavet ved hjælp af pollenmiks, hvori der indgår pollen fra flere potentielle fædre. Hvilken af de potentielle fædre, som var succesrig, er efterfølgende identificeret med DNA-markører. Viden om disse bestøvningsforhold kan anvendes

des i design af nye frøplantager, hvor gevinsten for juletræsdyrkerne er endnu større. Frøplantager med et lille antal kloner er interessante, fordi man så kan bruge de allerbedste plustræer – med højere udbytter til følge. Samtidig opnås en indsænkning af variationen, der også drifts- og udbyttmæssigt kan være en fordel. Forsøgene gav ydermere mulighed for at undersøge sammenhænge mellem frøvægt, spiringstid og vækst i planteskolen.

Krydsningsforsøg med pollenmik

Krydsningerne fremkom ved kontrollerede bestøvninger med pollenmik ultimo april 2009 i klonfrøplantagen FP.259 Silkeborg Nordskov (figur 1 og 2). Hunblomster var forinden isoleret medio april på 14 kloner udvalgt på baggrund af avlsværdier for juletræsegenskaber. Der blev lavet to forskellige krydsningsplaner – såkaldte dialleler – se figur 3. Her ses, hvordan hver mor (klonnumre ses i yderste kolonne) krydses med et pollenmik bestående af normalt fem fædre (pollendonorer – klonnumre i øverste række). I enkelte tilfælde var der dog kun fire potentielle fædre (for eksempel i diallel 1 hvor henholdsvis klon C55 og C72 optræder som mor) – dette skyldes, at der for enkelte kloner ikke var tilstrækkeligt med pollen. Når der var fem potentielle fædre i et pollenmik var der altid samme mængde pollen fra hver klon (20 % baseret på vægt). Når der kun var fire potentielle fædre, var der dobbelt så meget pollen fra én af klonerne (40 % mod 20 % fra de tre andre).

Et "x" i krydsningsplanen betyder, at der er tale om to forskellige kloner, der potentielt krydses (udkrydsning). Et "S" betyder, at det potentielt er den samme klon, der både optræder som mor og far (selvbestøvning).

Frøspiring og planteproduktion

Frø fra krydsningerne blev høstet september 2009. Frø fra hvert enkelt pollenmik-kryds blev holdt hver for sig, således at moren til frøene var kendt, mens der altså var fem (i enkelte tilfælde fire) potentielle fædre til frøene i hvert af de 14 frøpartier.

Februar 2010 blev frøene opfugtet i 24 timer og derefter sat i kuldebehandling.

Partierne blev løbende tjekket for spiring og frø med synlige kimerødder på over 2 mm længde blev sorteret ud fra hver kul-



Figur 2. En såkaldt pollensprøjte der ved hjælp af lufttryk (fra den røde ballon) puster pollen fra pollenglasset ind i poserne hvor hunblomsterne er isoleret.

Figur 3. Skitse der viser den krydsningsplan, der blev brugt til at lave bestøvninger med pollenmik. Ud for hver mor (klonnumre i yderste venstre kolonne i hver af de to dialleler) er der fem (i enkelte tilfælde fire) enten krydser ("x") eller et "S". Disse markerede fædre (klonnumre i øverste række i hver diallel) udgør pollenmikset. I alt er der altså lavet 14 pollenmik-kryds med 14 forskellige pollenmiks. Tegnet * betyder, at det pågældende pollenmik-kryds kun havde fire potentielle fædre.

Diallel 1

		Far							
		C13	C39	C46	C55	C60	C72	C76	Pollenmik-kryds
Mor	C13	S	x	x	x	x			NGR_C13
	C39		S	x	x	x	x		NGR_C39
	C46			S	x	x	x	x	NGR_C46
	C55	x			S	x		x	NGR_C55*
	C60	x	x			S	x	x	NGR_C60
	C72	x	x				S	x	NGR_C72*
	C76	x	x	x	x			S	NGR_C76

Diallel 2

		Far							
		C11	C21	C31	C42	C47	C52	C54	Pollenmik-kryds
Mor	C11	S	x	x	x	x			NGR_C11
	C21		S	x	x	x	x		NGR_C21
	C31			S	x	x	x	x	NGR_C31
	C42	x			S	x	x	x	NGR_C42
	C47	x				S	x	x	NGR_C47*
	C52	x		x			S	x	NGR_C52*
	C54	x	x	x	x			S	NGR_C54

debehandlingskasse. Hvert enkelt frø blev vejlet, dateret og tildelt et forsøgsløbenummer.

Spiremetoden gav mulighed for at se på sammenhænge mellem genetikken (krydsninger) og frøstørrelse (friskvægt ved spiring) samt dybden af frøets hvile (tiden fra 18. februar til spiring i dage) og i forhold til efterfølgende tilvækst.

Umiddelbart efter udtagningen fra spirekasser og målingen af frøets friskvægt blev de nyspirede frø priklet i Jiffy 7 skovbriketter.

I sommeren 2010 blev planterne dyrket i væksthuse ved lang daglængde, 20 timer/dag, og temperatur på minimum 20 °C for at sikre så stor plantetilvækst, som muligt. Daglængden blev reduceret til normal længde for sæsonen sidst i august og alle planter blev i september flyttet ud på friland på sandbed for at sikre effektiv kuldebehandling af knopper vinteren over og dermed normal knopbrydning og sæsontilpasning. I maj 2011 blev planterne flyttet ind i væksthuse igen for videre vækst under samme betingelser som i 2010.

Målinger på planter

I de to første vækstsæsoner blev der målt en række egenskaber:

- Udspring forår 2011.
- Diameter foråret 2011.
- Diameter efterår 2011.
- Højder: Kimstængelshøjde.
 - Højde efter første vækstsæson.
 - Højde sommer anden sæson.
 - Højde efterår anden sæson.



Identifikation af fædre med DNA-markører

I juni 2011, efter at planterne havde skudt i deres 2. vækstsæson, blev der indsamlet nåleprøver fra 104 planter fra hvert frøparti (figur 4). DNA blev ekstraheret fra nåleprøverne og der blev lavet en DNA-profil med DNA-markører. Der blev ligeledes lavet en DNA-profil for de potentielle fædre samt modertræerne til frøpartierne. Herved kunne det konstateres, hvilken af de fem (eller fire) potentielle fædre i hvert pollenmiks, der rent faktisk var far til hver enkelt af de i alt 1438 planter (717 i diallel 1; 721 i diallel 2). Derved blev der skabt en række fuldsøskende-familier (familier hvor individerne har samme mor og far).

Resultater

Identifikation af fædre med DNA-markører

Af figur 6 fremgår bestøvningssuccesen i diallel 2. Det ses at der er stabilt dårlige bestøvere såsom klon C52 og, i mindre grad, C54 – disse kloner får altid færre afkom end forventet ud fra deres andel af pollen. Omvendt er klonerne C11 og C47 meget succesrige bestøvere – dog ikke som selvbestøvere. Eneste klon som synes at vekselvirke lidt, dvs. have varierende bestøvningssucces afhængig af hvilken klon der optræder som mor, er klon C42. Klon C42 er generelt intermediær, men den mest succesrige bestøver, når klon C31 optræder som mor.

I alle tilfælde er bestøvningssuccesen mindre end forventet, når klonen optræder både som far og mor (selvbestøvning). Gennemsnitligt var selvbestøvningssuccesen 11,6 % i diallel 1 og 7,2 % i diallel 2.

Ved at sammenligne forholdet mellem klonernes bestøvningssucces når de udkrydses med den succes, de har, når de også optræder som mor (selvbestøver), kan man få en ide om hvor meget selektion, der er imod selvbestøvning. I diallel 1 varierede forholdet fra 0,07 (klon C76) til 0,92 (klon C39) – hvor C76 altså har det meget dårligt med selvbestøvning, mens C39 synes at være næsten lige så god til selvbestøv-



Figur 5. Nærbillede af planterne i væksthuset juni 2011.

ning som til udkrydsning. Det gennemsnitlige forhold var 0,36 i diallel 1. I diallel 2 var variationsspændet mindre – gående fra 0,13 (klon C42) til 0,53 (C31) – med et gennemsnitligt forhold på 0,29.

Korrelation mellem egenskaber

Vurderes sammenhænge mellem frøvægt og de øvrige målte egenskaber – vurderet på basis af alle de målte 1438 planter, og hvor der er taget højde for den genetiske komponent af moderen, ses at:

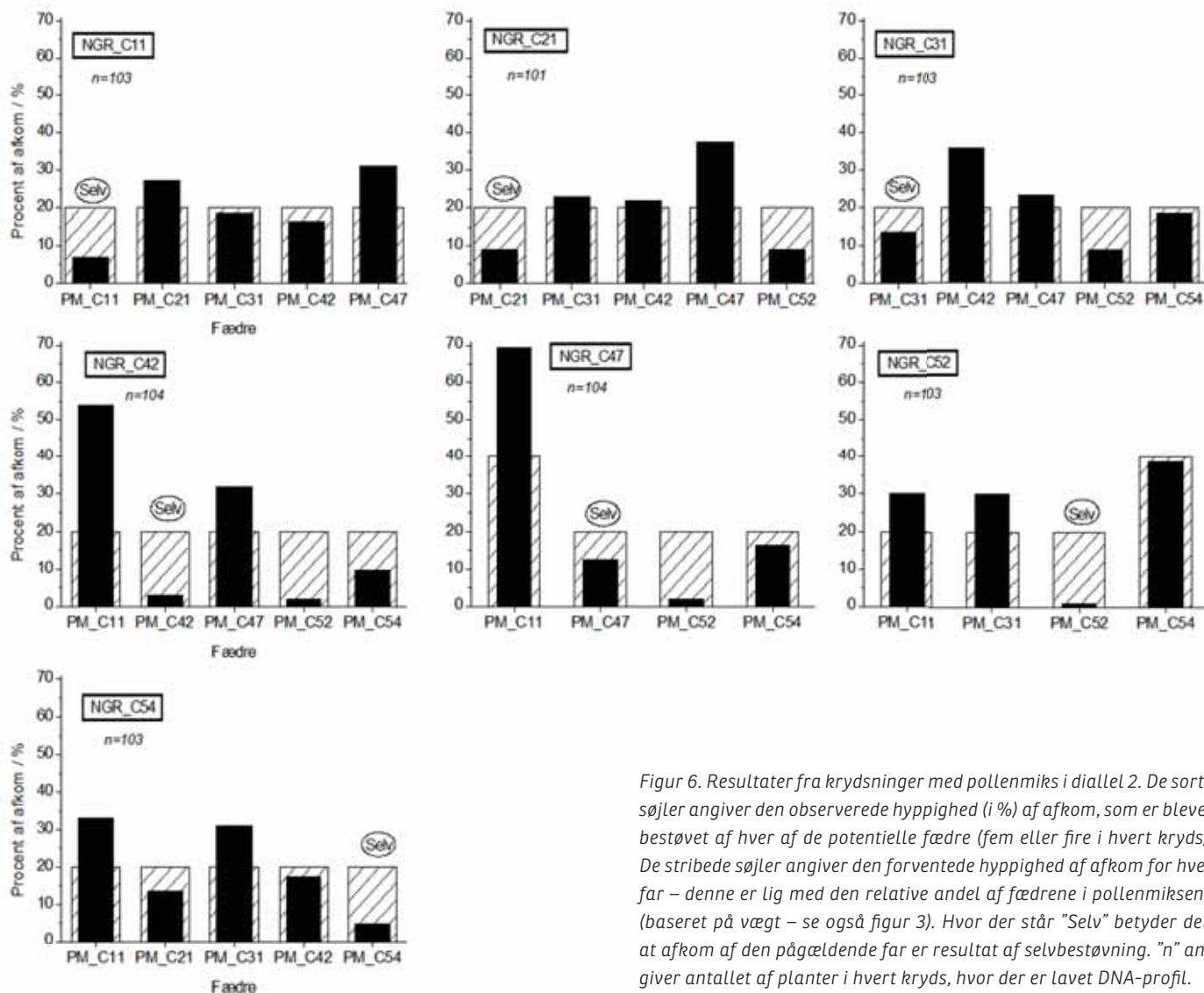
- De tungeste frø har tendens til at give planter med den største kimstængelhøjde, og større højde efter to år.
- Der er ingen sammenhæng mellem frøvægt og henholdsvis spiretid for frøet og senere udspring af planten.
- De senest spirede frø giver planter med den mindste højde – hvilket kan skyldes at de sent spirede får en forholdsvis kortere vækstsæson.

Effekt af selvbestøvning på vækst i planteskolen

Selvbestøvning har ofte en negativ indflydelse på vitalitet og vækst. Betydningen af selvbestøvning kan vurderes ved at sammenligne de udkrydsede individer i serien med de selvbestøvede. Dette er gjort i tabel 1. Ud af de 1438 individer, der er valgt til opgørelsen, er der 127 selvbestøvere – svarende til 8,8 %. Da 20 % af det anvendte pollen er "eget", ville man forvente en andel selvbestøvere på 20 %, men ser kun 8,8 % - det svarer til en reduktion på 56 % i evnen til at få fyldte og spiredygtige frø.



Figur 4. Indsamling af nåleprøver i juni 2011 til DNA-oprensning fra hvert enkelt af 104 træer i hvert pollenmiks-kryds. Efter at 1-3 nåle er taget, sættes planten omhyggelig tilbage, – således at træerne også kunne måles efter afslutningen af vækstsæsonen. På det lille indsatte billede ses prøver fra otte planter. Nålene klippes i små stykker for at lette knusningen, der indleder DNA-oprensningen.



Figur 6. Resultater fra krydsninger med pollenmiks i diallel 2. De sorte søjler angiver den observerede hyppighed (i %) af afkom, som er blevet bestøvet af hver af de potentielle fædre (fem eller fire i hvert kryds). De stribe søjler angiver den forventede hyppighed af afkom for hver far – denne er lig med den relative andel af fædrene i pollenmiksen (baseret på vægt – se også figur 3). Hvor der står "Selv" betyder det, at afkom af den pågældende far er resultat af selvbestøvning. "n" angiver antallet af planter i hvert kryds, hvor der er lavet DNA-profil.

For gennemsnitlig spiringstid, frøvægt og udspringstidspunkt ses der praktisk taget ingen forskelle mellem selvbestøvere og udkrydsede. Derimod er der konstateret en reduktion i væksten blandt de selvbestøvede på 10-13 % for hhv. højde og diameter-vækst efter to år.

Plantemateriale til videre forsøgsbrug og frøproduktion

I marts 2012 blev cirka 3000 planter – herunder de godt 1400 planter, hvor der er blevet lavet DNA-profil med DNA-markører – overflyttet til Johansens Planteskole ved Børkop. Her vil de få yderligere et år i planteskole, hvorefter de forventes at blive plantet ud hos Skovdyrkerne Fyn i efteråret 2013 eller foråret 2014. Planterne, hvor både mor og far kendes via DNA-markørerne, vil blive plantet separat i en blok, der vil udgøre verdens første fuldsøskende afkomsforsøg med nordmannsgran. De øvrige planter, hvor kun moderen kendes, kan der på et senere tidspunkt laves DNA-profiler for, hvis det ønskes, men ellers kan de vokse op og blive en værdifuld frøkilde, ligesom fuldsøskende-forsøget.

Konklusioner

Ud fra de udførte pollenmiks-krydsninger kan vi konkludere følgende:

- Pollenmiks-krydsningerne viser, at selv når man systematisk med menneskelig kontrol forsøger at skabe et ensartet bestøvningsmønster – altså at alle potentielle fædre bestøver lige meget – ja, så lykkedes det ikke.
- En del af afvigelsen for en sådan lige fordeling af bestøvningsresultater skyldes en selektion imod selvbestøvning. Selvbestøvningen resulterer i tomme frø.
- Ved anlæg af klonfrøplantager med få kloner er selvbestøvning ofte vurderet som et problem. Med vores pollenmiks – med kun fem kloner – ser vi en andel af selvbestøvere på 8,8 % og ikke 20 % som frygtet.
- Der er nogle kloner, som har forholdsvis flere selvbestøvere, det vil sige, de tåler bedre selvbestøvning, og disse kan man overveje at udelade i frøplantager med få kloner.
- De selvbestøvede planter har i vores planteskole målinger 10-13 % mindre vækstkraft end de udkrydsede.

Tabel 1. Gennemsnitlige resultater for henholdsvis udkrydsede og selvbestøvede planter – baseret på resultater fra begge krydsningsserier. Overordnet effekt af selvbestøvning – rå middelværdier.

Materiale	Antal planter	Frø-vægt	Spiretid gns.	Udspring score	Diameter		kimstængel		Højde	
					forår 11	sommer 11	sommer 10	efterår 10	sommer 11	efterår 11
	stk.	g	dage	score	mm	mm	mm	mm	mm	mm
Udkrydsede	1311	0,146	69,1	3,0	2,9	6,1	34,2	50,3	110,4	111,5
Selvbestøvede	127	0,150	66,3	3,1	2,7	5,3	33,0	48,0	98,8	100,7
I alt	1438									
Forhold selv/udkryds	0,10	1,02	0,96	1,03	0,93	0,87	0,96	0,96	0,90	0,90

- Forsøgene identificerede nogle meget succesrige bestøvere (for eksempel C11 i diallel 2).
- Der var en høj grad af arvelighed for frøvægt lige inden såning, hvilket har en potentiel praktisk konsekvens. Sorteres tilsvarende partier på frøvægt, men med ukendt genetisk baggrund – eksempelvis for at fremme kvaliteten (større frø) af frøpartiet – sorterer man også på den genetiske sammensætning af frøpartiet.
- Projektet har frembragt et unikt plantemateriale af fuldsøskende mellem nogle af de bedste tidligere udvalgte plus-træer. Dette plantemateriale vil indeholde individer, hvis afkom er endnu bedre som juletræer end afkom af de bedste plus-træer i første generation.
- Materialet vil i første omgang kunne bruges som forsøgs-materiale, hvor genetiske analyser kan identificere de bedste juletræskloner, og hvor der kan laves en selektion inden for de bedste familier.
- Hele materialet kan vokse op til en frøavlsbevoksning med høj kommerciel værdi, og fra de bedste kan der tages podekviste til 2. generations klonfrøplantager.
- Projektets resultater med bestøvnings succes vil kunne anvendes til designet af disse.

Referencer

Hansen, O.K., 2007. Hvor villigt hybridiserer almindelig ædelgran med nordmannsgran? PS Nåledrys 60, 4-7.

Nielsen, U.B., 2000. Forædling af nordmannsgran og nobilis: Status og muligheder. 15, 1-54. Hørsholm, Forskningscentret for Skov & Landskab. Pyntegrøntserien.

Nielsen, U.B., 2007. Projekt: 2003-0007: den 31.3.2007. Juletræskvalitet i nordmannsgran – effekt og samspil af genetik og klima for vækst og kvalitet. PAF rapport. Naturstyrelsen. Link: http://www.naturstyrelsen.dk/NR/rdonlyres/52080812-1DC3-4F97-8576-EEE1C302758A/42800/Projektrapport_2003_0007juletraskvalitet_ngr.pdf

Nielsen, U.B., Hansen, O.K., 2009. Effekt af selvbestøvning i nordmannsgran. Nåledrys 67, 12-14.

Tak

Tak til Naturstyrelsen for lån af lift og adgang til FP.259. Tak til Ruth Nielsen, Kaj Ole Dideriksen og Annette Brandsholm på Institut for Fødevarer i Årsløv for succesfuld spiring og dyrkning af planterne. Tak til laborant Lene Andersen for at hjælpe med DNA-ekstraktioner og for at have lavet DNA-profilerne. Viggo Jensen og Carsten Tom Nørgaard for påsætning af mærkater inden overførsel til planteskole af 2.generationsmaterialet. Torsten Dahl for medhjælp ved klipning af nåleprøver og pakning til forsendelse af 2.generationsmaterialet.

Endelig takkes Produktionsafgiftsfonden for Juletræer og Pyntegrønt for økonomisk støtte. ■

Plantning af juletræer

med GPS-styret traktor
og plantemaskine

Skoventrepener Christian Jørgensen

tlf.: 2624 8138



Peter Schjøtt's Planteskole

P36 og 2/1 s:
Tversted
Mosemark

P36:
Skelhusmarken
Skibelund

2/1 s:
Silkeborg Nordskov

2/2:
Nybo

Hedegårdvej 5
7361 Ejstrupholm
Tlf. 75 772 552
p.s@planteskole.dk
www.planteskole.dk