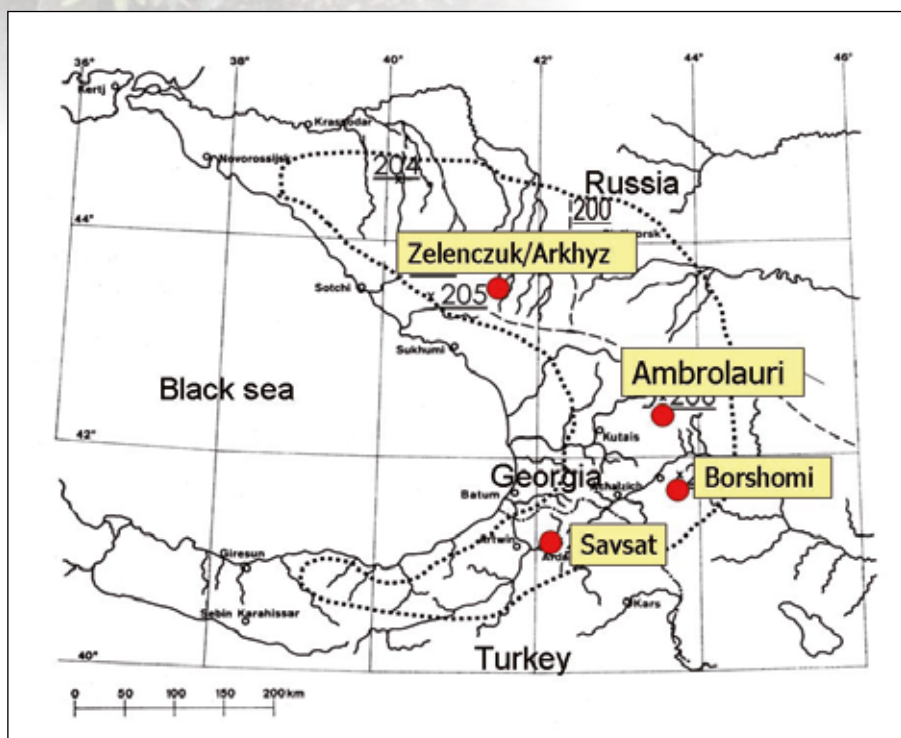


Herkomstkontrol af nordmannsgran-frøkilder via DNA-analyser – et pilotstudie

Af Ole K. Hansen & Erik D. Kjær, Skov & Landskab, KU



Figur 1. Navne på og oprindelsen af de fire frøkilder anvendt i projektet.

Der er lovende muligheder for at udvikle et system til herkomstkontrol baseret på DNA-markører. Fire kommercielle frøpartier fra forskellige dele af nordmannsgranens naturlige udbredelsesområde blev undersøgt ved hjælp af DNA-markører. Ud fra de testede DNA-markører var det muligt at skelne mellem fire nordmannsgran-frøpartier baseret på analyse af 40 frø per parti.

Behov for herkomstkontrol?

Den danske produktion af nordmannsgranjuletræer har i mange år primært været baseret på importeret frø fra Kaukasus, hvor frøpartier fra de to indsamlingsområder Ambrolauri og Borshomi i Georgien har været særligt eftertragtede. Selv om der her i efteråret 2009 for første gang har været en stor frøhøst i danske frøplantager tilknyttet forædlingspro-

grammet for nordmannsgran i Danmark (se Nåledrys nr. 69), så vil importeret frø ganske givet også spille en betydelig rolle i den fremtidige juletræsdyrkning i Danmark.

Forsøg og praktiske erfaringer peger på, at nogle frøindsamlingsområder (provenienser), har langt bedre potentiale for at frembringe gode juletræer end andre. Det er derfor vigtigt at frøet rent faktisk kommer fra den proveniensens som dyrkeren tror han køber. Hvis ikke, kan der opstå ubehagelige overraskelser når juletræskulturen vokser op og resultatet ikke er som forventet.

Problemstillingen vedrørende herkomstkontrol af nordmannsgranfrø har været central i årtier, og er relevant som aldrig før set i lyset af den politiske udvikling i Kaukasusregionen. Georgien er et land, hvor herkomst kontrol er svært at håndhæve for frø

der eksporteres. Visse dele af nordmannsgranens naturlige udbredelsesområde ligger desuden i eller tæt på grænseregionen mellem Rusland og Georgien, eller i den rebelske region Abkhasien, der ikke anerkender centralmagten i Tbilisi (hovedstaden i Georgien). Danske juletræsdyrkere har derfor i mange år efterspurgt en objektiv videnskabelig metode til at eftervise herkomsten af importeret frø.

Er det muligt i praksis?

I et projekt har vi undersøgt potentialet for at teste oprindelsen af nordmannsgranfrø ved hjælp af DNA-markører. Projektet blev betalt af Produktionsafgiftsfonden for Juletræer og Pyntegrønt (PAF). Vi anvendte fem DNA-markører til at undersøge fire udvalgte provenienser fra nordmannsgranens naturlige udbredelsesområde. Rent teknisk kortlagdes regionale forskelle i frekvensen af de forskellige varianter/alleler, der findes i DNA-markørerne. Disse forskelle benyttes til at afgøre, hvor planterne i et givet parti sandsynligvis stammer fra. Hvis forskellene mellem frøkilderne er store vil en stor procentdel af individerne kunne henføres til den korrekte proveniens. Hvis forskellene er små vil det modsat være svært at afgøre, hvor frø/planter i et givet parti kommer fra.

Testede provenienser

Vi valgte at bruge et lille antal provenienser, som ligger geografisk relativt langt fra hinanden. Til gengæld kortlagde vi de geografiske forskelle ret omhyggeligt. Vi formodede, at eventuelle regionale forskelle for de testede DNA-markører lettest kunne påvises med et sådan set-up. Før man kender den geografiske variation er det vigtigt med store stikprøver, det vil sige mange frø per frøkilde fordi man forventer at finde forskelle i frekvensen af DNA-markør-varianter snarere end varianter der kun findes i ét bestemt frøindsamlingsområde. Ideen var, at hvis systemet viste sig at virke for de fire provenienser ville det være relevant at prøve med et større forsøg som fase 2.

Tabel 1. Resultatet af assignment test udført i programmet GeneClass2 på datasættet med de fire frøkilder. Oprindelige populationer henfører til den frøkilde som individet er taget fra, Potentielle populationer henfører til de frøkilder hvortil individet er blevet assignet (tildelt). % korrekt er den procentdel der er tildelt den korrekte frøkilde.

		Potentielle populationer					
		Ambrolauri	Borshomi	Savsat	Zelenczuk	Sum	% korrekt
Oprindelige populationer	Ambrolauri	23	7	5	5	40	57,5
	Borshomi	7	22	9	2	40	55
	Savsat	5	8	24	3	40	60
	Zelenczuk	2	2	5	31	40	77,5
						160	Gns. 62,5

Mindre prøver af kommercielle frøpartier blev leveret af Abies Frø ved Børge Clemmensen (nu en del af Levinson & Abies A/S) – navnene på disse provenienser og deres oprindelse er indtegnet på figur 1.

DNA-analyse

Først blev frøene opfugtet, lagt til kuldebehandling og efterfølgende spiring, og fra de fremspirende kimplanter blev der ekstraheret DNA. I alt blev der ekstraheret DNA fra 40 kimplanter per proveniens.

Selve DNA-analysen bestod i at bestemme kimplanternes genotype for hver af fem afprøvede DNA-markører udviklet specielt til nordmannsgran (Hansen et al 2005). Denne type DNA-markører har også været brugt til at undersøge bestøvningsforhold i frøplantaer (Nåledrys nr. 56 og nr. 64) samt hybridisering mellem almindelig ædelgran og nordmannsgran (Nåledrys nr. 60). I førnævnte undersøgelser blev DNA-markørerne brugt til at finde individers sande fædre ud fra et antal kendte mulige fædre. I nærværende projekt var en sådan faderskabsanalyse ikke mulig, idet der jo er utallige ukendte potentielle fædre og mødre til frøet, men data (genotyperne) er af samme type.

Dataanalyse

Til at analysere data fra de 160 frø anvendtes en metode som på engelsk benævnes "assignment tests". Assignment kan oversættes som tildeling, og der findes ingen dansk beskrivelse af denne teknik, hvorfor vi bibeholder den engelske terminologi. Assignment tests er metoder til at bestemme, hvilken population individer tilhører, og de baserer sig på en statistisk sandsynlighed beregnet ud fra de genetiske data. Der findes en række forskellige typer af assignment test, forskellen mellem disse er, hvordan beregningerne laves rent teknisk. Vi har i projektet afprøvet 8 typer, og de giver stort set samme resultater for vores data. For enkelhedens skyld viser vi derfor kun resultaterne for én type af assignment test i nærværende artikel.

I den anvendte assignment test, som er udviklet af Paetkau et al. (1995), beregnes den forventede frekvens af hvert individs genotype i hver af de potentielle populationer, og dernæst tildeles (assignes) individerne til den population, hvor deres genotype har den højeste forventede sandsynlighed. Jo flere af individerne, der bliver tildelt til den population de rent faktisk stammer fra, jo bedre er vores molekylære markører til at adskille populationerne. I den forbindelse skal det nævnes, at det jo er lettere at få en høj korrekt tildelingsprocent jo færre populationer man undersøger. Når vi undersøger fire populationer skulle 25% af individerne fra en given population jo rent faktisk tildeles korrekt, hvis man blot tildelte individerne tilfældigt f.eks. ved at slå med en terning!

Resultater

I tabel 1 ses resultaterne af en assignment test baseret på data fra de genetiske analyser og udført i programmet GeneClass2 (Piry et al. 2004). Samme resultater er afbil-

det i figur 2. En meget stor andel af individerne blev tildelt den rigtige population (frøkilde) – gennemsnitligt er der tale om 62,5 % af individerne som assignes korrekt. Zelenczuk er den population, hvor flest individer bliver korrekt klassificeret – hele 77,5 % blev her tildelt den rigtige population. Når man ser på figur 2 er man ikke i tvivl om, hvilke populationer de enkelte frøprøver stammer fra. Det er altid den rigtige proveniens som skiller sig ud med en høj andel (diagonalen i henholdsvis tabel 1 og figur 2).

Resultaterne betyder, at hvis man står med et enkelt frø eller en enkelt plante, kan man med rimelig god sandsynlighed afgøre, hvor den kommer fra. Men der er stadig en ret stor risiko for, at man tildeler den en forkert oprindelse. Når 77,5 % af individerne fra Zelenczuk tildeles den rigtige oprindelse, betyder det jo samtidig at 22,5 % tildeles forkert oprindelse. Metoden er imidlertid anderledes stærk, hvis ikke der skal testes på ét enkelt individ, men derimod på et helt parti frø eller planter. I vores analyse

Forst Flowmatic 500 Skovgødningspreder



Velegnet til juletræ- og pyntegrønts kulturer, maskinen er en luftgødningspreder, hvis blæser trækkes af traktorens kraftudtag. Gødningstilførslen og tudens svingninger trækkes af en oliemotor via traktorens olieudtag. Maskinen er liftophængt og derfor meget smidig til gødning i skoven.

SPECIFIKATIONER:

Tankindhold 500 kg/ 1000 kg
Kastebredde op til 20 m, justerbar
Kastehøjde fra 2 - 3,5 m
Kraftbehov 35 hk
PTO 540
Gødningsmængde op til 2400 kg pr. time
Tud justerbar
Læsehøjde 1,24 m
Totalhøjde 1,80 m
Længde 1,60 m
Bredde 1,35 m
Vægt 370 kg

EKSTRAUDSTYR:

75° tud (standard) - 90° tud
Fjernbetjening - Højtryksfilter
Forhøjning for ekstra gødning.

Bovlundbjergvej 20 • DK-6535 Branderup J • Tlf. +45 7483 5233
Fax +45 7483 5395 • bovlund@bovlund.dk • www.bovlund.dk

BOVLUND

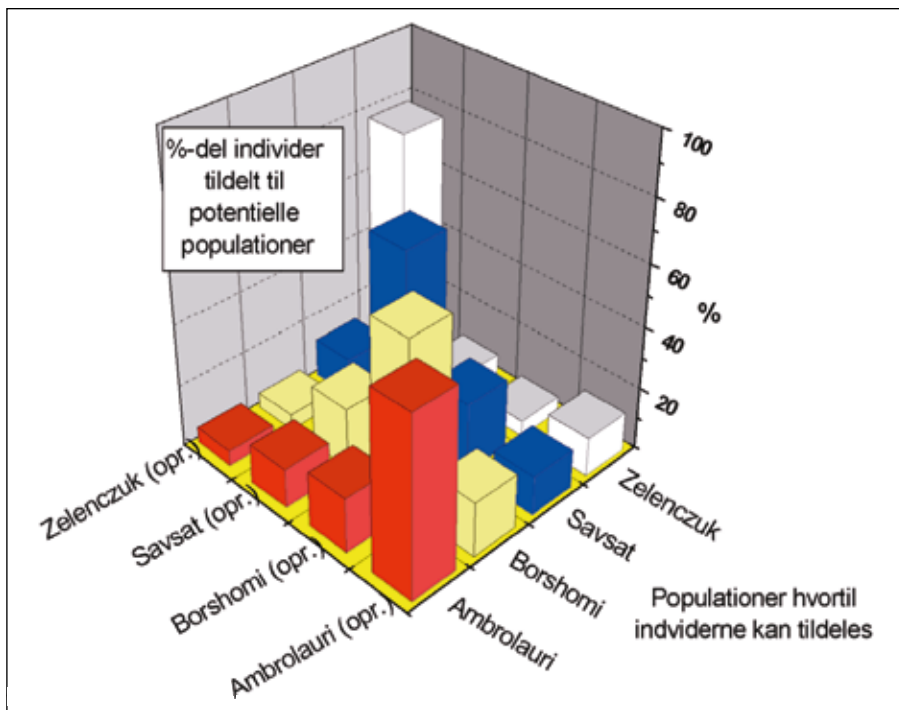
er det jo meget tydeligt, hvor hver af de fire partier stammer fra, fordi individerne i partiet fra Ambrolauri primært tildeles Ambrolauri, individerne i Borshomi-partiet overvejende tildeles Borshomi osv. For de fire provenienser testet i dette studium kan vi altså i alle tilfælde finde den korrekte oprindelse ud af fire mulige.

I den virkelige verden er der jo mange flere end fire mulige provenienser. Selvom studiet viste, at analysen baseret på DNA-markørerne afslørede den korrekte oprindelse, kan vi ikke vide om dette stadig vil være tilfældet, hvis vi udvider undersøgelsen til et meget større antal provenienser. Dette aspekt ville imidlertid være oplagt at undersøge som opfølgning på de meget positive resultater fra dette studium.

Afrunding og perspektiver

Vi var overraskede over de meget positive resultater. Set i forhold til mange andre undersøgte træarter har nordmannsgran et ret begrænset udbredelsesområde. Ydermere er den type DNA-markører som er anvendt såkaldte neutrale markører, det vil sige de antages ikke at have nogen indflydelse på tilpasning til lokale forhold, men afspejler kun hvor meget genetisk udveksling (gen-flow), der er mellem de forskellige populationer. Nordmannsgran er vindbestøvet og pollen flyver langt så man kunne tro, at der er meget gen-flow og derfor lille forskel mellem populationerne. Vi forventede således, at forskellene mellem frøklidderne i forhold til DNA-markørerne ikke var ret store. Desto mere overraskende var det, at DNA-markørerne rent faktisk ser ud til at kunne skelne effektivt mellem provenienserne.

Nærværende projekt har undersøgt potentialet i forhold til at kunne teste oprindelsen af nordmannsgranfrø fra artens naturlige udbredelse. Den overordnede konklusion er, med de behørigte forbehold, at det virker mu-



Figur 2. Resultatet af Paetkau et al. (1995)'s assignment test udført i programmet GeneClass2 – samme tal som i tabel 1- blot her udtrykt i procent. Oprindelige populationer (opr.) henfører til den frøkilde som individet er taget fra, potentielle populationer henfører til de frøklidder hvortil individet er blevet assignet (tildelt).

ligt at udvikle et DNA-baseret kontrolsystem af herkomsten. Yderligere forskning i emnet bør inkludere et større antal frøklidder. Potentialet er udvikling af en effektiv, objektiv og hurtigt test for geografisk oprindelse. Dette vil styrke juletræsdyrkerens produktionssikkerhed. Desværre er perspektiverne for at få finansiering til så anvendelsesorienteret forskning på det seneste blevet væsentligt forringet, og p.t. er det derfor usikkert om der er basis for at lave en opfølgning.

Tak

Tak til Børge Clemmensen for uden beregning at have leveret de undersøgte frøpartier.

En tak til Produktionsafgiftsfonden for Juletræer og Pyntegrønt (PAF), der har støttet projektet økonomisk. Laborant Lena Byrgesen har givet kompetent assistance med udskæring af kimplanter og efterfølgende oprensning af DNA.

Kilder

Ditlevsen B. og Nielsen U.B. 2009. Stor frøhøst i nye danske nordmannsgran frøplantager. Nåledrys nr. 69 – s. 5-12.

Hansen O.K. 2006. DNA-markører anvendt til undersøgelse af nordmannsgran frøplantage. Nåledrys nr. 56 – s. 5-8.

Hansen O.K. 2007. Hvor villigt hybridiserer almindelig ædelgran med nordmannsgran? Nåledrys nr. 60 – s. 4-7.

Hansen O.K. og Cuenca A. 2008. Er dansk nobilis deprimeret? Nåledrys nr. 64 – s. 32-37.

Hansen O.K., Vendramin G.G., Sebastiani F. og Edwards K.J. 2005. Development of microsatellite markers in Abies nordmanniana (Stev.) Spach and cross-species amplification in the Abies genus. Molecular Ecology Notes, 5, 784-787

Paetkau D., Calvert W., Stirling I., og Strobeck C. 1995. Microsatellite Analysis of Population-Structure in Canadian Polar Bears. Mol Ecol 4: 347-354.

Piry S., Alapetite A., Cornuet J.M., Paetkau D., Baudouin L. og Estoup A. 2004. GENECLASS2: A software for genetic assignment and first-generation migrant detection. J. Hered. 95: 536-539.

Skovningsset

Dansk Skovkontor

Danmarks største udvalg af godkendt, påkrævet beklædning til motorsavsbrug.

Sætpris fra 995,- kr

(model standard gummistøvler, overall og hjelmsæt) til 3500,- kr (goretex airstream læderstøvler og stretch-air kevlar extreme bukser, hjelmsæt efter ønske).

Priser excl. moms. Lagerføres i størrelse 46-58/41-47, nogle læderstøvler str. 37-50

Dansk Skovkontor A/S . Tlf. 57 83 01 10 . www.dansk-skovkontor.dk

