

Er dansk nobilis deprimeret?

Af Ole K. Hansen & Argelia Cuenca, Skov & Landskab, KU.

DNA-markører blev testet i nobilis og efterfølgende brugt til at analysere bestøvningsforholdene i klonfrøplantagen FP.623, C.E. Flensborg plantage. Under arbejdet blev det klart, at der er en meget lille genetisk diversitet i FP.623 og dermed i meget af det danske nobilismateriale. Dette er illustreret via en sammenligning med to importerede nobilis provenienser, ligesom yderligere én dansk frøkilde - F.402 Overgård blev undersøgt. Det diskuteres, om den generelt langsommere vækst i dansk nobilis, sammenlignet med direkte importer, kan skyldes indavlsdepression. På grund af den lave diversitet i FP.623 var det svært at lave et sikkert billede af bestøvningsforholdene i FP.623, idet

der kun kunne findes fædre for 95 ud af 367 frø. Graden af selvbestøvning kunne dog estimeres til ca. 2%.

De såkaldte DNA-markører er allerede en integreret del af den genetiske forskning og forædling af nordmannsgran (Hansen 2006). De er bl.a. blevet brugt til at undersøge hybridisering mellem almindelig ædelgran og nordmannsgran (Nåledrys nr. 60), samt anvendt til at undersøge forskelle i kloners pollenbidrag og graden af fremmedbestøvning i en nordmannsgran klonfrøplantage (Nåledrys nr. 56). Netop sidstnævnte type undersøgelser var motivet for nærværende projekt, idet der i Danmark stort set kun bruges dansk nobilisfrø. Det kan derfor være interessant at vide mere

om bestøvningsforholdene i danske nobilis frøkilder. Helt konkret tog projektet udgangspunkt i HedeDanmarks ønske om at etablere en ny klonfrøplantage med særlig fokus på produktion af juletræer. De dertil udvalgte kloner blev derfor valgt som vores studieobjekt.

DNA-markører i nobilis

Der er i de senere år udviklet DNA-markører i adskillige ædelgran-arter - bl.a. i nordmannsgran (Hansen et al. 2005) og almindelig ædelgran (Cremer et al. 2006). Disse markører er hver især udviklet specifikt til en *Abies*-art, men ofte kan man anvende denne type DNA-markører (såkaldte mikrosatellitter) på andre arter indenfor samme



Figur 1. Udsigt over FP.623 – C.E. Flensborg plantage. Billedet er taget fra lift i forbindelse med koglehøst 2006. Foto: Ulrik Bräuner Nielsen.

slægt. Første del af arbejdet bestod derfor i at finde ud af hvilke der kunne bruges i nobilis. Der er tidligere lavet undersøgelser af selvbestøvning i nobilis med isoenzymer, og da dette arbejde viste, at det var svært at finde variable isoenzymer i plantematerialet fra FP.623 C.E. Flensborg plantage (Siegismund et al. 1996), valgte vi i første omgang at teste markørerne i en proveniens importeret direkte fra USA.

Materialer og metoder

I alt 50 mikrosatellitter fra 6 forskellige *Abies*-arter blev afprøvet på nobilis, hvor screeningen skete på 9 individer fra den direkte importerede proveniens Marys Peak. Denne proveniens indgår i serien af kombinerede afkoms- og proveniensforsøg, der betegnes PS-serien, og som er etableret i 1987 af den daværende Pyntegrøntsektion (Nielsen 1998a). De 9 individer var de tilbageværende individer i en enkelt parcel i forsoget på Bregentved Skovdistrikt. Det viste sig svært at finde gode markører, dvs. med tilstrækkelig variation, og nem aflæsning af resultatet. Til sidst blev der dog udvalgt 6 markører til de videre analyser.

Undersøgte kloner i FP.623 samt FP.261

FP.623, der ejes af Hedeselskabet, er beliggende i C.E. Flensborg plantage ca. 20 km nord for Viborg (figur 1). Frøplantagen blev etableret i 1969-70 og består af 100 kloner, som er udvalgt blandt 23 danske bevoксninger i årene 1966-1967 af K. Brandt fra Hedeselskabet. Klønfrøplantagen er således en ganske god stikprøve på det danske nobilismateriale, hvoraf mange af bevoксningerne er af Frijsenborg-afstamning (Nielsen 1998b). Til etablering af en ny klønfrøplantage med særlig fokus på juletræsproduktion er der udvalgt 9 af de oprindelige 100 kloner på baggrund af resultater fra *Skov & Landskabs* feltforsøg. Der er udvalgt yderligere to kloner til HedeDanmarks nye frøplantage, som ikke er repræsenteret i FP.623, disse står bl.a. i FP.261, som er beliggende på Skov og Naturstyrelsen, Trekantsområdet arealer ved Horsens. FP.261 administreres af Statskovenes Planteavlstation, og den er etableret over tre omgange i årene 1994-2000, hvor de træer vi høstede på, befinder sig i den ældste del.

Indsamling og spring af frø

Fra alle 11 udvalgte kloner blev der ultimo august 2006 høstet frø på hver to rameter (ramet = samme individ (klon) podet op) – dvs. på 18 træer og 4 træer i henholdsvis FP.623 og FP.261 (figur 2). I FP.623 blev der ligeledes indsamlet nåleprøver fra alle 100 kloner, mens der i FP.261 kun blev taget nåleprøver af de 4 træer, hvor frøet blev høstet. Denne forskel skyldes, at målet var at lave en fuld undersøgelse af bestøvningsforholdene i FP.623 (se tilsvarende studie af en nordmanns-

Tabel 1. Sammenligning af genetisk diversitet i 4 provenienser: Frøplantagen FP.623 – C.E. Flensborg plantage, frøavlbevoксningen F.402 Overgård samt de 2 importerede provenienser Washington Cowlitz Randle og Marys Peak

Markør	Provens	# Individer	# Alleler	H _o
NFH3	Marys peak	9	10	0,89
	Washington Cowlitz Randle	20	13	0,85
	FP623 C.E. Flensborg plt.	100	8	0,71
	F.402 Overgaard	19	5	0,63
Abies15	Marys peak	9	4	0,78
	Washington Cowlitz Randle	20	4	0,70
	FP623 C.E. Flensborg plt.	100	2	0,36
	F.402 Overgaard	19	2	0,53
AfsI_18	Marys peak	9	9	0,89
	Washington Cowlitz Randle	20	14	0,95
	FP623 C.E. Flensborg plt.	100	7	0,65
	F.402 Overgaard	19	5	0,74
SF78	Marys peak	9	8	0,78
	Washington Cowlitz Randle	19	8	0,68
	FP623 C.E. Flensborg plt.	100	6	0,67
	F.402 Overgaard	19	5	0,58
As09	Marys peak	9	7	0,78
	Washington Cowlitz Randle	20	8	0,80
	FP623 C.E. Flensborg plt.	100	4	0,41
	F.402 Overgaard	19	3	0,26
Abfi15	Marys peak	9	12	0,67
	Washington Cowlitz Randle	19	13	0,74
	FP623 C.E. Flensborg plt.	100	5	0,70
	F.402 Overgaard	19	6	0,53
Gns.	Marys peak	9,0	8,3	0,80
	Washington Cowlitz Randle	19,7	10,0	0,79
	FP623 C.E. Flensborg plt.	100,0	5,3	0,58
	F.402 Overgaard	19,0	4,3	0,54

Campagnola luftdrevne sakse er idéel til en hver form for klip

Se mere på: www.campagnola.dk

Indgang butik

Skovudstyr

Vævervej 4 · Viborg · Tlf. 87 281 281

**Figur 2. Koglehøst
på udvalgte kloner i
FP.623 – her klon nr. 5.
Foto: Ole K. Hansen.**



gran frøplantage i Nåledrys nr. 56), mens der kun skulle måles selvbestøvning i de to kloner fra FP.261. To hundrede frø fra hvert frøtræ blev nøjagtig optalt, opfugtet 24 timer i vand og efterfølgende stratificeret i spirekasser ved 5°C indtil spiring. DNA blev ekstraheret fra de fremspirende kimplanter.

Genotyping af kimplanter, genetiske data og analyser

Ved genotyping af et individ forstås her, at der for hver af de 6 udvalgte DNA-markører bestemmes, hvilke alleler individet har. Alleler er de forskellige varianter, som en DNA-markør kan have, og for mikrosatellitter, som er meget variable, er der typisk mange forskellige. Et enkelt træ kan dog maksimalt have to alleler, idet de ligesom mennesker har to parallelle områder, kaldet loci, for hvert sted i den samlede mængde DNA. Således har nåletræer normalt 12 kromosompar og $12 \times 2 = 24$ kromosomer, mens mennesket har 46 kromosomer ($22 \times 2 + 2$ kønskromosomer).

Har et træ det samme allel i begge loci, siges det at være homozygot. Har det to forskellige alleler er det en heterozygot. Andelen af heterozygote individer kaldes heterozygotigraden, og siger dermed noget om den genetiske diversitet i en gruppe af individer. Jo højere heterozygotigrad, desto større genetisk diversitet.

Et andet mål for den genetiske diversitet i en gruppe individer er antallet af forskellige alleler (=varianter) for en DNA-markør. Ved at kombinere genotypen for forskellige markører bliver det mere og mere usandsynligt, at to individer har den samme genotype for alle markører. Dette kaldes genetiske fingeraftryk og kan bruges til at lave faderskabssager; eksempelvis bestemme hvem som er faderen til et frø. Det betyder, at jo mere variation der findes i DNA-markørerne, jo lettere er det at bestemme hvem der er far til et frø i en frøplantage.

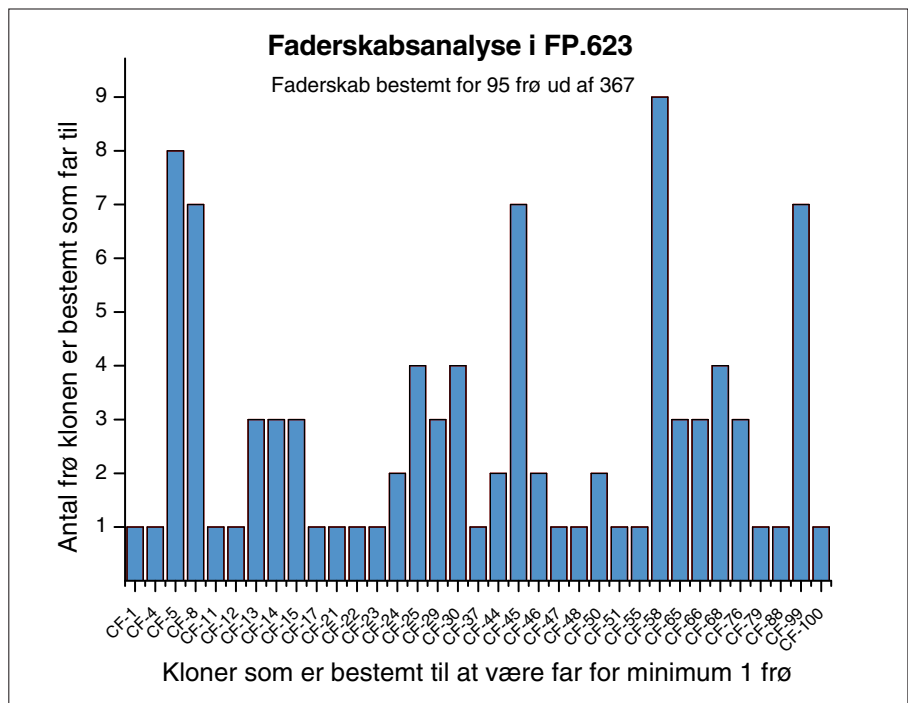
Andre provenienser i studiet

Da de første resultater viste en stor forskel i den genetiske diversitet (= genetisk variation) mellem de 9 individer i Marys Peak og de 100 kloner i FP.623, valgte vi at undersøge yderligere to provenienser – den direkte importerede proveniens Washington Cowlitz Randle samt F.402 Overgård. Førstnævnte tog vi fra PS-seriens afkoms- og proveniensforsøg på Gavnø skovdistrikt, mens sidstnævnte, der ifølge Nielsen (1998b) er afkom af F.240a Frijzenborg, blev høstet i et forsøg med danske provenienser på Giesegård skovdistrikt.

Resultater

Resultaterne fra studiet falder i to kategorier:

- 1) hvordan er den genetiske diversitet i dansk nobilis kontra direkte importeret nobilis, og



Figur 3. Figur der viser fordelingen af pollenbidrag (fædre) til de 95 frø hvor dette rimelig statistisk sikkerhed kunne fastslås. Søjler viser antal afkom. Resultaterne bør tages med forbehold pga. af den lave succesrate med at bestemme fædre (95 frø ud af 367 i FP.623).

- 2) hvordan er bestøvningsforholdene i en dansk nobilis klonfrøplantage eller hvor stor er graden af selvbestøvning?

Genetisk diversitet

Den genetiske diversitet, som blev fundet ved at genotype individerne fra de fire forskellige provenienser, kan ses i tabel 1. Et meget klart mønster er, at de to danske frø-

kilder (FP.623 og F.402) har markant mindre genetisk diversitet; både når der ses på antallet af alleler (varianter), og når der ses på heterozygotigraden (H_0). For eksempel har Marys Peak 9 alleler og en heterozygotigrad på 0,89 for markøren AfSI_18 i de 9 genotypedede individer, mens FP.623 har 7 alleler og en heterozygotigrad på 0,65 i sine

Tabel 2. Klonvise estimater for udkrydsningsraten, og dermed selvbestøvningsraten. På grund af den statistiske metode, kan udkrydsningsraten godt estimeres til at være over 100%, hvilket i praksis selvfølgelig ikke er muligt. I sidste kolonne angives den maksimale selvbestøvning som klonen kan have haft, beregnet ud fra estimatet for udkrydsningsraten. Da det viste sig at de to rameter af klon 47 i FP.623 havde forskellig genotype er de behandlet hver for sig.

Klon	Antal frø undersøgt	Udkrydsning i %	Maksimal selvbestøvning i %
9-FP623	27	97,3	2,7
97-FP623	37	92,5	7,5
47N-FP623	18	98,7	1,3
47S-FP623	20	103,5	0
50-FP623	36	100,3	0
52-FP623	48	97,5	2,5
56-FP623	39	102,2	0
60-FP623	45	101,3	0
63-FP623	39	92,5	7,5
97-FP623	58	95,8	4,2
40-FP261	89	94,4	5,6
5-FP261	40	100,8	0

100 individer. Samme billede ses for alle 6 undersøgte DNA-markører når der ses på antallet af alleler.

Gennemsnitligt set har de to danske frøkluder kun omkring 50% af de alleler, som der findes i de to direkte importere, og heterozygotigraden i FP.623 og F.402 er kun omkring 70% af, hvad den er i de to amerikanske provenienser (tabel 1). Dette er i populationsgenetikken en ret dramatisk forskel, og et oplagt spørgsmål er hvad den skyldes. En sandsynlig medvirkende årsag er, at dansk nobilis har været igennem en genetisk flaskehals, da den blev indført til Danmark. Det skete første gang i 1855 (Lange 1999) og med større plantninger fra 1880'erne (Larsen et al. 1997). Genetisk flaskehals betyder, at en ny population er opstået på baggrund af et lille antal individer. Disse få individer har så givet ophav til (rigtig) mange afkom, men de mange afkom vil ikke have ret mange flere alleler (varianter) i DNA-markørerne. Nye alleler opstår nemlig kun via mutationer, som er forholdsvis sjældne, og det tager derfor mange generationer at opbygge ny genetisk diversitet efter en genetisk flaskehals. En anden mulig årsag til den lave genetiske diversitet er selektion. Ved udvalgte af plantemateriale kan man have favoriseret individer, der stammede fra de

populationer, som var opstået på baggrund af få individer. Den lille genetiske diversitet i dansk nobilis er sandsynligvis opstået som en kombination af en genetisk flaskehals og efterfølgende selektion. At den genetiske flaskehals alene skulle være årsagen er ikke plausibelt, da nobilis frø, ifølge Barner et al. (1980), er indført til Danmark gennem en længere årrække.

Faderskabsanalyser og udkrydsningsrater

På grund af den meget lave variation i klonerne fra FP.623 var det kun muligt at finde fædre for 95 ud af de 367 undersøgte frø, og det endda med en mindre statistisk sikkerhed, end der normalt anvendes. Resultaterne, som er vist i figur 3, skal derfor tages med et meget stort forbehold. Ikke blot fordi, at den statistiske sikkerhed er lavere end normalt (80% mod normalt 95%), men også fordi, at der kunne være en tendens til at fædre med afvigende genotyper lettere vil kunne 'genkendes' som fædre. De mange frø, hvor der ikke kunne findes en far, har måske fædre med mindre afvigende genotyper. Antages det, at resultatet i figur 3 er repræsentativt for alle afkom, ses det, at der er stor variation i antallet af afkom, som de forskellige kloner er fædre til. Dette mønster er også observeret i nordmannsgran og almindelig ædelgran.

Selv om det var svært at finde præcise bud på hvem faderen var til de fleste af de undersøgte frø, var det dog muligt at komme med nogle estimater for udkrydsningsraten, dvs. hvor stor en andel af frøet, der ikke er selvbestøvet. Den overordnede udkrydsningsrate i FP.623 og FP.261, baseret på i alt 496 frø, blev estimeret til at være 97,9% med et 95% konfidensinterval på (95,4 % - 100,1 %). Det betyder at selvbestøvningen estimeres til at være ca. 2%, men at vi faktisk ikke kan sige, om den statistisk set er forskellig fra 0. Individuelle estimater for de 11 kloner ses i tabel 2. Det ses af tabellen at der ikke er meget forskel mellem klonernes estimater, der svinger fra 92,5% (klon 97-FP623) til 103,5% (klon 47S-FP623). At estimatet kommer over 100% er en følge af den anvendte statistiske metode - i praksis kan udkrydsningen selvfølgelig maksimalt være 100%.

Diskussion

Dansk nobilis kontra direkte importere

Dansk nobilis er generelt set ret så forskellig fra de direkte importere. I PS-serien har man kunne se den direkte sammenligning mellem importerede provenienser og dansk nobilis. De danske nobilis vokser langsommere og har en mere blå farve (figur 4) (Nielsen 2007). Dansk nobilis i disse forsøg er afkom



Figur 4. Billede der viser forskellen i væksthastighed mellem noget dansk plustræafkom (til venstre) og den direkte importerede proveniens Washington Cowlitz Randle (til højre). Billedet er fra det kombinerede afkoms- og proveniensforsøg på Langesø i PS-serien. Foto: Ulrik Bräuner Nielsen.

af udvalgte træer, og dermed er der ganske givet selekteret for blå farve og korte grene. En direkte sammenligning er dermed ikke så let at lave, men ikke desto mindre er det den samme erfaring man har i det praktiske skovbrug. De DNA-markører vi har anvendt i studiet er neutrale markører, der ikke har nogen forbindelse med egenskaber som væksthastighed og farve. Den observerede lave diversitet i dansk nobilis er derfor ikke alene et resultat af selektion for gode klippegrøntegenskaber. En sandsynlig medvirkende årsag er, at der ved indførslen af nobilis kun er ankommet frø fra et begrænset antal individer, og disse er blevet spredt og opformeret i et stort antal gennem de sidste 120-150 år (genetisk flaskehals). En stor del af de kårede danske nobilisbevoksninger er nært beslægtede – F402 er således også af Frijsenborg-afstamning, ligesom mange af de udvalgte kloner i FP.623 (Nielsen 1998b).

Når få individer grundlægger en population og formerer sig, er der forøget risiko for at beslægtede individer får afkom med hinanden. Sådant afkom kan vise sig at være mindre levedygtigt, vækstkraftigt etc. - dette kaldes indavlsdepression. Nåletræer har vist sig at være følsomme for indavlsdepression. Det kan derfor tænkes at årsagen til den langsommere vækst i dansk nobilis ikke kun skyldes menneskelig selektion, men at indavlsdepression også bidrager til mindre vækstkraft. Et eksempel som kan støtte denne hypotese er proveniensen Mølleskoven, der menes at stamme fra ganske få træer, og som netop er kendetegnet ved meget korte grene/langsom vækst (se PS Nåledrys 45 og Nielsen 2003).

Faderskabsanalyser i nobilis – udkrydsningsrater
Den overraskende lave genetiske diversitet i FP.623 betød, at det ikke var muligt at lave en sikker detaljeret analyse af bestøvningsforholdene – i hvert fald kun for en mindre del af frøene. Disse resultater antyder, at der er stor forskel i hvor meget de forskellige kloner bidrager med af pollen, *men resultaterne bør tages med forbehold*. Data tillod os dog at se på udkrydsningsraten/selvbestøvningen. Her viste analysen, at udkrydsningsraten ikke er statistisk forskellig fra 0, altså er der ingen eller meget lidt selvbestøvning i det undersøgte materiale. Dette er helt på linje med de resultater, som blev fundet med isoenzymer i 1990'erne (Siegismund et al. 1996).

Generelle betragtninger

På basis af DNA-markører kunne der ikke laves en fuld faderskabsanalyse i FP.623. De biologiske forhold i form af manglende genetisk diversitet forhindrede det. Omvendt afslørede studiet et interessant fænomen – lav diversitet i dansk nobilis – som sandsynligvis skyldes en genetisk flaskehals. Og det er forskningens grundvilkår; at man ikke ved hvad det hele ender med, når man går

i gang med projektet. Og at der ofte dukker nye spørgsmål op som følge af de fundne svar! Det kunne f.eks. være spændende at grave mere i oprindelsen af dansk nobilis – hvor kommer det fra? Hvor mange træer stammer Mølleskoven fra? DNA-markørerne vil måske kunne svare på disse spørgsmål. Projektet har også vist nytten af international publicering af forskningsresultater. I vores projekt viste det sig, at de 6 mest velegnede DNA-markører tilfældigvis kom fra hver én af de *Abies*-arter, hvor markører er udviklet. Vi kunne dermed udnytte arbejdet fra 5 andre forskningsgrupper. Endelig vil vi gerne fremhæve værdien af feltforsøg, som i nobilis-projektet har vist sig at udgøre en værdifuld genbank, hvor veldefineret materiale har kunnet hentes. – i vores tilfælde de direkte importerede provenienser samt F402 Overgård.

Tak

Tak til Poul Elgård (HedeDanmarks skovfrøsektion) og Bjerne Ditlevsen (Skov- og Naturstyrelsen, Øresund), for velvilligt at have stillet de to frøplantager til rådighed, og for at have hjulpet med at høste og processe frø. En tak til Produktionsafgiftsfonden for Juletræer og Pyntegrønt (PAF), der har støttet projektet økonomisk. Laborant Lena Byrgesen har givet kompetent assistance med udklæring af kimplanter og efterfølgende oprensning af DNA. Endelig er vi taknemlige for at seniorforsker Ulrik Bräuner Nielsen og professor Erik Kjær, begge Skov & Landskab, har delt deres viden om dansk nobilis med os. Ulrik Bräuner Nielsen har ydermere assisteret ved indsamlingen af plantemateriale. Tak til forsøgsværterne på Bregentved, Gavnø og Giesegård for at støtte forskningen ved at stille ressourcer til dette formål.

Litteratur

Barner H, Roulund H, Qvortrup SA (1980)

Abies procera frøforsyning og proveniensvalg. *Dansk Skovforenings Tidsskrift*, 65, 263-295.

Cremer E, Liepelt S, Sebastiani F et al. (2006) Identification and characterization of nuclear microsatellite loci in *Abies alba* Mill. *Molecular Ecology Notes*, 6, 374-376.

Hansen OK, Vendramin GG, Sebastiani F, Edwards KJ (2005) Development of microsatellite markers in *Abies nordmanniana* (Stev.) Spach and cross-species amplification in the *Abies* genus. *Molecular Ecology Notes*, 5, 784-787.

Hansen OK (2006) *Integrating molecular genetic methods in seed source management and breeding activities of Nordmann fir*. Ph.D.-afhandling. The Royal Veterinary and Agricultural University (KVL), Denmark.

Lange J (1999) *Kulturplanternes indførsels-historie i Danmark*, second edn. DSR forlag, Frederiksberg.

Larsen JB, Møller IS, Nielsen UB (1997). *Nobilis – proveniensvariation, forædling og frøkildevalg*. *Dansk Skovbrugs Tidsskrift*, 82, 193-202.

Nielsen, UB (1998a) Fremtidig frø- og planteforsyning af nobilis til juletræer og klippegrønt – en prognose. *Videnblad 3.2-11 Pyntegrøntsserien. Skov & Landskab*.

Nielsen, UB (1998b) Dansk nobilis – et "stamtræ" baseret på afprøvede og kårede bevoksninger. *Videnblad 3.2-13 Pyntegrøntsserien. Skov & Landskab*.

Nielsen UB (2003) Valg af danske nobilis provenienser til produktion af klippegrønt – status for produktion af ungdomsgrene. Hørsholm, *Skov & Landskab*. Pyntegrøntsserien.

Nielsen UB (2007) Genetic variation in characters important for noble fir greenery production. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 22, 99-109.

Siegismund HR, Kjaer ED, Nielsen UB (1996) Mating system estimates and effective population numbers for an isolated noble fir (*Abies procera*) clonal seed orchard in Denmark. *Canadian Journal of Forest Research*, 26, 1135-1141.





En vifte af muligheder

ASM ØSTERVANG • www.asm-ostervang.dk

Tlf. 98 56 52 50 • Fax 98 56 55 52 • Terndrupvej 28 • Astrup • 9510 Arden

Netmaskine • Hegnsudruller • Plantemaskine: 1- 2- eller 3-rækkes • Pallegaffler
Transportvogn • Spidser • 1-armet sprøjtebom

Stærk 1-rækket plantemaskine til plantning mellem stød – fås nu også som 2-rækket
NYHED Pælehammer, hydraulisk

ASM ØSTERVANG giver dig en bred vifte af muligheder at vælge imellem, indenfor skovbrug, til konkurrencedygtige priser.

Du er naturligvis velkommen til at kontakte os, for yderligere oplysning eller for at få tilsendt prospekt.