Genetik

DNA-markører anvendt til undersøgelse af nordmannsgran frøplantage

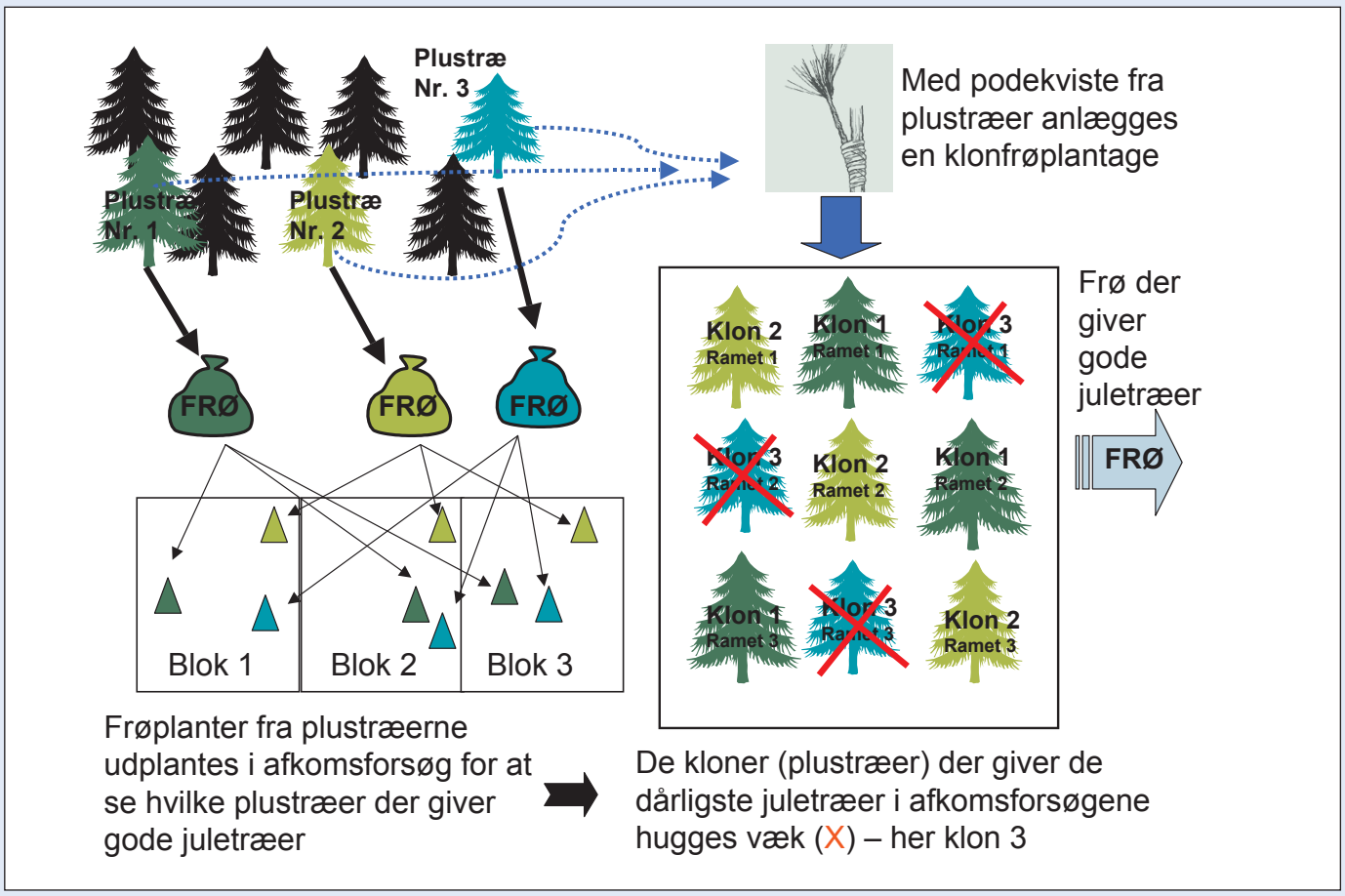
Af Ole K. Hansen, Afdeling for Vedplanters Genressourcer, Skov & Landskab, KVL

DNA-markører er et eksempel på hvordan bioteknologi kan anvendes i forbindelse med produktion og forvaltning af pyntegrønt. I Ph.d.-projektet "Integrating molecular genetic methods in seed source management and breeding activities of Nordmann fir" er der udviklet DNA-markører i nordmannsgran med støtte fra bl.a. Produktionsafgiftsfonden for Juletræer og Pyntegrønt (PAF). De udviklede DNA-markører er såkaldte mikrosatellitter, som er områder i plantens DNA, der ofte ændrer sig spontant via mutationer. Derfor har forskellige individer ofte forskelle i mikrosatellitterne, og mikrosatellitterne kan derfor fungere som et genetisk fingeraftryk for hvert enkelt træ. I denne artikel gives et eksempel på hvordan mikrosatellitter kan bruges til at undersøge pollenbidrag i en klonfrøplantage.

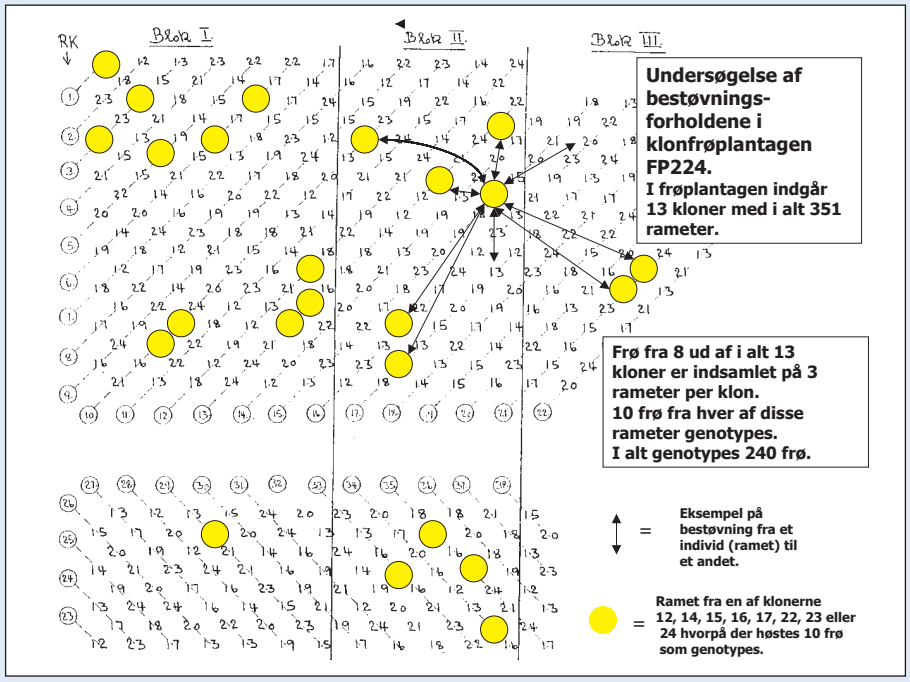
Klonfrøplantager og deres funktion

Klonfrøplantager etableres ved at (plus)træer udvalgt for gode egenskaber som eksempelvis flot klippegrønt, bliver podet op i mange eksemplarer i en allerede etableret kultur. Den etablerede kultur leverer dermed grundstammer, dvs. den nederste del af alle træerne i klonfrøplantagen. De enkelte plustræer kaldes også orteter, og de enkelte individer fra hvert plustræ kaldes rameter. Tilsammen udgør alle podninger fra hvert plustræ én klon, idet de jo har nøjagtig ens sammensætning af DNA, dvs. samme genotype. Princippet i etableringen af en klonfrøplantage ses illustreret i figur 1 .

Ideen med klonfrøplantager er at plustræerne, der er udvalgt for gode egenskaber, får mulighed for at producere et stort kvantum frø via de mange rameter. Frøet kan så bruges af juletræsdyrkeren som derved får glæde



Figur 1. Princippet bag anlæggelse af en klonfrøplantage (blå pile) og sideløbede afkomsforsøg (sorte pile). På baggrund af afkomsforsøgene kan de kloner (plustræer) der giver de færreste og/eller dårligste juletræer fjernes fra frøplantagen (røde kryds). Frøplantagens formål er at producere frø der giver mange gode juletræer – illustreret ved den store pil yders til højre i figuren.



Figur 2. Kort over klonfrøplantagen FP224, Randbøl. På kortet er indtegnet de 24 rameter (3 fra hver af 8 kloner) hvorpå der blev høstet frø. Faderen til 10 frø fra hver af de 24 rameter blev bestemt ved hjælp af mikrosatellitter.

af de gode egenskaber ved plustræerne.

Samtidig med afskæring af podekviste fra plustræerne til klonfrøplantagen kan der høstes frø, og frøplanterne herfra kan plantes ud i afkomsforsøg (nederste venstre del af figur 1). Derved kan der opnås flere ting:

1) De forskellige kloner (plustræer) kan sammenlignes og rangordnes, hvilket ikke er muligt hvis man kun betragter de oprindelige plustræer, der jo kun består af ét individ og som typisk vokser under vidt forskellige forhold. De dårligste træer kan da efterfølgende hugges væk fra klonfrøplantagen, så kun de bedste tillades at bidrage til frøhøsten. Med andre ord foretages der en selektion.
2) Ud fra afkomsforsøgene kan gevinsten ved den førnævnte selektion estimeres ved beregninger. Jo flere af de lavest rangerende kloner der hugges væk, jo større er gevinsten. Beregningerne for selektionsgevinsten bygger på nogle antagelser, bl.a. at træerne i afkomsforsøgene er halvsøskende, altså samme mor, men forskellig far.

Undersøgelse af pollenbidraget i klonfrøplantagen FP224

For at undersøge hvem der rent faktisk er fædre til frøhøsten i en dansk nordmannsgranklonfrøplantage høstedes kogler i frøplantagen FP224, Randbøl Statsskovdistrikt, i efteråret 2002. Frøplantagen indeholder 13 kloner, og har i alt ca. 350 rameter – se figur 2. Hver klon er repræsenteret med mellem 26 og 30 rameter, på nær to, som kun har 20 og 21 rameter. Overordnet set er klonerne altså meget ligeligt repræsenteret i frøplantagen.

De spørgsmål som undersøgelsen søgte at besvare var:

1) Afspejles klonernes ligelige repræsentation i forhold til antal rameter også i hvem der rent faktisk bliver fædre til frøhøsten? Eller er der nogle få kloner der er far til det meste frø?
2) I hvor høj grad sker der selvbestøvning i en nordmannsgranfrøplantage, og er der forskel i klonernes evne til at selvbestøve?
3) Sker der en bestøvning fra træer der ikke befinder sig i frøplantagen – altså er der en udefra kommende 'pollenforurening'?

For at imødekomme ovenstående spørgsmål blev der taget frø fra 3 rameter af hver 8 forskellige kloner – 24 træer i alt. For 10 frø fra hver af disse – 240 frø i alt - blev faderen der havde bestøvet hunkoglen bestemt ved brug af mikrosatellitter (figur 2).

Udover at bestemme det genetiske fingeraftryk og dermed faderskabet for frøet, afprøvedes mikrosatellitterne også som værktøj til at bestemme klon-identiteten. Fra 49 rameter (3 eller 4 per klon) blev der ekstraheret DNA og lavet mikrosatellitanalyse. Rameter fra samme

Tabel 1. Fordelingen af fædre mellem de 13 kloner, dvs. pollen-donorer, til frøene fra de 8 kloner hvorpå der er indsamlet. Resultaterne er givet i procent. De skraverede tal angiver selv-bestøvede individer.

kloner	% rameter*	C12-♀	C14-♀	C15-♀	C16-♀	C17-♀	C22-♀	C23-♀	C24-♀	Gns.
C12-♂	5,7	**0,0**	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C13-♂	8,5	6,7	6,7	0,0	0,0	0,0	7,1	0,0	0,0	2,6
C14-♂	5,9	0,0	**0,0**	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C15-♂	7,4	0,0	0,0	**0,0**	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C16-♂	8,2	36,7	16,7	39,3	**32,1**	39,3	50,0	53,3	63,3	41,3
C17-♂	7,6	0,0	3,3	7,1	3,6	**0,0**	3,6	0,0	3,3	2,6
C18-♂	7,9	6,7	0,0	0,0	3,6	3,6	0,0	6,7	0,0	2,6
C19-♂	8,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20-♂	8,5	0,0	0,0	3,6	0,0	3,6	0,0	0,0	0,0	0,9
C21-♂	8,2	3,3	6,7	7,1	10,7	3,6	0,0	0,0	6,7	4,8
C22-♂	8,2	13,3	26,7	10,7	28,6	25,0	**10,7**	10,0	16,7	17,7
C23-♂	7,6	10,0	6,7	7,1	3,6	0,0	17,9	**3,3**	3,3	6,5
C24-♂	7,9	23,3	26,7	21,4	14,3	17,9	3,6	23,3	**3,3**	16,7
Forurening†	-	0,0	6,7	3,6	3,6	7,1	7,1	3,3	3,3	4,3
Sum	**100,0**	**100,0**	**100,0**	**100,0**	**100,0**	**100,0**	**100,0**	**100,0**	**100,0**	**100,0**

* Den procentvise andel som klonens rameter udgør af det samlede antal rameter (=træer) i klonfrøplantagen.
† Forurening = pollenforurening, dvs. pollen som er kommet ind i klonfrøplantagen udefra.

klon skal have nøjagtig samme genetiske fingeraftryk, forskellige fingeraftryk er tegn på at der er sket en fejl i podningen og/eller der er sat et forkert skilt på træet. Mange fejl af denne type vil være uheldige når der skal laves de førnævnte tyndinger, hvor de dårligste kloner hugges væk. Hvis skiltningen ikke stemmer overens med virkeligheden risikerer man jo at hugge de bedste kloner væk og lade nogle ringere blive stående til frøproduktion.

Resultater

Resultaterne af faderskabsanalysen er vist i tabel 1. Pollenbidraget fra hver af de 13 kloner (altså hvem de er far til) er her givet som procent af det samlede antal frø fra de 8 kloner hvor der blev samlet frø. I yderste kolonne ses hvor meget de 13 kloner bidrager som fædre i den totale frøhøst. Hovedresultaterne er også vist grafisk i figur 3. De skraverede tal i tabel 1 angiver selv-bestøvede individer, altså hvor en klon er fader til frø høstet på dens egne rameter.

Det slående billede fra tabel 1 og figur 3 er den store ubalance mellem klonerne med hensyn til deres andel som fædre i frøhøsten. Mest iøjnefaldende er klon C16 som er fader til hele 41,3 % af samtlige undersøgte frø, selvom den kun udgør 8,2 % af rameterne i frøplantagen. Anden- og trediestørste bidragsydere er klon C22 (17,7 % af afkommet) og klon C24 (16,7 % af afkommet). Samlet set står disse tre kloner som fædre til over 75 % af frøhøsten, mens de kun udgør omkring 24 % af rameterne i frøplantagen. I den anden ende af dette ubalancerede spektrum er der 4 kloner som slet ikke er fædre til noget afkom (C12, C14, C15 og C19) og de resterende 6 kloner bidrager kun med mindre end 5 %, på nær klon C23 med 6,5 % af afkommet.

Den højst ubalancerede fordeling af pollenbidrag er klart uønsket for nordmannsgran, hvor en oplagt mulighed er at anlægge klonfrøplantager med et lille antal kloner.

Selvbestøvning blev observeret for 4 af 8 kloner hvorpå der blev høstet frø (tabel 1), men de kloner hvor der ikke var selvbestøvning, C12, C14, C15 og C17, havde ikke noget afkom, og resultaterne siger derfor ikke noget om nordmannsgranens evne til selvbestøvning. Undersøgelse af selvbestøvning var kun mulig i de resterende 4 kloner.

Det generelle billede viste at procentdelen af selvbestøvere var lavere end den procentdel som klonen bidrager med i den samlede høst. Eksempelvis var klon C24 fader til 16,7 % af det samlede frøafkom, mens den kun var far til 3,3 % af frøene høstet på klon C24. Tendensen til selvbestøvning varierer dog ret meget mellem klonerne, således er klon C16's andel af selvbestøvere, 32,1 %, ikke meget lavere end dens samlede andel på 41,3 % af afkommet.

En frøplantage med kun 4-5 kloner skulle helst ikke indeholde for mange kloner med samme tendens til selvbestøvning som C16, idet en uforholdsmæssig stor andel af frøhøsten så ville være selvbestøvede, med deraf følgende risiko for dårlig vækst pga. indavl. Det skal understreges at effekten af indavl endnu ikke er undersøgt i nordmannsgran, men tidligere udenlandske undersøgelser på andre arter viser næsten altid en negativ effekt af selvbestøvning og indavl i nåletræer – se f.eks. Videnblade Pyntegrønt nr. 3.2-9.

For 4,3 % af afkommet kunne der ikke findes en fader blandt de 13 kloner i frøplantagen, og pollen må derfor være kommet ind fra de omgivende skove. Udenlandske undersøgelser har ofte fundet en pollenforurening på over 50 % i klonfrøplantager med nåletræer, så i den sammenhæng lyder 4,3 % ikke af meget. Omvendt var det heller ikke forventet at finde meget pollenforurening i FP224, idet der ikke findes andre nordmannsgraner eller -arter som kan bestøve nordmannsgran i skoven hvor frøplantagen befinder sig.

Kontrollen af klonidentitet på de 49 udvalgte rameter, inklusive de 24 rameter hvorpå der blev høstet frø, viste ingen tilfælde af forskelligt genetisk fingeraftryk mellem rameter fra den samme klon. Dermed kunne der altså ikke registreres nogen pode- eller skiltningsfejl i denne stikprøve, som udgjorde ca. 14 % af alle træer i plantagen (49 ud af 351).

Konklusion og diskussion

Mikrosatellitter viste sig at være et yderst nyttigt værktøj til at bestemme det fædrene ophav til frøhøsten i en nordmanns-

ABIES frø

Høstområder og frøkvalitet:

- Fri for al tvivl om herkomsten i nordmannsgran – egne *udvalgte og præcist* afgrænsede indsamlingsområder i Georgien, – Ambrolauri og Borshomi, samt i Rusland, – Arhyz og Apsheronsk. Og vi er til stede under høsten hvert år.

Åbenhed, faglig udvikling og dokumentation:

- *Herkomstspecifikation af frøet på afdelingsniveau*, nu bakket op af GPS-baserede indsamlingsregistreringer – det forbedrer dokumentationen af et planteparti.
- *Kvalitetssikring af hele vores proces* fra koglehøst i Georgien til forbehandlet frø til kunder i Vesteuropa – gør os bedre og giver endnu større gennemsigtighed.
- *Proveniensafprøvninger*, især "Frost Frø"-forsøget i nordmannsgran – de første resultater kom i 2004 og 2006 bliver året med den store opgørelse af resultaterne af dette unikke afprøvningssæt.
- *Konsekvent opfølgning på ny forskning,* – bl.a. gennem herkomstsikker markedsintroduktion af lovende provenienser, senest Arhyz / Nordkaukasus.

Fokus 2005-06:
– Kvalitetssikring –
Resultater fra NGR-forsøget

Specialister i Nordmannsgran og Nobilis

HØST – KLÆNGNING – FORBEHANDLING – OPBEVARING

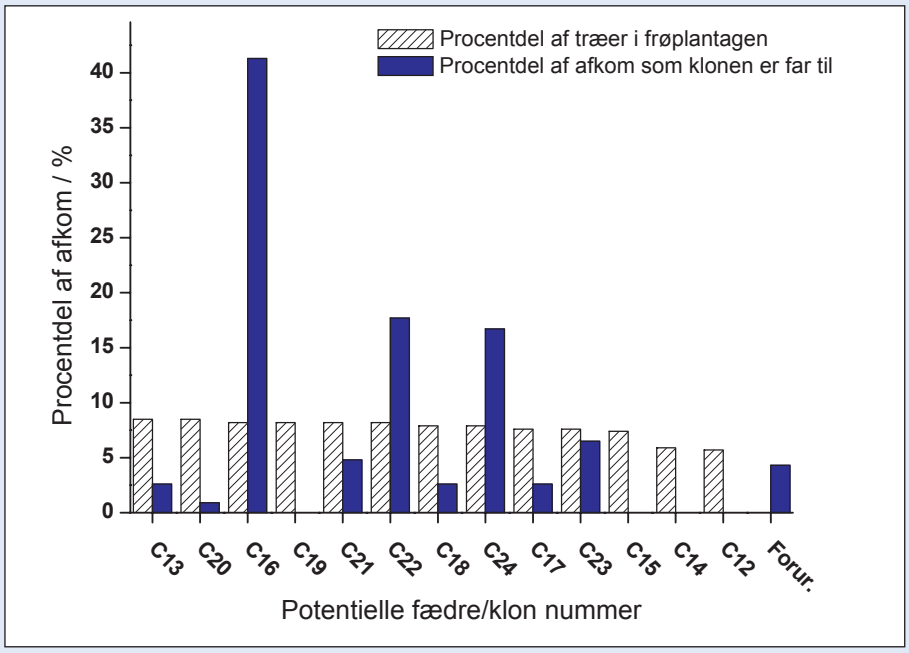
ABIES Frø ApS
tel (+45) 7021 0515 · fax (+45) 7021 1218 · mobil (+45) 4010 3834
e-mail: abies@abies.dk

ASM
En vifte af muligheder

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.

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 • Pallegafler
Transportvogn • Spidser • 1-armet sprøjtebom
Ny stærk 1 rækket plantemaskine til plantning mellem stød
NYHED Pælehammer, hydraulisk



Figur 3. Pollenbidrag til afkom (mørke søjler) og klonernes andel af frøplantagens rameter (skraverede søjler) – begge i procent. Klonerne er sorteret med faldende rametantal. Forur.= pollenforurening, dvs. pollen som er kommet ind i klonfrøplantagen udefra.

granklonfrøplantage. Pollenbidraget fra de 13 potentielle fædre (kloner) var meget ubalanceret, selvom de var næsten ligeligt repræsenteret med antal rameter. Tre kloner var fædre til over 75 % af frøet, og fire kloner var slet ikke fædre. Forskellige kloner viste sig at have forskellig tendens til selvbestøvning, og det er helt klart et emne der ikke kan ignoreres hvis man påtænker at lave klonfrøplantager med et lavt antal kloner (eks. 4-5 stykker). Udefra kommende pollen var et mindre problem i FP224.

På *Skov &' Landskab* håber vi at få mulighed for at arbejde videre med anvendelsen af mikrosatellitter, idet der er mange interessante problemstillinger som kan belyses med disse teknikker. Blandt andet er det undersøgt hvor villigt ædelgran og nordmannsgran hybridiserer. Teknikkerne kan også bruges i frøavlsbevoksninger, og det er nærliggende at anvende dem i eksempelvis nobilis, som jo p.t. er en større frøproducent i Danmark.

Tak til Skovfoged Viggo Jensen, *Skov & Landskab* – KVL, for indsamling af kogler, til Statsskovenes Planteavlsstation for håndtering af frø og til laborant Merete Linnet for DNA-ekstraktioner fra frø.

Supplerende litteratur

Hansen, O.K & Kjær, E.D (2006) Paternity analysis with microsatellites in a Danish Abies nordmanniana clonal seed orchard reveals dysfunctions. Canadian Journal of Forest Research (In press).

Scan-Sprayer Tågesprøjte
- sprøjter dine juletræer bedst !!

Frantz Norre, Compac Sjælland har haft gode erfaringer med sin Scan-Sprayer Tågesprøjte; "Som skoventreprenør kender jeg vigtigheden af at kunne udføre rigtig kvalitetsarbejde."
"Med min Scan-Sprayer har jeg nu i 3 sæsoner foretaget effektive sprøjtninger på flere hundrede hektar juletræer årligt.
Den meget kraftige blæser formår at sprøjte helt ind i kulturen og give en rigtig god dækning" udtaler Frantz og fremhæver tillige den kraftige konstruktion og høje driftssikkerhed.
Scan-Sprayer Tågesprøjter fås som liftsprøjte op til 1.000 liter og trailersprøjte op til 3.000 liter med udblæsning til én side, Twin til begge sider eller som svingbar. Sprøjter op til 55 meter vandret og 25 meter lodret.

Scan Xtra
Scan-Agro
SAME · LAMBORGHINI
9560 Hadsund · +45 96 52 06 00
4100 Ringsted · +45 57 66 00 30
www.scan-agro.dk info@scan-agro.dk

Grundstammer
Løvtræer
Skovplanter
Blomstrende hække
Grønne hække
Bunddækkeplanter
Nåletræer
Pyntegrønt
Juletræer
Taks til hæk
Thuja barrods til hæk
Thuja i bakker/18 stk.

www.akkerup.dk
mail@akkerup.dk

Tlf. 64 73 10 58
Fax 64 73 31 58

Akkerup Planteskole
5683 Haarby
Vi ekspederer fra dag til dag

De er velkommen til at rekvirere vores sortimentsliste