



Genomics gør sit indtog i juletræsforskningen

– bestemmelsen af hele arvemassen for *Neonectria*-svampen

Genomics er en engelsk betegnelse for videnskabelige studier, der inddrager den totale arvemasse af en organisme, og er af teknologiske årsager en relativt ny disciplin. Ikke desto mindre er juletræsforskningen nu trådt ind i denne æra, idet et projekt har kortlagt den totale arvemasse af svampen *Neonectria neomacrospora*. Artiklen fortæller om baggrunden, udkommet og perspektiverne i dette arbejde.

Boks 1: Ordforklaring

DNA = deoxyribonukleinsyre (engelsk: Deoxyribo-Nucleic Acid) – den biokemiske betegnelse for de molekyler, som indeholder en organismes gener.

Baser = i DNA-molekylerne indgår blandt andet nogle baser. Der er fire forskellige typer, ofte betegnet A, C, G og T. Det er rækkefølgen af disse fire baser ("bogstaver"), der bestemmer, hvilke gener og dermed arveanlæg en organisme har.

Genom = den samlede mængde af DNA, der findes i en organisme. Det bliver målt i antal basepar.

Sekventere = den arbejdsmetode hvor man bestemmer baserne i et stykke DNA eller i et helt genom.

Af Ole K. Hansen & Knud Nor Nielsen

Institut for Geovidenskab og Naturforvaltning (IGN) - Københavns Universitet

Indledning

På Institut for Geovidenskab og Naturforvaltning (IGN) forsker vi i svampen *Neonectria neomacrospora*, som i de senere år er dukket op som en alvorlig skadevolder på *Abies*-arterne i Nord-europa (Nåledrys nr. 85).

En del af dette arbejde er at undersøge svampens populationsgenetik, da det er usikkert, dels hvor svampen stammer fra, og dels om der er én eller flere varianter (populationer) af svampen, som potentielt varierer i hvor aggressivt de angriber træerne. Hvis svampen har stor genetisk variation, er der også større sandsynlighed for at den vil udvikle sig hurtigt, det vil sige vil kunne tilpasse sig og danne nye typer. Udgangspunktet for arbejdet er således, at vi må kende vores "fjende" for at kunne give gode anvisninger på en fremtidig bekæmpelsesstrategi.



◀ Døde skudspidser som følge af *Neonectria*-angreb. Arten er *Abies lasiocarpa*. Foto: Ole K. Hansen.

DNA-teknikker er i en rivende udvikling, og det er indenfor de senere år blevet teknisk og økonomisk overkommeligt at foretage en komplet beskrivelse af en organismes arvemasse. Det kaldes en fuld-genom sekventering.

For 15 år siden blev det fulde menneskelige genom på cirka 3 milliarder basepar kortlagt for første gang. Det blev estimeret at have kostet omtrent 1 US dollar per basepar. I vore dage er det imidlertid muligt for en overkommelig sum penge at få bestemt alle baseparrene i en hvilken som helst organisme – specielt for dem med mindre genomer – såsom svampe. En sådan fuld-genom sekventering muliggør både udvikling af DNA-markører samt populationsgenetiske studier, der vil være værdifulde for vores arbejde med svampen.

Metoder

Bestemmelse af den totale arvemasse for en organisme sker nu stort set altid via et såkaldt sekventeringscenter, hvor man køber sig til den specifikke ydelse man skal bruge – her aflæsning af DNA-koden. Det er så dyre apparater og kræver så stor rutine og know-how, at det normalt ikke er muligt for de enkelte forskningslaboratorier at gøre det selv. Hvordan det specifikt blev gjort er bekræftet i boks 2.

Boks 2: Teknisk – hvordan bestemte vi hele arvemassen i *Neonectria neomacrospora*

Der var to forudsætninger for en succesfuld kortlægning af arvemassen i *Neonectria neomacrospora*. For det første skulle vi sikre, at vi kun bestemte arvemassen fra et enkelt individ, og for det andet skulle vi sikre en tilstrækkelig mængde DNA af høj kvalitet. Det opnåede vi ved at isolere sporer fra en inficeret nordmannsgran, spire en enkelt spore og opformere denne, først på fast medium, og efterfølgende i flydende medium.

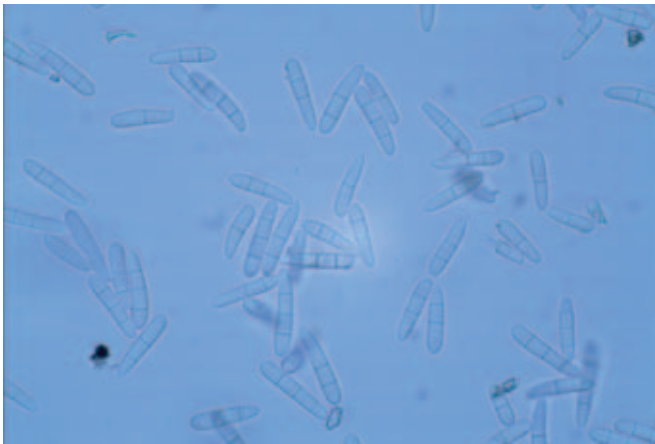
Det opformerede svampevæv, myceliet, blev oprenset fra det flydende medium, og vævets DNA blev ekstraheret. DNA blev derefter sendt til et sekventeringscenter ved Duke Universitetet i USA, hvor selve sekventeringen fandt sted. Der blev anvendt en PacBio RSII platform (figur 1). Maskinerne (for eksempel PacBio RSII) "aflæser" DNA-sekvensen, altså lange kæder af de fire baser, der udgør DNA-koden (A, C, G og T – se boks 1).

Under ekstraheringen af DNA fragmenteres dette i mindre stykker, ligesom en bog, hvor siderne rives ud. Sekventeringsmaskinen kan ikke selv holde styr på, hvilke sider den har læst, og for at være sikker på, at den får læst hele bogen, og for at sikre at den ikke har læst et eneste ord forkert, læses hvert fragment, hver base, mange gange.

Neonectria har et genom på 40 millioner basepar, men vi fik et output på over 11 milliarder basepar. Det betyder, at hvert basepar gennemsnitligt blev aflæst 275 gange. Denne høje dækningsgrad sikrer altså mod aflæsningsfejl og mangler.

Data fra sekventeringen kommer i såkaldte "reads" – det vil sige sekvensaflæsninger af sammenhængende baser. De 11 milliarder baser er således samlet i større fragmenter.

For at fastlægge det fulde genom er det altså ikke et puslespil med 11 milliarder brikker, der skal samles, men i vores tilfælde "kun" 925.000 reads, på gennemsnitligt cirka 12.000 baser. Ikke desto mindre kræver det nogle muskuløse computere med det rigtige software til at samle de mange fragmenter i den rigtige rækkefølge. I vores tilfælde består det fulde genom nu af 183 DNA-sekvenser, der tilsammen udgør godt 40 millioner basepar, og hvor det største sammenhængende stykke er 5,1 millioner basepar langt.



Konidiesporer fra *Neonectria neomacrospora*. En enkelt af disse sporer blev isoleret og dannede baggrund for den senere bestemmelse af den fulde arvemasse for svampen. Foto: Jing Xu



Sekventeringsplatformen PacBio RSII som blev brugt til at sekventere det fulde genom for svampen *Neonectria*. Dette skete ved Duke Universitetet i North Carolina, USA.

Resultater og perspektiver

Genomet for *Neonectria neomacrospora* har vi estimeret til at bestå af cirka 40,2 millioner basepar, hvilket stemmer godt overens med størrelsen på genomer for svampe generelt.

To forskellige forskergrupper har sekventeret genomet for den nærtbeslægtede *Neonectria ditissima*, som giver æblekræft. De fandt genomstørrelser på henholdsvis 45,7 millioner og 43,6 millioner basepar, og svampenes genomer er således cirka 65-70 gange mindre end menneskets genom.

Hvorledes kan vi så bruge kendskabet til de godt 40 millioner basepar?

- Udvikling af en test til at bestemme om en plante er inficeret med *Neonectria*.
- Beskrive den genetiske variation i svampen, indledningsvis i Danmark.

- Indkredse hvor i verden svampen stammer fra, og om den er introduceret skadevolder. Det fulde genom kan anvendes som et såkaldt reference-genom, hvilket gør processen med sekventering af individer fra andre dele af verden både lettere og billigere. Eksempelvis individer fra det vestlige USA, Canada og Centraleuropa.
- Identifikation af de mekanismer, der gør, at svampen angriber *Abies*-træerne.

Tak

Tak til *Neonectria*-initiativet for støtte til projektet i form af 32.000 Kr. ■



Er din gødningssammensætning rigtig?



Behovsbaseret gødskning

Triwi Gødning er specielt sammensat efter nordmannsgrans næringsbehov

15 - 4 - 10 (+ 5 S + 3 Mg):	15 - 4 - 13 (+ 9 S + 2 Mg):	13 - 1 - 4 (+ 9 S + 8 Mg):
15 Kvælstof	15 Kvælstof	13 Kvælstof
4 Fosfor	4 Fosfor	1 Fosfor
10 Kali	13 Kali	4 Kali
5 Svovl	9 Svovl	9 Svovl
3 Magnesium	2 Magnesium	8 Magnesium

Triwi Gødning fås som: Sække á 20 kg, palle max. 60 sække = 1.200 kg. Big Bag 600 kg.

Husk Optimin og Opti N til frostsikring, nålefylde og nålefarve.



Dosering forår
250 liter vand +
10 liter Optimin +
10 liter Opti N



Gl. Skivevej 91 · 8800 Viborg
T: 87 281 281 · F: 87 281 291
hd2412@hd2412.dk · www.hd2412.dk

Skovudstyr · alt til juletræer