

# GENETISKE MARKØRER I SKOVTRÆFORÆDLINGEN

af

HUBERT WELLENDORF

Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole, Arboretet  
2970 Hørsholm

*Key words: Isoenzymmer, markørgener, genomkortlægning,  
DNA-markører, QTL, Picea abies, Picea sitchensis.*

## Indledning

I de senere år har udviklingen inden for biokemisk genetik og molekylærgenetik medført, at man i forstgenetik og skovtræforædling har haft adgang til at arbejde med et stigende antal markørgener. Disse markører har enten været primære genprodukter, d.v.s. proteiner i form af isoenzymer eller direkte informationsstumper på DNA strengen, i sidste ende forårsaget af forskelle i nukleotide sekvenser i DNA molekylet.

Fælles for disse markørgener er, at de opfører sig som klassiske Mendelske gener, der viser dominans eller co-dominans, og at de er rimeligt tilgængelige med forholdsvis simple laboratorieprocedurer og derfor kan anvendes som værktøj til løsning af forskellige problemstillinger indenfor forstgenetik og skovtræforædling.

Markørgenerne har, som navnet antyder, ikke eller kun rent tilfældigt nogen direkte målelig effekt på træernes fænotype – man bruger betegnelsen, at de er neutrale m.h.t. fitness og øvrigt forstligt interessante egenskaber omkring sundhed, produktion og kvalitet.

Ved Arboretet i Hørsholm har vi siden 1975 været interesseret i disse markører. I begyndelsen blev et samarbejde om isoenzymer etableret med Genetisk Institut ved Århus Universitet (Simonsen og Wellendorf 1975; Poulsen, Simonsen og Wellendorf 1983).

Siden blev der i 1984 etableret et isoenzym-laboratorie i forbindelse med Arboretets nybyggeri, og selvstændig forskning blev sat i gang. Først gennem en bevilling fra Hofmangsgave Fonden til et projekt om anvendelse af isoenzym-markører i skovtræforædling, proveniensforskning og herkomstkontrol, siden gennem et i 1991 bevilliget Forskningsråds-finansieret projekt om identifikation af DNA-markører i rødgran, velegnet til genomkortlægning. Endvidere har Landbohøjskolen i 1992 bevilget et ekstraordinært 4-årigt adjunktur til Arboretet i biokemisk genetik inden for skovtræer, og et ph.d.-projekt er sat i gang i samarbejde med DANIDA Skovfrøcenter's proveniens-afrøvning om

undersøgelse af genetisk variation inden for og imellem populationer af teak.

### **Isoenzymmer**

Det oprindelige projekts titel – anvendelse af isoenzym-markører i skovtræforædling, proveniensforskning og herkomstkontrol – pegede på en bred vifte af problemstillinger. I den indledende fase af projektet blev der etableret internationale kontakter til Sverige, Norge og Tyskland. Under dette arbejde kom vi i kontakt med en gruppe ved Stockholms universitet, der direkte arbejdede med proveniens-kortlægning i rødgran. Vi indgik en aftale med denne gruppe om kun at søge at supplere deres undersøgelser med nogle få populationsprøver fra granens sydøstlige udbredelsesområde i Karpaterne. Siden har de publiceret deres meget omfattende kortlægning af 70 naturlige rødgranproveniensers populations-genetiske parametre, der for hver proveniens udtrykker både genetisk diversitet og forekomst af indavl. Hovedresultaterne af deres undersøgelser (Lagercrantz & Ryman 1990) er

- at langt hovedparten af den genetiske variation hos isoenzymerne ligger inden for provenienserne, ikke imellem.
- at det imidlertid er muligt ved hjælp af multivariate analyser af allelhypighederne i de 16 polymorfe loci de havde til rådighed, at skelne mellem granens hovedudbredelsesområder, de centraleuropæiske bjergområder, nord-øst udbredelsen og den Skandinaviske halvø,
- at populationerne i det central-europæiske område viser mindre genetisk diversitet end de øvrige områder,
- at der generelt kun er svage tendenser til indavl i de undersøgte 20-årige populationer.

### **Frøplantage-undersøgelser**

Inden for projektets rammer er der i en norsk frøplantage udført en meget omfattende undersøgelse af et blomstringsår i rødgran. Denne blev valgt, fordi der det pågældende år – 1985 – ikke var blomstring i Danmark. Undersøgelsen omfattede blomstrings-iagttagelser i felten, materialehøst – frø og knopper – samt elektroforetisk analyse af isoenzymer hos forældre-kloner og deres afkom. Det store observationsmateriale blev populationsgenetisk bearbejdet og afleveret som speciale-arbejde ved Københavns Universitet (Skov 1987).

Sideløbende er der i USA, Australien, Sverige og Finland udarbejdet en del lignende undersøgelser, der i Sverige og Finland har ført til den

smertelige erkendelse, at sydlige frøplantager i skovfyr kan have op til 50-60% fremmedbestøvning, hvad der specielt for nordlig udvalgte plustræ-kloner medfører nedsat frostresistens i deres frøplantage-afkom (Harju and Muona 1989, Wang et al. 1988).

### **Afkom efter fri bestøvning af plustræer**

Et af de oprindeligt opstillede mål med projektet var afprøvning af hypotesen om, at afkom efter fri bestøvning af udvalgte plustræer er halvsøskende og bestøvet med en repræsentativ pollensky fra den omkringliggende bevoksning – ofte kårede frøavlsbevoksninger. Dette er forudsætningen for, at avlsværdier for modertræet inden for de gængse frøavlsbevoksninger kan estimeres ud fra afkommets fænotype, kombineret med en populationsprøve fra den pågældende frøavlsbevoksning. Denne forsøgsopstilling er anvendt i ret stor målestok i det danske rødgran-forædlingsprogram (Wellendorf 1989).

Til analyse af denne problemstilling blev fremskaffet frø efter fri bestøvning af 82 plustræer, valgt i 31 danske frøavlsbevoksninger. Disse afkom er allerede etableret i feltforsøg på 2-4 lokaliteter i forskellige dele af landet og indgår således i det løbende skovtræforædlingsprogram i rødgran.

Ud af dette overvældende materiale blev der gennemført elektroforese af 6 isoenzym-systemer i 6 udgangspopulationer og 22 plustræ-afkom. P.g.a. nåletræfrøets specielle opbygning er det muligt at iagttage markør-generne, både i moderens haploide væv, i frøhviden og i afkommet, d.v.s. i kimen. Dette indebærer, at det for kimens vedkommende er muligt at skelne mellem hvilket allel, der er moderens bidrag, og hvilke der er faderens. Herved muliggøres en bestemmelse af allelhyppigheder i den befrugtende pollensky for den mængde frø, der samles fra hvert enkelt modertræ.

En brand på Arboretet i februar 1992 ødelagde imidlertid det meste af dette datamateriale og hele frølageret. Kun observationerne fra 4 plustræer, valgt i een af de 6 bevoksninger, er intakte.

### **Klon-identitet og kontrolsystemer**

Et specielt perspektiv er klon-identifikation. Dette er i princippet en enklere opgave end studier af bestøvningsforhold – og yderst relevant som kontrolfunktion i den praktiske skovtræforædling. Erfaringerne har vist betydelig variation mellem rødgran-klonernes genotyper m.h.t. markørerne og betydeligt mere i det norske materiale end i det danske af mellemeuropæisk oprindelse. Dette bekræfter den tidligere refererede undersøgelse af Lagercrantz og Ryman (1989) om større diversitet i Skandinavisk end i mellem-europæisk rødgran.

I den danske skovtræforædling må det siges at være muligt og stærkt ønskeligt med et sådant kontrolsystem, selv i rødgran af mellemeuropæisk oprindelse.

### **Heterozygotigrad som indikator for fitness og forstligt interessante egenskaber**

Flere tyske undersøgelser har peget på en sammenhæng mellem heterozygoti-grad og fitness-karakterer, som f.eks. sundhed under stress, specielt i bøg (Müller-Starck and Ziehe 1991).

I en undersøgelse af isoenzymer i individuelle rødgraner, der viste forskellige grader af udtørringsskader i en typisk vestrand på let jord i Jylland (Henrik Saxe, personlig meddelelse), har vi ikke fundet blot antydning af noget sådant. I et stiklingeformeret klon-materiale i rødgran er vi i gang med at undersøge, om der er sammenhæng mellem isoenzymer, herunder heterozygotigrad, og vækst, stabilitet og sundhed, udtrykt i en serie på 5 parallel-forsøg i meget forskellige miljøer i Danmark.

### **Sammenfattende om isoenzymer**

Sammenfattende må man om isoenzymer som markør-gener sige, at en ulempe ligger i, at der kun foreligger et begrænset antal let tilgængelige polymorfe systemer. Ifølge vore erfaringer i rødgran er størrelsesordenen 6 systemer, hver med 1-3 gen-loci repræsenteret. Disse systemer er velegnede til klonidentifikation, bestemmelse af allelhyppigheder af befrugtende pollenskyer samt til estimering af udkrydsningsrater, indavlskoefficienter og tildels genetisk diversitet. Derimod er de ikke specielt velegnede til at adskille provenienser fra hinanden, idet den største variation i disse neutrale markør-gener ligger inden for provenienserne. Helt utilstrækkelige er de til en tættere genom-kortlægning af f.eks. granens kromosomer med markør-gener med henblik på at finde kobling til de gen-loci, der styrer kvantitative egenskaber, som f.eks. vores forædlingsmål.

### **DNA-markører**

Dette er baggrunden for vor interesse for DNA-markører. Siden ca. 1980 er der sket en kraftig udvikling i DNA-teknologien, der også har medført, at en række DNA-markørere er blevet lettere tilgængelige. En teknik som RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) har muliggjort tætte kortlægninger af genomet i kommercielt vigtige afgrøder, f.eks. majs og tomat.

Siden 1988 har en gruppe under USDA Forest Service i Californien arbejdet med genom-kortlægning af *Pinus teada* og douglas-gran ved

hjælp af denne teknik. Målet er dels at studere skovtræernes genetiske mekanismer grundvidenskabeligt (Neale and Williams 1990), dels at prøve at spore kobling mellem de mange markører (200-400 med en gennemsnitlig indbyrdes afstand på 10-25 CM) og de egenskaber, der er interessante for skovbruget, f.eks. resistens mod sygdomme og klimaekstremer, vækst og kvalitetsegenskaber. Senere er der udviklet en væsentlig lettere tilgængelig teknik – RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), som kun har den ulempe, at her er der fuld dominans (Williams et al. 1990).

Arboretet har et forskningsrådsfinansieret projekt i gang, hvor vi i rødgran prøver at identificere DNA-markører, velegnede til tæt genomkortlægning. Laboratorie-arbejdet er påbegyndt på Risø, men ønskes senere overført til Arboretet. Det viste sig ret hurtigt, at RAPD ser ud til at kunne udvikle sig til det ønskede redskab – og vi er i nær kontakt til 3-4 grupper i USA og Canada. I det sydøstlige USA og i Australien har man været pionér på dette område og har allerede udarbejdet genomkort, omfattende 200-300 markører hos *Pinus teada*, *P. elliotti* og *P. radiata* og et lignende antal hos de to *Eucalyptus*-arter, *E. grandis* og *E. europphylla*. Sidstnævnte kort er udarbejdet ud fra en F1-hybrid mellem de to arter (Grattapaglia and Sederoff 1992).

I vores hjemlige projekt er vi allerede på sporet af ca. 200 genloci, der afventer udspaltnings- og rekombinationsanalyse for at fastlægge deres indbyrdes koblingsforhold.

### **Kobling til gen-loci, der styrer kvantitative egenskaber**

På grundlag af disse første kort over markørgenernes liniære placering på kromosomerne er jagten på QTL (Quantitative Trait Loci) gået ind. Der er udarbejdet flere alternative forsøgsoplæg. I princippet kan man enten prøve at spore velegnede stamtavler i 2 eller bedre i 3 generationer og samtidig registrere markører og de kvantitative egenskaber, man er interesseret i – eller man kan etablere nye forsøg, specielt dimensioneret til formålet. Et vigtigt hjælpemiddel er her kloning af enkeltindivider inden for krydsningsfamilierne, idet effekten af tilfældige kårpåvirkninger hermed formindskes, og de enkelte genotyper kan fastholdes og studeres nærmere, f.eks. i phytotronforsøg og i gentagne feltforsøg i forskellige miljøer.

I vores gruppe har vi udarbejdet en sådan plan for en forsøgsserie, hvor vi gør følgende: Etablerer reciprokke krydsninger, vælger forældre og markører således, at flest mulige tilbagekrydsningssituationer forekommer i afkommet, spirer frøene og bevarer frøhviden til afdækning af moderens bidrag til afkommet, kloner afkommene ved stiklingeformering, klonbedømmer de enkelte kloner for 3 kvantitative egenska-

ber, der har vist sig relevante over en omfrift, foretager en 2-vejs selektion for disse 3 egenskaber og kortlægger de enkelte forældretræer m.h.t. markørerne. Den afgørende »co-segregation«-analyse mellem markører og kvantitative egenskaber må foretages afgrænset for hver af forældretræernes kønscellebidrag, idet disse sammenhænge, der afspejler cis-trans konfigurationen mellem allelerne i de respektive genloci, veksler fra individ til individ. Vore granpopulationer er ret stærkt heterozygotiske, udkrydsende og må formodes at være i koblingslige-vægt. Denne plan blev fremlagt som poster-bidrag ved den nylig afholdte kongres om plantegenomet – Plant Genome I i San Diego i USA i november 1992 (Skov og Wellendorf 1992). Alternative planer går ud på kun at studere moderens bidrag til afkommets kvantitative egenskaber – fader-bidraget gøres til gengæld så bredt som muligt ved at anvende pollenblandinger som repræsentativ stikprøve på de aktuelle avlspopulationer (Wilcox et al. 1992). Herved lægger man sig tæt op ad begrebet »average affect of a gene substitution«, der direkte er baggrunden for avlsværdibegrebet (Falconer 1983).

### **Anvendelse i skovtræforædling**

Hvis det lykkes at indkredse genloci, hvis alleler er i stand til at forklare en væsentlig del af variationen i forstligt interessante egenskaber, står det tilbage til de løbende skovtræforædlingsprogrammer at udnytte dette værktøj.

Motivet for markør-baseret selektion er i skovbruget specielt den tidsgevinst, der kan ligge i at kunne selekttere allerede på embryo-stadiet og i kombination med vævskulturteknik, f.eks. somatisk embryogenese, hurtigt at opformere de selekterede individer. Selvfølgelig skal dette suppleres med phytotron-test og feltforsøg til stikprøvevis kontrol med den udførte selektion, men dette er dog et væsentligt mindre arbejde end som hidtil at udføre al videre selektion på basis af phytotron- og/eller feltforsøg.

Kravet til laboratoriefaciliteter og bemanning er dog ret stort. Et moderne bioteknologisk laboratorium for skovtræer, hvor vævskulturer og DNA-arbejder kunne udføres, er en nødvendighed, både til genomkortlægning med markører, indkredsning af QTL'er og til effektiv massefremstilling af det fremselektede materiale til det stadie, hvor almindelig stiklingeformering kan udføres. Dette er realistiske muligheder for vore to *Picea*-arter, rødgran og sitkagran.

### **Litteratur**

Falconer, D.S., 1983: Introduction to Quantitative Genetics. 2nd edition. London.

- Grattapaglia, D. and Sederoff, R., 1992: Pseudo-testcross Mapping Strategy in Forest Trees: Single Tree RAPD Maps of *Eucalyptus grandis* and *E. europhylla*. Plant Genome I, Nov. 9-11, 1992, San Diego.
- Harju, A. and Muona, O., 1989: Background Pollination in *Pinus sylvestris* Seed Orchards. Scand. Journ. of Forest Research, 4: 513-520.
- Lagercrantz, U. and Ryman, N., 1990: Genetic structure of Norway spruce (*Picea abies*): Concordance of morphological and allozymic variation. Evolution 44: 38-53.
- Müller-Starch, G. and Ziehe, M., 1991: Genetic Variation in Populations of *Fagus sylvatica* L., *Quercus robur* L., and *Q. petraea* Libl. in Germany. In: Genetic Variation in European Populations of Forest Trees. Frankfurt a.M. ISBN 3-7939-0790-2.
- Neale, D.B. and Williams, C.G., 1990: Restriction fragment length polymorphism mapping in conifers and applications to forest genetics and tree improvement. Can. J. For. Res., 21.
- Poulsen, H., Simonsen, V., and Wellendorf, H., 1983: The inheritance of six isoenzymes in Norway spruce (*Picea abies* (L.)Karst.). Forest Tree Improvement 16.
- Simonsen, V. and Wellendorf, H., 1975: Some polymorphic isoenzymes in the seed endosperm of Sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.)Carr.). Forest Tree Improvement 9.
- Skov, E., 1987: Populationsgenetisk undersøgelse i en frøplantage af *Picea abies* (L.)Karst. Specialeopgave ved Botanisk Laboratorium, Københavns Universitet.
- Skov, E. and Wellendorf, H., 1992: Application of RAPD for high density genome mapping and search for linkage to QTL in Norway spruce (*Picea abies*). Plant Genome I, Nov. 9-11, 1992, San Diego.
- Wang, X., Lindgren, D., and Yazdani, R., 1988: Pollen migration into a seed orchard of *Pinus sylvestris* L. and the efficiency of its estimation using allozyme markers. Silvae Genetica – in press.
- Wellendorf, H., 1989: A Danish Norway spruce breeding plan from 1972 – A retrospective review 15 years later. In: Proc. of the IUFRO working party meeting, S.2.02-11 in Sweden 1988. ISSN 0284-4230.
- Wilcox, P.C., Sederoff, R., Chaparro, J., Grattapaglia, D., Weir, B.S., Zeng, Z.B., and O'Malley, D., 1992: A proposed Method for Mapping Quantitative Trait Loci in Conifer Clones Using Half Sib Families. 6th International Conifer Biotechnology Working Group Meeting, Raleigh, North Carolina, April 23-27, 1992.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1990: DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nuclei Acids Res. 18: 6531-6535.