



# Ny indsigt i de gamle jyske linde – opnået via DNA-metoder

Af Ole K. Hansen, Lars Nørgaard Hansen, Erik D. Kjær og Peter Friis Møller

## SMÅBLADET LIND I JYLLAND

Danske lindetræer er naturhistorisk set særdeles interessante, og store træer af småbladet lind (*Tilia cordata*) betragtes som nøglebiotoper til bevarelse af den biologiske mangfoldighed. Både under og i en periode efter seneste istid var småbladet lind en dominerende art på både rig og fattig jordbund i de danske skove. Perioden, ca. 7000-500 f.Kr., blev først kaldt 'Egeskovstiden', men da man begyndte at korrigere pollendiagrammerne for forskellene i træarternes pollenproduktion, stod det klart at der var tale om en 'Lindetid'. Da linden er insektbestøvet, er dens pollenproduktion langt lavere end en vindbestøvet art som eg. Dens andel af skoven lå tilsyneladende snarere på omkring 30-50 % mange steder; men som følge af klimaændringer og især den store menneskelige påvirkning med skovrydning og opdyrkning fra omkring 6000 år før nu, blev linden langsomt fortrængt. Konkurrencen med den sent indvandrede bøg har uden tvivl også haft stor betydning. I dag findes småbladet lind naturligt i spredte småbestande; de største på frodige jorde i de sydøstlige egne af landet, men man kan stadig finde lindetræer i Vestdanmark som en sjælden indblanding i små isolerede bestande på bakkeøer og andre steder, hvor skoven tilsyneladende aldrig har været helt ryddet og opdyrket, bl.a. i flere egekrat. Opvækst af frøplanter er som regel

fraværende på disse lindelokaliteter, sandsynligvis fordi træerne kun undtagelsesvist udvikler levedygtigt frø og kimplanterne har svært ved at slå an. Til gengæld er lind fantastisk god til at formere sig ved støds kud og rodfæstende basalskud, og der er gennem mange år blevet spekuleret over, om de vstdanske lindetræer måske er ældgamle individer, som gennem årtusinder har formeret sig vegetativt ved sådanne basalskud samt ved støds kud.

Lind er som nævnt insektbestøvet, og insektbestøvede træarter har tendens til stærkere rasedannelse (den faglige term er 'genetisk differentiering') end vindbestøvede arter. Det skyldes især at pollen og dermed generne spredes i mindre omfang med insekter end med vinden. Rasedannelse/genetisk differentiering forstærkes ydermere i arter som består af små, isolerede bestande, og dette forhold giver også større risiko for indavl. Spørgsmålet er derfor, om de danske linde har en stærk lokal rasedannelse og samtidig lider af indavl? Er der store forskelle i den genetiske diversitet mellem de tilbageværende bestande, og er de tilbageværende træer i virkeligheden rod-, basal- og støds kud fra for længst forsvundne træer, der spirede for mange århundreder siden?

For at undersøge ovennævnte spørgsmål har vi lavet DNA-analyser af linde fra en række jyske lokaliteter, hvor småbladet lind indgår som et betydeligt element. Vi undersøgte bestande af lind på syv jyske lokaliteter. I tre af bestandene blev der indsamlet bladprøver i efteråret 2012,

Småbladet lind (*Tilia cordata*). Foto: Peter Friis Møller.

Tabel 1. Oversigt over de 7 jyske bestande af småbladet lind der indgår i studiet. Beskrivelsen bygger til dels på Wicksell (1998).

Lokalitet	Antal træer analyseret	Beskrivelse af lokalitet
<b>Bolderslev Skov</b> Ca. 10 km sydvest for Åbenrå.	30	Sammen med Uge Skov en af Danmarks største naturskove. Siden 1999 fredet og henlagt som urørt skov. Ifølge historiske optegnelser har der altid ligget skov på lokaliteten, og skoven har aldrig været udnyttet intensivt. Er speciel i forhold til lind derved at der findes både småbladet lind og storbladet lind ( <i>Tilia platyphyllos</i> ). Lindene til vores studie er indsamlet i den centrale vestvendte del af skoven, i en bræmme der strækker sig fra Buchwalds Lind langs en lavning til skovbrynet i vest.
<b>Åbybjerg ved Nørbjerg</b> 4 km nord for Åbybro.	30	Et vindblæst krat på ca. 5 ha indeholdende 100-150 lindetræer + opvækst. Regnes for at være den nordligste naturlige lindeskov i Danmark. Eg (stilkeg, vintereg og krydsninger) er det dominerende træ, men asp, lind og skovabild forekommer i stort antal. Prøver blev indsamlet repræsentativt fra træer spredt over hele bevoksningen, med flest i den østlige del af populationen.
<b>Draved Skov</b> Ca. 5 km syd for Løgumkloster.	40	En ca. 250 ha urørt skov hvoraf ca. 30 ha er med bevoksninger af gammel naturskov med meget varieret blandskov af bl.a. småbladet lind, rødell, stilkeg, bøg, dunbirk, ask, hassel og kristtjørn på uforstyrret jordbund. Fra omkring 1995 hyppigere opvækst af lindefrøplanter. I det sydvestlige hjørne (afd. 386a) kaldet "Lindestykket", dominerer linden med ca. 40 %. Det er i denne bevoksning, at der er indsamlet bladprøver til nærværende studie.
<b>Holt Krat</b> Ca. 8 km øst for Them.	10	Omkring 9,5 ha gammel stævningsskov som dels består af enstammede stilkege og vinterege med et lille islæt af gran og ene, dels af flerstammet stødskudskov af stilk- og vintereg, småbladet lind og store hasler. De mere end 100 linde er med få undtagelser alle ca. 50-årige stødskudstammer. Frøplanter blev i 1994 fundet i den nordlige del, hvor der er godt læ. Krattet har været stævningsskov langt tilbage i tiden og findes på kort fra 1787 (Møller, 1990).
<b>Ersted Skov</b> Ca. 5 km nordvest for Rold.	10	Åben bevoksning på vestsiden af Lindenberg Å bestående af forskelligaldrende bøg, ask, småbladet lind, birk, rødell, rødgran, alm. røn, hvidtjørn, hassel, ved-bend og kvalkved. Mere end 35, overvejende store og gamle lindetræer, spredt i bevoksningen. Der var i 1994 så godt som ingen foryngelse. Fortid: Der var en stor sammenhængende skov i 1791. Der er fundet specifikke træboende laver, som er indikatorer for gammel skov, hvilket tyder på lang vedvarighed (Møller, 1990).
<b>Krarup Lund</b> 1 km nord for Hodde/ 15 km nordøst for Varde.	10	Op til 100 individer af uensaldrende småbladet lind stående i en bræmme på nordsiden af Kybækken. Blandet med stilkeg, asp, bøg, enkelte løn, storbladet elm, fuglekirsebær, ask m.v. Træerne i bræmmen er trængt af bøgehøjskoven og mange træer er så trykkede, at de hælder ud over bækken. Bag randen og op ad skråningen op til 10 m inde er der meget ung, lav opvækst. I 1994 blev der ikke fundet små frøplanter. Højskov i 1803. Lunden har tidligere været egekrat; nu forvandlet til kulturskov.
<b>Årslev Skov</b> Ca. 3 km sydvest for Åbenrå.	10	Frodig blandskov af bøg, rødell, ask, avnbøg, spidsløn, ahorn, rødgran og især i de vestlige og nordvestlige dele findes småbladet lind. I 1994 var der en god aldersfordeling og god foryngelse, mest vegetativ, men også en del frøplanter. Både småbladet, storbladet og enkelte hybridlind er iblandet. Der har været højskov i 1783 og 1805. Gammel skov som er blevet drevet ekstensivt med pluk-hugst.

mens prøver fra de resterende fire bestande blev taget fra Naturstyrelsens frøplantage på Møn (FP275), hvor træer udvalgt i vestdanske linde er podet op. Oplysninger om de syv bestande ses i tabel 1. I de bestande hvor materiale blev indsamlet på selve lokaliteten i 2012 (Bolderslev, Åbybjerg og Draved) blev der indsamlet fra store træer, dvs. ikke opvækst og små træer. Træerne fra den podede frøplantage FP275 (de 4 sidste bestande i tabel 1) er udvalgt som plustræer i de respektive bestande tilbage i 1996, og var da også voksne træer.

## GENETISKE FINGERAFTRYK

Alle de indsamlede træer blev karakteriseret, dvs. genotyperet, for 10 DNA-markører. Ved genotyping forstås, at der for hver af de 10 udvalgte DNA-markører bestemmes hvilke alleler træet har. Alleler er de forskellige varianter, som en DNA-markør kan have, og de markører vi anvendte (såkaldte mikrosatellitter) er meget variable, så der er typisk flere/mange forskellige. Et enkelt lindetræ kan dog maksimalt have to alleler for den enkelte DNA-markør, fordi de ligesom mennesker har to parallelle sæt gener (et fra faderen og et fra moderen) for hvert sted i den samlede mængde DNA. Man siger at lindetræerne (og mennesket) er diploide. Ved at kombinere træets genotype for forskellige DNA-markører kan man få et unikt genetisk fingeraftryk – idet det bliver mere og mere usandsynligt, at to træer har samme alleler i alle DNA-markører jo flere markører man anvender. Denne metode er helt analog til de genetiske fingeraftryk, der bruges inden for humangenetik og retsvidenskab.

I vores undersøgelse blev de genetiske fingeraftryk anvendt til en række analyser: 1) Ved at tælle hvor mange forskellige alleler, som træerne i hver bestand har i

DNA-markørerne, fik vi et udtryk for bestandenes genetiske diversitet.

2) En samlet statistisk analyse over alle bestande gav et udtryk for, hvor genetisk forskellige de enkelte bestande er i forhold til hinanden – den såkaldte genetiske differentiering.

3) Endelig blev de genetiske fingeraftryk brugt til at belyse, hvor beslægtede træerne er inden for den enkelte bestand. Vi undersøgte om træerne er indavlede – dvs. har reduceret genetisk diversitet som følge af bestøvning mellem beslægtede træer. Vi undersøgte også om der er træer, som er genetisk helt identiske, fordi det så i givet fald må være en følge af vegetativ formering, dvs. klondannelse.

## SAMMENLIGNING AF GENETISK DIVERSITET

Sammenlignes den genetiske diversitet mellem de syv bestande, kan det konstateres, at der ikke er dramatiske forskelle. I tabel 2 ses at det gennemsnitlige antal alleler ( $N_a$  – taget over de 10 DNA-markører) varierer fra 4,9 i Krarup Lund til 6,6 i Bolderslev Skov. Nu er det således, at jo flere træer man genotyper i en bevoksning,

Tabel 2. Genetisk diversitet i 7 jyske bestande af småbladet lind.  $N$ =antal individer (=antal genotyper).  $N_a$ = gennemsnitligt antal alleler i populationen (tal i parentes er standard error).  $N_{a(kor)}$  = gennemsnitligt antal alleler i populationen korrigeret til stikprøvestørrelse 10.

Population	N	$N_a$ (SE)	$N_{a(kor)}$
Bolderslev Skov	18*	6,60 (1,48)	5,3
Åbybjerg	28*	6,20 (1,41)	5,0
Draved Skov	40	5,90 (1,14)	4,5
Holt Krat	10	5,20 (1,03)	5,2
Ersted Skov	10	5,60 (1,05)	5,6
Krarup Lund	10	4,90 (0,74)	4,9
Årslev Skov	10	5,00 (0,83)	5,0

\*Der blev samlet blade fra 30 træer i begge disse to bestande, men på grund af klonstruktur var der kun henholdsvis 18 og 28 individer (=genotyper).

desto større chance er der for at finde nye alleler. Det er derfor på sin plads at korrigeres for forskellige stikprøvestørrelser – hvilket kan gøres rent matematisk. Resultatet ses i næste kolonne –  $N_{a(kor)}$  – og ved denne manøvre bliver forskellene endnu mindre – og det er da Draved Skov, som har den laveste genetiske diversitet med 4,5 alleler, mens Ersted Skov nu har den højeste med sine 5,6 alleler. Bemærk at selv om der er indsamlet 30 træer i både Bolderslev og Åbybjerg, så er  $N$  anført som værende henholdsvis 18 og 28. Det skyldes, at nogle af de genotypedede træer i disse to bestande var genetisk identiske (kloner).

### STOR GENETISK DIFFERENTIERING

Den genetiske differentiering er vist i tabel 3, som indeholder parvise mål for hvor genetisk forskellige de 7 bestande er indbyrdes. Jo højere værdi, desto mere forskellige er to bestande. Det skal her pointeres, at de anvendte DNA-markører ikke siger noget om træernes fysiske egenskaber – herunder tilpasning til klima etc. – men skal betragtes som 'neutrale' markører. To bestande, der har lille indbyrdes genetisk differentiering, vil typisk have haft stor indbyrdes udveksling af gener (fx via pollen) eller fælles oprindelse, mens det modsatte gør sig gældende for to bestande med

stor genetisk differentiering. Bestande der ligger tæt på hinanden rent geografisk, vil derfor også normalt have mindre genetisk differentiering end bestande, som befinder sig langt fra hinanden. Betragtes Tabel 3 ses, at der ikke umiddelbart er et sådan mønster. Eksempelvis har Bolderslev og Draved en større genetisk differentiering (0,08) end Bolderslev og Åbybjerg (0,06) skønt de to førstnævnte ligger under 50 km fra hinanden, mens afstanden mellem de to sidstnævnte er op mod 300 km. På samme måde ligger Krarup Lund og Holt Krat (0,18) geografisk tættere end Krarup og Ersted Skov (0,06).

Overodnet set var den genetiske differentiering på 0,11 beregnet ud fra alle 7 bestande. Det er faktisk en ganske høj grad af differentiering. Tidligere er fundet et lignende mønster i vilde danske skovæbler (Larsen *et al.* 2006), som også primært findes i små, isolerede forekomster i Danmark. Og studier af tilsvarende genetiske fingeraftryk i rødgran (fra hele Europa) og skovfyr (her hele Finland) har fundet differentiering mellem bestande, som samlet set ikke er meget større end det vi finder i de jyske lindeskove. Det peger på, at udvekslingen af gener mellem de jyske lindebestande har været ret begrænset i lang tid.

Tabel 3. Genetisk differentiering (=racedannelse) mellem 7 jyske bestande af småbladet lind. Tabellen viser indbyrdes genetiske afstande mellem de 7 undersøgte bestande, baseret på genotypen af 10 DNA-markører. Jo større tal, desto større genetisk afstand. Alle genetiske afstande var statistisk signifikant forskellig fra nul på nær de to markeret med\*.

	Bolderslev	Åbybjerg	Draved	Holt	Ersted	Krarup	Årslev
Bolderslev	0						
Åbybjerg	0.06	0					
Draved	0.08	0.17	0				
Holt	0.12	0.10	0.17	0			
Ersted	0.05	0.09	0.18	0.10	0		
Krarup	0.07	0.14	0.15	0.18	0.06*	0	
Årslev	0.05	0.11	0.16	0.15	0.06	0.01*	0

## INDAVL

Indavl opstår når beslægtede individer krydser. I de fleste træarter er indavl skadeligt og medfører dårlig trivsel og vækst, sygdomme eller andre uheldige konsekvenser. Netop det at linden findes i isolerede bestande med få individer kan give øget risiko for indavl; der er simpelthen et begrænset antal individer at formere sig med. Specifikt i lind har der været spekuleret på, om den manglende udvikling af levedygtigt frø var et indavlsfænomen (Kjær et al. 1994).

Indavl kan opstå, hvis nabotræer er tæt beslægtet, og krydser med hinanden. Man kan tænke sig, at afkom fra samme modertræ vokser op tæt på hinanden, og siden krydser fordi insekter fortrinsvis flytter pollen mellem nabotræer. De genetiske analyser her peger imidlertid ikke på, at dette skulle være tilfældet i de undersøgte lindebevoksninger. Rent teknisk ses det ved, at andelen af såkaldte homozygoter ikke er forøget i forhold til hvad man vil forvente under 'tilfældig krydsning'.

Indavl kan imidlertid være opstået, hvis bestandene har været meget små gennem mange generationer, og alle træer i en bestand derfor med tiden bliver stadig mere beslægtet med hinanden. Denne type indavl er sværere at påvise med de genetiske fingeraftryk vi bruger, fordi vi ikke kender bevoksningernes genetiske sammensætning generationer tilbage i tiden. Den bedste måde at undgå denne type indavl (hvis den findes) vil være at krydse individer mellem *forskellige* bestande. Hvis afkom fra sådanne krydsninger vokser bedre end afkom efter individer fra samme bestand, vil det tyde på, at bestandene er indavlet gennem tid. Udkrydsning mellem træer fra forskellige bestande vil finde sted i Naturstyrelsens frøplantager, hvor kloner fra forskellige bestande er blandet i samme

beplantning. Hvis indavl er et problem i de naturlige lindebestande, forventes afkom fra frøplantagen derfor at vokse bedre end frøplanter fra naturbestandene. Det vil derfor være interessant at lave sammenligninger i fremtidige plantninger.

## FOREKOMST AF KLON-GRUPPER

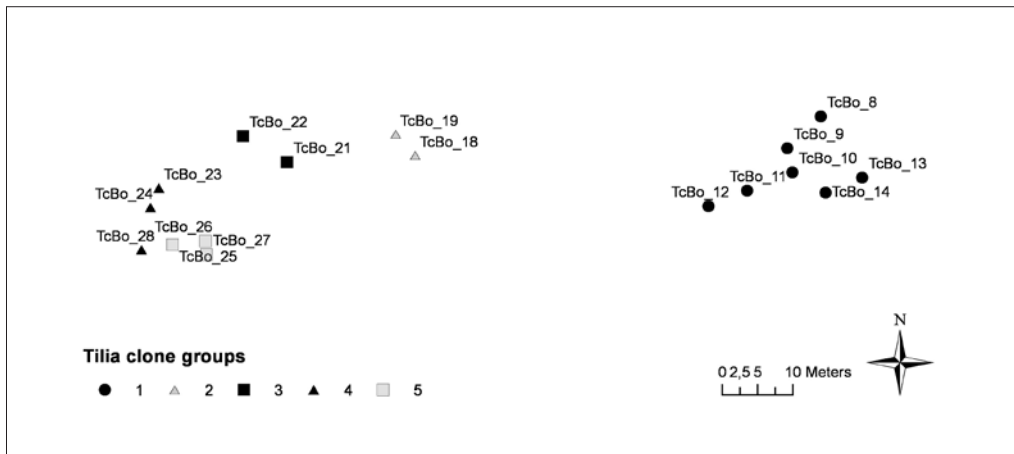
På grund af de jyske lindetræers ofte manglende evne til at sætte levedygtigt frø, og fordi linden er god til at sætte stødskud, har der, som indledningsvis nævnt, været spekuleret på, om lindetræerne i skoven mon har en forbindelse under jorden og har overlevet på denne måde gennem hundreder eller måske tusinder af år ved gentagen vegetativ formering. Tidligere studier af lindes formeringspotentiale i Bolderslev Skov er foretaget via undersøgelser af frøkvalitet og visuel analyse af unge træers forbindelse med gamle (Hansen et al. 2003). Der blev det konstateret, at det var meget få unge træer, som ikke havde en direkte forbindelse til et ældre træ. Det kunne være basalskud fra stammen eller et stød, skud fra nedbøjede grene eller skud fra et væltet træ. De unge træer siger dog kun noget om den nære fortid, og først med udviklingen af egnede DNA-markører kan beslægtetheden mellem gamle træer, der står på afstand af hinanden, undersøges. Resultaterne af vores studie var i den henseende meget forskellige. I Bolderslev Skov, hvor 30 træer blev undersøgt inden for et relativt afgrænset område, tilhørte 17 af træerne én af i alt 5 klongrupper; dvs. hvor to eller flere træer havde præcis samme genotype, og derfor antages at være samme individ rent genetisk. Der blev lavet et præcist kort over de indsamlede træer i Bolderslev ved hjælp af laserbaseret afstandsmål og kompasretninger, og den indbyrdes fysiske



Foto 1. Foto som viser træer, der indgår i klongruppe 1. Træer mærket med rødt bånd og på billedet markeret med tallet "1" har samme genotype og er derfor kloner opstået via vegetativ forering (stødskud). Foto: Lars Nørgaard Hansen.



Foto 2. Foto som viser de to træer, der indgår i klongruppe 3. De to træer, mærket med rødt bånd og på billedet markeret med tallet "3", har samme genotype og er derfor kloner opstået via vegetativ forering (stødskud). Afstanden mellem dem er godt 7 meter. Foto: Lars Nørgaard Hansen.



Figur 1. Kort der viser position af træer med samme genotyper (=kloner) i Bolderslev skov. Træer med samme symbol tilhører samme klon.

placering af træerne i klongrupperne kan ses i Figur 1. På foto 1 og 2 er der desuden vist eksempler på træer, som er kloner. I Åbybjerg fandt vi to klongrupper mellem de 30 træer – begge med hver to træer stående i umiddelbar nærhed af hinanden. I Draved blev der af de 40 undersøgte træer ikke fundet nogle med samme genotype. I de sidste fire bestande, hvor materialet var udvalgte plustræer, og derfor ikke nødvendigvis taget fra nærtstående træer, blev der heller ikke fundet træer med samme genotype.

## KONKLUSIONER

Variationen i jyske lindebestandes genetiske diversitet, målt med neutrale DNA-markører, er relativt beskedent, men den genetiske differentiering inden for Jylland er betydelig. Sidstnævnte indikerer en forholdsvis lille udveksling af gener mellem bestandene, og underbygges af, at der ikke synes at være nogen sammenhæng mellem den indbyrdes genetiske differentiering og den geografiske afstand mellem bestandene. En hypotese er, at efter lindetiden, hvor arten var udbredt over hele landet,

har det været tilfældigt hvor den har overlevet på de få tilbageværende lokaliteter. Den genetiske differentiering der sidenhen er sket, er baseret på tilfældige hændelser, som altid sker når bestande er små. De nuværende jyske bestande af lind kan således være relikter af tidligere udbredte lindeskove.

Studiet viste desuden, at en betydelig andel af de store træer i en lindebevoksning godt kan være det samme individ. Selvom man ikke umiddelbart ser dem som forbundne, og selvom de kan stå mere end 20 meter fra hinanden. Det får os naturligvis til at spekulere på, hvor gamle sådanne lindetræer egentlig kan være? For få år siden fandt professor Kullman fra Umeå Universitet, at verdens ældste træ er en rødgran, der i over 9000 år har overlevet gennem vegetativ formering i Dalarna i Midsverige (Kullman 2008; Öberg & Kullman 2011). Resultaterne fra Bolderslev viser, at selv gamle lindetræer i de jyske bestande kan føres tilbage til vegetativ formering fra et fælles træ. Et træ, der sikkert for længst er forgået, men lever videre gennem sine aflægtere. Men hvis de





jyske lindetræer på denne måde gennem flere generationer har forynget sig vegetativt, kan de nuværende træer jo tænkes at repræsentere endog meget gamle individer. Vi må tale om mindst hundredvis af år gamle individer, men om der måske er tale om tusindvis af år gamle lindetræer, kan der indtil videre kun gisnes om.

## TAK

En stor tak til G.B. Hartmanns Familiefond som har ydet økonomisk støtte til vores arbejde med DNA-markører i lind. Tak til Naturstyrelsen for at give lov til at tage prøver i FP275 frøplantagen og i Bolderslev Skov. Ligeledes tak til Torben Ørbæk Larsen, ejer af Åbybjerg, for adgang til bevoksningen. Videnskabelig assistent Knud Brian Nielsen har lavet kortet med klonerne i Bolderslev Skov.

## LITTERATUR

- L.B. Hansen, F. Borchsenius & J. Lawesson (2003) Lindene i Danmark. Gejrfuglen 39. årg. s. 5-8.
- E. Kjær, L. Graudal & S. Canger (1994). Udredning vedr. bevaring af genetiske ressourcer af træer og buske i Danmark. Miljøministeriet, Skov & Naturstyrelsen. 132p.
- L. Kullman (2008). Early postglacial appearance of tree species in northern Scandinavia: review and perspective. Quaternary Science Reviews 27, 2467-2472
- A.S. Larsen, C.B. Asmussen, E. Coart, D.C. Olrik & E.D. Kjær (2006). Hybridization and genetic variation in Danish populations of European crab apple (*Malus sylvestris*). Tree Genetics & Genomes 2: 86-97.
- P.F. Møller (1990). Naturskove i Danmark. En foreløbig opgørelse over danske naturskove udenfor statsskovene. Intern DGU-rapport nr. 39. Udarbejdet for Skov- og Naturstyrelsen. 569 pp.
- P.F. Møller (2000). Natur og forskning i Draved Skov i fortid, nutid og fremtid. Sønderjysk Månedsskrift 2000/4: 81-93.
- U. Wicksell (1998). En foreløbig opgørelse af Lindeforekomster i Danmark. Forskningscentret for Skov & Landskab, Hørsholm, 2002. 122 s.
- L. Öberg & L. Kullman (2011). Ancient subalpine clonal spruces (*Picea abies*): sources of postglacial vegetation history in the Swedish Scandes. Arctic 64, 183-196

Modstående side:

Lind fra Draved Skov. Foto: Peter Friis Møller.