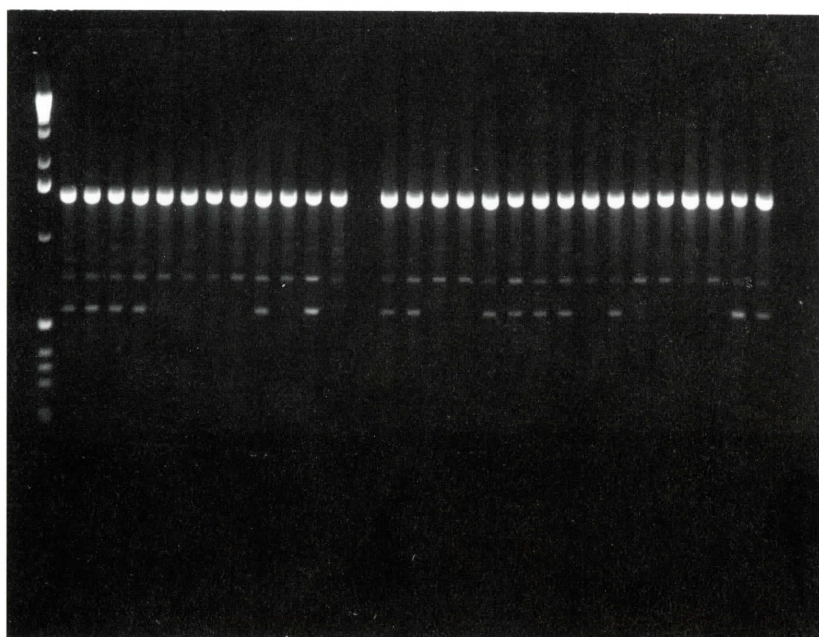


DNA-markörer hos träd

-verktyg som tidigt kan avslöja värdefulla egenskaper

- Med hjälp av ny DNA-teknik går det att framställa ett obegränsat antal DNA-markörer för genkartering. Markörerna kan användas för att identifiera gener som påverkar värdefulla egenskaper hos barrträd och kan underlätta förädlingsverksamhet.
- Kopplingsanalyser mellan värdefulla trädegenskaper och DNA-markörer görs genom att studera sambandet mellan egenskaperna och markörerna hos avkomman från kända korsningar.
- Med ett genkarteringsprogram görs beräkningar av den mest sannolika ordningen för DNA-markörerna på genkartan och loci som påverkar de studerade egenskaperna (QTL).
- Metoden har använts för att studera och testa regleringen av frosthärdighet hos tall.



FIGUR 1. DNA-markörer i tallbarr hos 29 avkommor från en familj. Polymorfi, dvs. mångformighet, för markören är markerad med en pil. Det är möjligt att undersöka flera tusen DNA-markörer i ett enda tallbarr.

Vid förädling av barrträd har ett av de mest svårösta problemen varit att kartlägga hur kvantitativa egenskaper nedärvs. Sådana egenskaper, t.ex. tillväxt och hårdighet styrs av många gener och uppvisar därför en kontinuerlig variation.

Det senaste decenniet har dock modern DNA-teknik gjort det möjligt att framställa markörer (Fig. 1), med vilkas hjälp även dessa grupper av gener kan lägesbestämmas och beskrivas.

Den nya tekniken öppnar spännande möjligheter i förädlingsarbetet och gör det möjligt att tidigt testa egenskaper och välja ut de bästa träden. Här presenterar vi metoden och egna studier på tallens köldhårdighet.

Genkartering

En genkarta anger var på kromosomerna de gener (arvsanlag) som styr olika egenskaper är belägna. Genernas läge på en kromosom kallas för loci. Gener som är belägna på samma kromosom bildar kopplingsgrupper (Fig. 2).

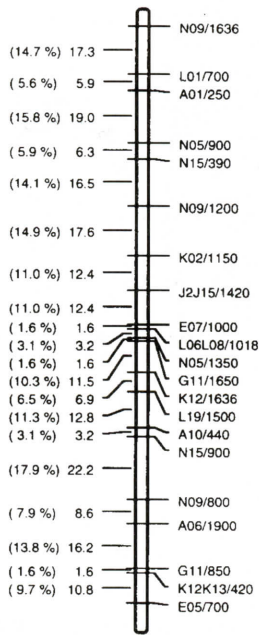
Hur starkt gener är kopplade beror på deras inbördes avstånd. Närstående gener är starkare kopplade till varandra än sådana som ligger långt ifrån varandra.

Vid könscelldelningen dras paren av homologa kromosomer isär, en till var och en av de nybildade cellerna. Vid den processen sker överkorsning, dvs. vissa delar av genmaterialet byts ut mellan de båda kromosomerna och nya genkombinationer uppstår. Det gäller främst kopplingsgrupper som ligger nära varandra.

Genom att studera hur hög överkorsningsfrekvensen är, går det att fastställa genernas inbördes läge och göra en genkarta över varje kromosom (Fig. 2).

Två typer av nedärvning

Genernas uttryck, dvs. egenskaper hos en organism, kan vara av två olika slag, kvalitativa eller kvantitativa. En kvalitativ egenskap styrs av en (vid enkel nedärvning) eller ett fåtal gener (t.ex. ögonfärg hos



FIGUR 2. RAPD-markörer hos tall, placerade i en kopplingsgrupp. På höger sida om kopplingsgruppen (i detta fall nr. 7) visas markörens beteckning och på vänster sida avståndet i Centimorgan mellan markörerna.

människan). En kvantitativ egenskap styrs av många gener, vilket ger en kontinuerlig (steglös) variation. Exempel på kvantitativa egenskaper är tillväxtförmåga och köldhårdighet hos träd. Loci som kontrollerar kvantitativa egenskaper kallas "quantitative trait loci" (QTL).

Markörer som hjälpmedel

Medan variationen i enstaka gener är lätt att kartera, är variationen i kvantitativa egenskaper svårare att bestämma, eftersom så många gener är inblandade.



FIGUR 3. Frystest utförd på en familj. Färgförändringen hos plantorna visar variationen i hårdighet

Numera finns det dock en rad olika DNA-baserade metoder som kan användas för att framställa molekylära markörer (som själva är gener). En av de mest använda metoderna kallas RAPD (se ordlista). De framtagna markörerna tillåter undersökning av ett obegränsat antal gener och är till stor hjälp när QTL:s läge skall lokaliseras.

Dataprogram finner sambanden

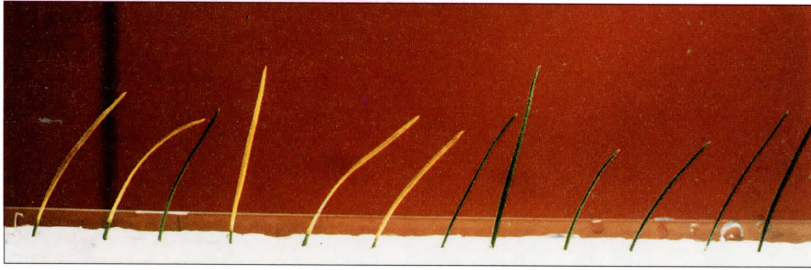
Med hjälp av sofistikerade dataprogram kan genpositionerna för hundra- eller tusentals egenskaper bestämmas. Programmen bestämmer den mest sannolika ordningen mellan markörerna och deras inbördes avstånd i kopplingskartan.

Analysen går till så att samband söks mellan de nedärvda markörerna och den mätbara variationen i egenskap. Analysen kan också visa om en egenskap styrs av ett eller flera QTL. Nyutvecklade dataprogram kan integrera flera genkartor till en gemensam.

Genkarteringen av loci för kvantitativa egenskaper hos skogsträd tjänar flera olika syften. Den ger ökade kunskaper om genernas organisation och funktion men kan också underlätta tidiga tester i förädlingen genom urval baserat på molekylära markörer (Marker Aided Selection).

Frosthårdighet hos tall

På nordliga breddgrader, med de korta vegetationsperioder som råder, är förmågan till tidig invintring på hösten av största vikt för tallens över-



FIGUR 4. Barr med varierande grad av fryskada

levnad. Invintringen initieras av ökande nattlängd på sensommaren. Tall från nordliga breddgrader har sedan den senaste istiden anpassats till att påbörja invintringen vid kortare natt än tall från sydliga.

Skillnader i invintringsförlopp mellan individer, familjer eller provenienser kan studeras med hjälp av frystester i programmerbara fryskamrar under sensommar/höst. Tidig invintring påvisas genom god hårdighet och sen invintring genom sämre hårdighet i frystest (Fig. 3).

Frystestning

I ett nyligen startat projekt försöker vi finna QTL som styr invintrings-

förloppet hos tall. För detta ändamål har vi, baserat på fyra nordliga kloner från latitud 67° N och fyra sydligare kloner från 62° N, framställt arton helsyskonfamiljer (100 plantor per familj) av vardera nord x nord, nord x syd och syd x syd.

Det varierande latitudursprunget innebär att korsningsavkommorna har varierande invintringsförlopp och fördelning vad gäller hårdhetskarakterer.

I stället för att frystesta hela plantor valde vi att utföra frystesterna på lösa barr som avskilts från årsskottet omedelbart före frystillfället. Metoden gör att plantorna inte förstörs, utan

att samma plantor kan testas vid upprepade tillfällen och vid olika temperaturer.

Frystestning utfördes genom successiv nedkylning från +10° C (5° C/tim) till olika förutbestämda temperaturer valda med hänsyn till den aktuella graden av frosthårdighet.

Efter en och en halv timme vid aktuell frystemperatur återgick temperaturen successivt till utgångsläget. Fryskadorna (Fig. 4) registrerades visuellt i en 10-gradig skala utifrån mängden missfärgad barrmassa efter två veckors förvaring av barren i hög luftfuktighet.

Plantorna frystestades vid både ett och två års ålder. Resultaten visade förväntade skillnader i hårdighet på hösten mellan de tre familjegrupperna (Fig. 5): nord x nord (bäst), nord x syd (medel) och syd x syd (sämst). Det fanns också en betydande variation mellan individer inom familjer.

Bulkanalys (BSA)

Vid korsningar mellan nordliga och sydliga kloner innehåller avkomman dels individer vars hårdighet motsvarar den nordliga föräldratypen och dels individer som motsvarar den sydliga föräldratypen. Man erhåller en utklyvning i hårdhetskarakterer.

Två typer av korsningar är lämpliga för hårdhetskarakterstudier: korsningar mellan föräldrar som är Aa x Aa (heterozygot x heterozygot) eller Aa x aa (heterozygot x homozygot) för "major genes" (de gener som påverkar en större del av variationen i en egenskap) av QTL. I båda fallen sker en utklyvning av egenskaper bland avkomman för "major gene" som kan påverka hårdheten.

Avkommor med extremt hög och extremt låg hårdighet väljs ut från varje korsningsfamilj och analyseras med hundratals DNA-markörer enligt "Bulk Segregation Analysis" (BSA).

Metoden bygger på antagandet att DNA-allelen i ett locus är kopplat till loci för hårdighet när samtliga plan-

Ordförklaringar

Allel, ett locus på en kromosom kan vara säte för olika gener, som sägs vara allela till varandra.

Enkel nedärvning, när två alleler är involverade i nedärvningen. RAPD-markörer består av två alleler, ofta benämnda + resp - allel.

Genom, genuppsättningen hos en individ eller en art.

Heterozygot, när loci i de homologa kromosomerna innehåller olika anlag.

Homologa kromosomer, genom hos de flesta organismer är organiserat i par av homologa (inbördes lika) kromosomer som separeras vid könscelledningen.

Homozygot, när loci i de homologa kromosomerna innehåller samma anlag.

Kopplingsgrupper, markörer som ligger på samma kromosom tillhör samma kopplingsgrupp.

Kvantitativ egenskap, en egenskap som, på grund av att den styrs av flera olika gener, uppvisar kontinuerlig variation.

Locus/loci, plats på en kromosom, där ett/flera arvsanlag är belägna.

FAKTARUTA

Meiosrekombination, genernas omgruppering via överkorsning i samband med könscelledningen.

Molekylärmarkör, DNA-fragment som förekommer i många olika former.

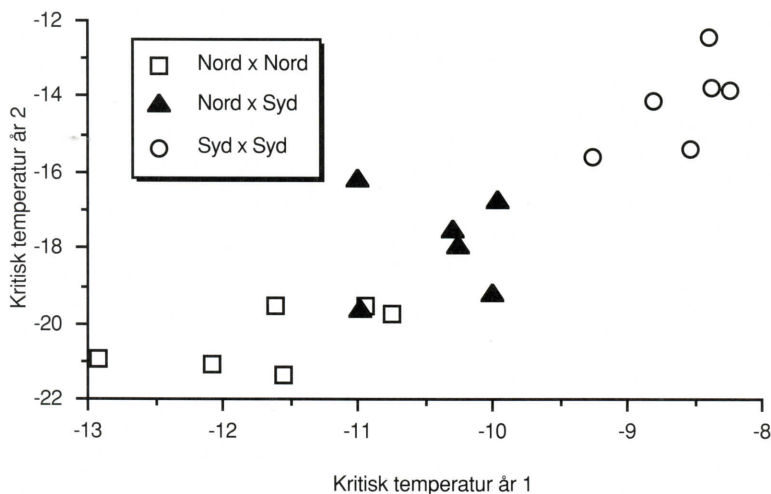
PCR (Polymerase Chain Reaction), en metod att massföröka ett bestämt segment av DNA-molekyler.

QTL (Quantitative Trait Loci), loci som styr kvantitativa egenskaper.

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), specifika DNA-sekvenser i hundratals identiska kopior som tillverkats i en PCR-maskin.

Utklyvning, uppkomsten av olika kategorier av individer bland avkomman från en heterozygot individ, beroende på att allelerna i homologa kromosomer skiljs åt under könscelledningen.

Överkorsning, segmentutbyte mellan närliggande gener på homologa kromosomer. Överkorsningsprocenten (frekvensen) av segmentutbyte mäts i Centimorgan (cM).



FIGUR 5. Olika korsningsfamiljer skiljer sig beträffande frosthärdighet i september, beroende på att de humnit olika långt i invintringsprocessen. Korrelationen mellan familjernas kritiska temperatur år 1 och år 2 var hög, $r=0,91$. Den kritiska temperaturen är den vid vilken 50-procentiga skador på barrvävna- den uppträder.

tor med hög härdighet har allelen, medan de med låg härdighet saknar den.

Familjer som visar association mellan härdighetsegenskaper och DNA-markörer i BSA-analysen, kan mer ingående undersökas för kartläggning av QTL.

BSA har använts hos många organismer för en snabb kartläggning. Hos t.ex. sockerbetor har metoden använts för att kartlägga loci för nematodresistens och hos ris för urval av resistens mot svampsjukdomar.

Nya möjligheter skapas i förädlingsarbetet

Hos skogsträd är det primära målet med genkartering att identifiera QTL för egenskaper som är betydelsefulla för förädlingen. Det kan gälla såväl tillväxtegenskaper som fysiologiska processer och motståndskraft mot sjukdomar eller insektsangrepp.

Hos poppel (*Salix* - arter) har QTL lokaliserats för volymtillväxt, stamform, grenvinklar, knoppsprickning på våren och stam- och rotbildnings-

förmåga under laboratorieförhållanden.

De gentekniska metoderna kommer också till användning för att förbättra vedens kvalitet. Hos radiatatalen (*Pinus radiata*) har redan fyra DNA-markörer hittats som visar samband med vedens täthet.

Hos radiatatalen har dessutom ett samband mellan DNA-markörer och motståndskraft mot en typ av svampangrepp påvisats.

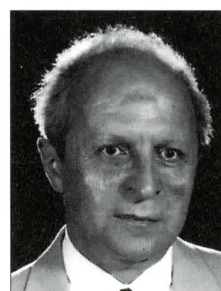
Nästa steg efter QTL-kartläggning är att isolera QTL-gener för manipulering. För närvarande pågår försök att isolera och karaktärisera gener som påverkar fysiologiska processer hos träd. Det gäller t.ex. ligninbiosyntes, blomning, knoppsättning, tillväxthastighet, kottbildning, trädens respons på dagslängd, kvävetillgänglighet, skador, infektion, torka, ozonkänslighet och rotformering.

Ämnesord

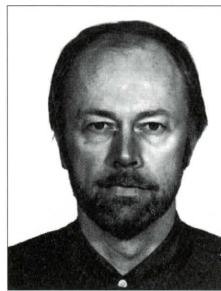
DNA, DNA-markörer, frosthärdighet, marker aided selection, QTL, tall

Litteratur

Yazdani, R., Yeh, F.C. and Rimsha, J. 1995. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) linkage map in *Pinus sylvestris* (L.). *Journal of Forest Genetics* 2(2): 109-116.



Docent *Reza Yazdani* arbetar vid institutionen för skogsgenetik, SLU, 750 07 Uppsala
Tel: 018/673307
Fax: 018/672718
E-post: Reza.Yazdani@sgen.slu.se



Forskningsledare *Jan-Erik Nilsson* arbetar vid institutionen för skoglig genetik och växtfysiologi, SLU, 901 83 Umeå
Tel: 090/165877
Fax: 090/165901
E-post: Jan-Erik.Nilsson@genfys.slu.se

**FAKTA
SKOG**

Ansvarig utgivare: Johan Elmberg
Redaktör: Jonas Förare

Prenumeration och distribution:

Pris:
Tryck:

SLU Kontakt, Box 49, 230 53 ALNARP
SLU Informationsavd., Box 7057, 750 07 UPPSALA
Telefon: 018-67 14 56 • Telefax: 018-67 35 20
E-post: Jonas.Forare@cf.slu.se
Sveriges lantbruksuniversitet
SLU Publikationstjänst
Box 7075, 750 07 UPPSALA
Telefon: 018-67 11 00 • Telefax: 018-67 28 54
300 kr + moms (även lösnummerförsäljning)
Sveriges lantbruksuniversitet
ISSN 1400-7789 © SLU 1997

