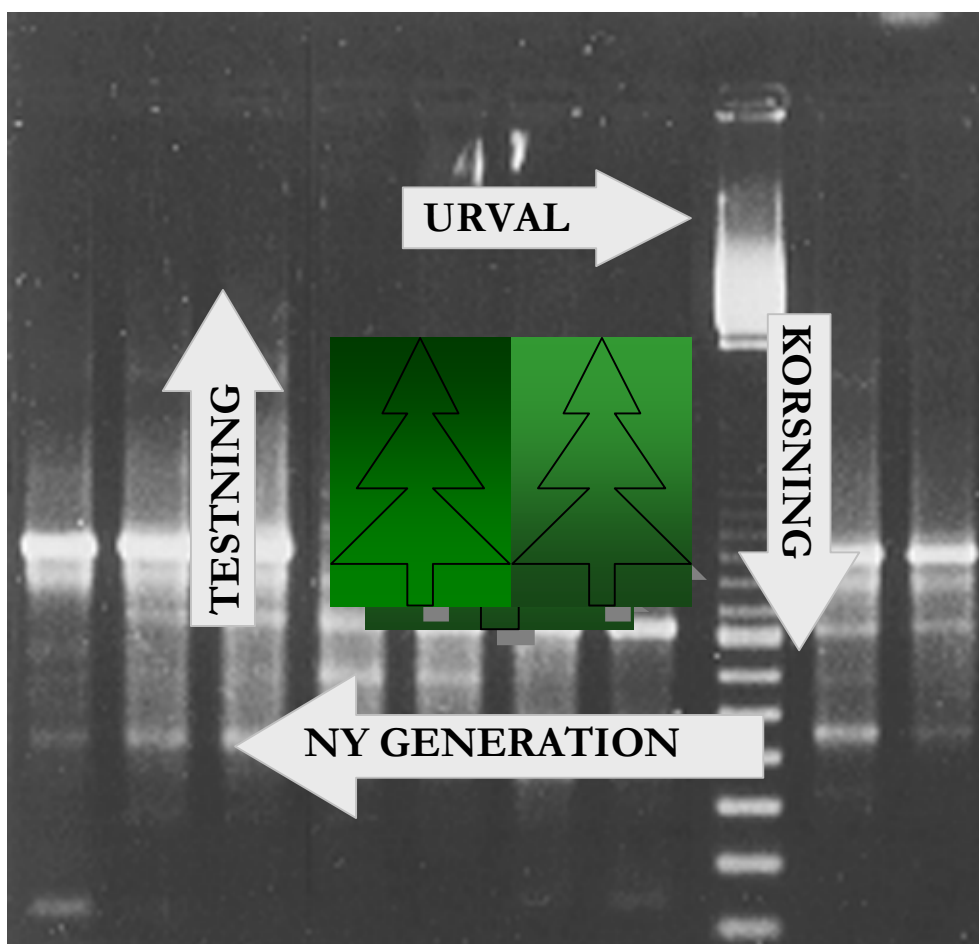


Molekylära markörer – någonting för skogsträdsförädlingen?

Maria Boije af Gennäs



Omslagsbild: Integration av DNA-markörtekniker i skogsträdsförädlingen

Illustratör: Författaren

Ämnesord: Biokemiska markörer, DNA-markörer, RFLP, RAPD, SSR, AFLP, EST, skogsträdsförädling

SkogForsk – Stiftelsen Skogsbrukets Forskningsinstitut

SkogForsk arbetar för ett långsiktigt, lönsamt skogsbruk på ekologisk grund. Bakom SkogForsk står skogsbolag, skogsägareföreningar, stift, gods, allmänningar, plant-skolor, SkogsMaskinFöretagarna m.fl., som betalar årliga intressentbidrag. Hela skogsbruket bidrar dessutom till finansieringen genom en avgift på virke som avverkas i Sverige. Verksamheten finansieras vidare av staten enligt särskilt avtal och av fonder som ger projektbundet stöd.

SkogForsk arbetar med forskning och utveckling med fokus på fyra centrala frågeställningar: Produktvärde och produktionseffektivitet, Miljöanpassat skogsbruk, Nya organisationsstrukturer samt Skogsodlingsmaterial. På de områden där SkogForsk har särskild kompetens utförs även i stor omfattning uppdrag åt skogsföretag, maskintillverkare och myndigheter.

Serien **Arbetsrapport** dokumenterar långliggande försök samt inventeringar, studier m.m. och distribueras enbart efter särskild beställning.

Forsknings- och försöksresultat från SkogForsk publiceras i följande serier:

SkogForsk-Nytt: Nyheter, sammanfattningar, översikter.

Resultat: Slutsatser och rekommendationer i lättillgänglig form.

Redogörelse: Utförlig redovisning av genomfört forskningsarbete.

Report: Vetenskapligt inriktad serie (på engelska).

Handledningar: Anvisningar för hur olika arbeten lämpligen utförs.

Innehåll

Inledning.....	3
Sammanfattning.....	3
Användningen av molekylära markörer inom skogsgenetik och skogsträdsförädling	3
Uppskattning av genetisk variation	4
Identifiering av arvs massa.....	5
Användning av molekylära markörer i fröplantager	5
Markör genkartor	5
Urval med hjälp av molekylära markörer	5
Markör tekniker	6
Biokemiska markörer.....	6
DNA-markörer.....	7
RFLP-tekniken.....	7
Markör tekniker som baserar sig på PCR.....	7
RAPD.....	8
SSR	8
AFLP.....	9
Framtida markör tekniker	9
Vilken markör för vilket ändamål?	9
Referenser.....	11
Bilaga 1 Ordlista	15

Inledning

Skogsträdsförädling är en långsiktig process där slutprodukten är skogsträd med egenskaper bättre anpassade till människans behov. I huvudsak bedrivs denna förädling genom konventionell urvalsförädling, som består av testning, urval och korsning. Stödjande forskning behövs också för att få mera kunskap om ämnet och för att effektivera den operativa förädlingsverksamheten.

Utvecklingen inom bioteknologin och molekylärbiologin har frambringat flera nya tekniker vilka baseras på användandet av molekylära markörer. Dessa tekniker kan användas vid skogsgenetiska studier och som ett komplement till de tekniker som i dag används inom den praktiska skogsträdsförädlingen.

Den här arbetsrapportens syfte är att informera om molekylära markörer samt deras användning såväl inom den praktiska skogsträdsförädlingen som inom den tillämpade stödjande forskningen. I den första delen av rapporten behandlas hur man kan dra nytta av molekylära markörer inom skogsträdsförädlingen och inom skogsgenetiska studier. I den andra delen beskrivs diverse markörmetoder som är intressanta för skogsträdsförädling och skogsgenetik.

Sammanfattning

Integration av molekylära markörer kan öka precisionen i det praktiska förädlingsarbetet genom t.ex. verifiering av kontrollerade korsningar och identifiering av kloner. Dessutom kan markörerna ge indikation om den genetiska mångfalden inom och mellan populationer. Ytterligare kan molekylära markörer ge mycket information om fröplantagernas genetiska tillstånd t.ex. när det gäller inkorsning och släktskap. Genom att bygga upp tekniska förutsättningar och kompetens för tillämpning av molekylära markörer inom förädlingsarbetet kommer det att i framtiden vara avsevärt mycket lättare att fortskrida mot markörbaserat urval (MAS).

Användningen av molekylära markörer inom skogsgenetik och skogsträdsförädling

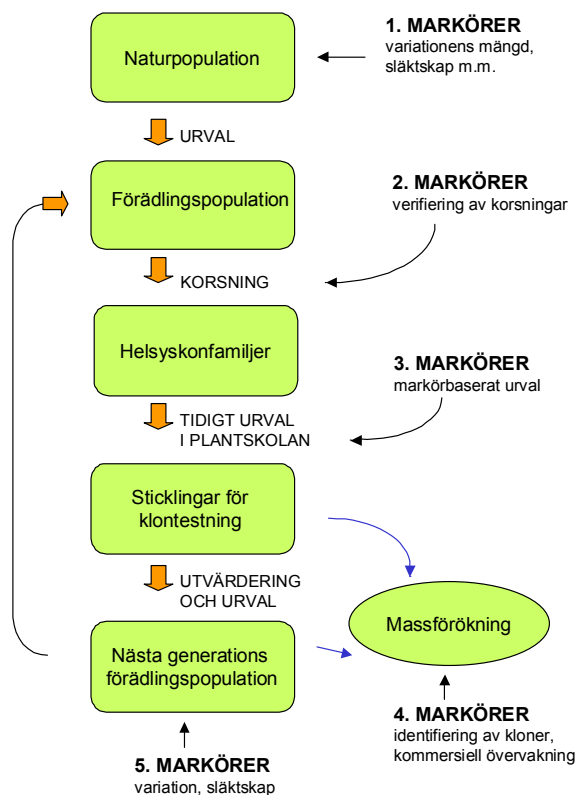
Man kan säga att en genetisk markör är en ”egenskap” som kan förknippas med en viss genetisk grupp. De genetiska markörerna kan vara morfologiska, biokemiska eller molekylära, medan den genetiska gruppen kan sträcka sig från enskilda individer till hela arter.

DNA-markörer används i dag flitigt inom medicinska forskningen, kriminologin och biologin. Inom skogsgenetiken och skogsträdsförädlingen tillämpas molekylära markörer för uppskattning av genetisk diversitet, identifiering av arvs massa samt vid urval. Figur 1 ger en översikt över hur molekylära markörer kan användas i ett förädlingsprogram.

Uppskattning av genetisk variation

Med molekylära markörer kan man undersöka genetisk diversitet mellan och inom populationer (se figur 1, punkt 1 och 5). Man kan t.ex. jämföra mängden genetisk diversitet mellan en förädlingspopulation och naturbestånd där urvalet gjorts eller mellan fröplantager och naturbestånd (Harju 1995). Markörer har också använts för att klarlägga om plantproduktion genom somatisk embryogenez märkbart minskar den genetiska diversiteten p.g.a. selektion (Passerieux, m.fl., 1999) samt för att uppskatta mängden somaklonal variation förorsakad av somatisk embryogenez och kryolagring (Aronen, m.fl., 1999, DeVerno, m.fl., 1999). Somatisk embryogenez är en vegetativ förökningsmetod där somatiska embryon bildas från sterila cellkulturer initierade från fröembryon. En stor fördel med denna metod är att cellkulturerna kan lagras i låga temperaturer (kryolagring) för kommande massförökning.

Biokemiska- och DNA-markörer är i det stora hela neutrala markörer, vilket betyder att de inte påverkas av det naturliga urvalet. När det gäller att uppskatta genetisk variation för adaptiva kvantitativa egenskaper mellan och inom populationer kan neutrala markörer ge en helt annan bild av variationen än metrisk egenskaper (Karhu, m.fl., 1996). Det här beror på att de loci som ansvarar för lokal anpassning påverkas starkt av det naturliga urvalet, medan det är andra evolutionära krafter, mutationer och drift, som styr den genetiska variationen i markörloci. Däremot om markören ligger väldigt nära (d.v.s. markörer är kopplad till egenskapen) eller rentav på lokus, som påverkar en kvantitativ egenskap, kan markören ge information om egenskapen ifråga.



Figur 1. Potentiellt utnyttjande av molekylära markörer inom ett förädlingsprogram. Schemat baserar sig på klontestning av kandidater men markörer kan likväl användas inom förädlingsprogram som är baserade på avkommeprövning.

Identifiering av arvs massa

Ett av de viktigaste användningsområden för molekylära markörer är identifiering av arvs massa. Identifiering kan ske på många olika nivåer: identifiering av kloner, familjer, populationer eller arter. I vissa fall kan man av ekonomiska skäl vara intresserad att identifiera fröets härkomst (se figur 1, punkt 4). Inom förädling finns det också ett stort intresse att verifiera kontrollerade korsningar (se figur 1, punkt 2). Identifiering av avkommor med hjälp av molekylära markörer baserar sig på uteslutningsmetoden, som betyder att man med hjälp av avkommans alleler i granskade lokus kan utesluta de föräldrar som inte har kunnat bidra till dessa alleler (Weising, m.fl., 1995). Vid faderskapstester av barrträd kan man också dra nytta av variation inom det icke-mendelska kloroplastgenomet, som hos barrträd nedärvs genom fadern.

Användning av molekylära markörer i fröplantager

I fröplantager kan man med hjälp av molekylära markörer studera graden av pollenkontamination, tilläggs pollinerings inverkan, graden av inavel och självpollination eller hela korsningsmönstret (Neale, m.fl., 1992). Alla dessa studier har som gemensam nämnare bestämmandet av faderskap hos fröplantagefrö. Ett sätt att bestämma pollengametens genotyp är att jämföra embryots genotyp med den moderligt nedärvda megagametofyten (endosperm) och sedan jämföra pollengenotypen med pollengenotyper inne i och utanför fröplantagen. Ett annat sätt är att hos barrträd använda sig av DNA-markörer belägna i kloroplastgenomet.

Markör genkartor

Tack vare det obegränsade antalet av framför allt DNA-markörer är det möjligt att successivt täcka in hela genomet med genmarkörer och konstruera en markör genkarta. Dessa genmarkörer kan på basen av rekombinationsfrekvenser lokaliseras till sina respektive kromosomer och avståndet kan fastställas mellan dem. Genom studier av olika arters markör genkartor kan man få nyttig information om genomens organisation och om faktorer som påverkar artbildningen. Markör genkartor kan t.ex. avslöja förekomsten av kromosomala omorganisationer och vidare leda till identifiering av funktionella kandidatgener. Den största tillämpningen av markör genkartor inom praktisk skogsträdsförädling är vid markörbaserat urval.

Urval med hjälp av molekylära markörer

På senare tid har det riktats stort intresse för användningen av molekylära markörer vid urval för ekonomiskt värdefulla egenskaper. MAS står för engelskans Marker Assisted Selection och bygger på identifiering av markörer som är starkt kopplade till gener eller genkomplex, s.k. QTL. Med QTL (Quantitative Trait Loci) menas DNA-segment på en kromosom, som kodar för kvantitativa egenskaper. En lockande tanke är att man skall kunna använda markörer vid tidigt urval och på det sättet effektivisera förädlingscykeln (se figur 1, punkt 3).

Första steget för att använda markörer vid urval är att framställa en markör genkarta. Ju tätare markör genkarta desto bättre, p.g.a. att chansen då är större att upptäcka koppling mellan QTL och markör. En förutsättning för markör-

erna är att de är höggradigt polymorfa och neutrala, vilket innebär att de inte påverkas av det naturliga urvalet. Nästa steg är att fastställa koppling mellan markörer och QTL. Kopplingen får ej brytas upp vid omkombination, ej heller får den påverkas av olika miljöförhållanden. Detta medför, speciellt för heterogena skogsträd, att stora materialmängder måste testas för att påvisa och verifiera associationen mellan markörer och QTL. Hur stora populationer som måste testas beror på egenskapens heritabilitet, urvalsintensitet, signifikansnivå och antalet effektiva QTLs. För långlivade skogsträd är man också intresserad av huruvida QTLs är stabila över åldrandet. Det här beror självklart på vilken egenskap man är intresserad av, men t.ex. för tillväxt finns det indikation på att uttryck av QTLs inte är stabila över åldrandet (Emebiri m.fl., 1998). Nämnas bör också att urval inte enbart behöver baseras på markördata, utan kan användas som komplement till mätning av kvantitativa karaktärer. Man kan t.ex. använda index som innehåller både kvantitativa data och markördata. Det går också att studera koppling mellan markör och egenskap utan att ha tillgång till en markörgenkarta, men då måste man i vanliga fall gå igenom ett stort antal markörer och dessutom har man ingen information om var markören och QTL ligger.

Enligt Strauss m.fl. (1992) har MAS den största potentialen inom skogsträdsförädlingen för egenskaper som är svåra att mäta och har hög heritabilitet, t.ex. vedegenskaper och resistensegenskaper eller vid intensivt inom-familjeurval av egenskaper med låg heritabilitet.

Markörtekniker

Den genetiska variationen kan bestämmas med hjälp av kvantitativa eller metriskiska egenskaper, morfologiska markörer, biokemiska markörer och DNA-markörer. De morfologiska markörerna är av mindre betydelse i dagens populationsgenetik och förädlingsprogram p.g.a. att de är sällsynta och ofta miljöpåverkade (Savolainen, 1994; Weising, m.fl., 1995). Sedan mitten av 1960-talet har man inom växtförädling och populationsgenetik använt sig av biokemiska enzymmarkörer. Tack vare utvecklingen inom molekylärbiologin har diverse DNA-baserade markörtekniker utvecklats, som RFLP, RAPD (Welsh & McClelland, 1990; Williams, m.fl., 1990), AFLP (Vos, m.fl., 1995) och SSR (Tautz, 1989). Den grundläggande skillnaden mellan dessa två markörgrupper är att de biokemiska markörerna är genexpressionens kemiska slutprodukter, t.ex. enzymer, medan DNA-markörer representerar direkt DNA-sekvensens variation.

Nedan behandlas de olika markörteknikerna, biokemiska enzymmarkörer, RFLP, de PCR-baserade RAPD, SSR och AFLP och framtida markörtekniker, var för sig.

Biokemiska markörer

Enzymmarkörer är biokemiska markörerna som har använts inom växtförädling sedan 1960-talet. Enzymer är proteiner som katalyserar specifika kemiska reaktioner. Tekniken går ut på att särskilja enzymer med likartad funktion i gelelektrofores. Enzymerna vandrar olika långt i gelet beroende på deras

elektriska laddning, storlek och molekylära konformation. Sedan behandlas gelet så att den enzymgrupp man är intresserad av framträder. Variationen består av aminosyreändringar inom en enzymgrupp. Nackdelen med enzymmarkörer är att de är begränsade till antal och att de kan vara aktiva under olika utvecklingsstadier eller i olika celler, men de är billiga, codominanta (d.v.s. det går att skilja heterozygoter från homozygoter), snabba och enkla att använda och kommer säkert att ha sin plats inom skogsgenetiken även i framtiden.

DNA-markörer

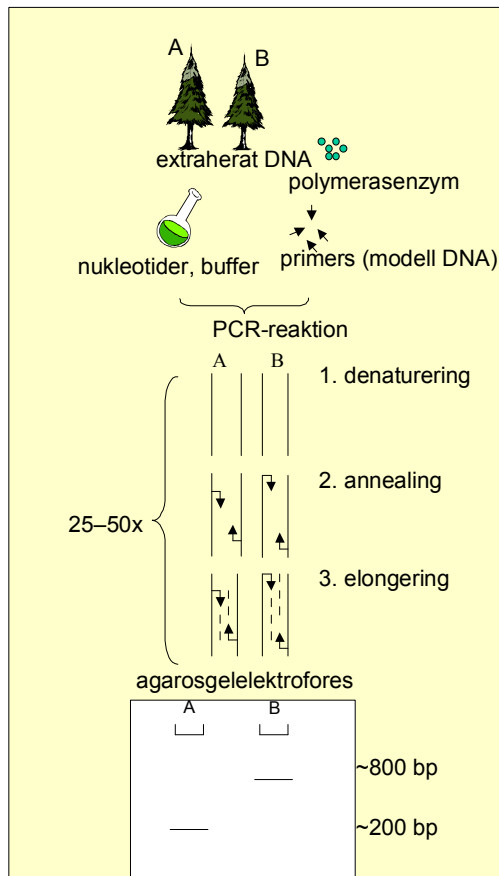
DNA-markörer framställs vanligen genom att hela DNA delas upp i mindre segment, som kan särskiljas. Variationen hos dessa markörer består av ändringar i bassekvensen, såsom insertioner, deletioner, mutationer, eller variation inom nukleotidssekvensens längd. I jämförelse med proteinmarkörer har DNA-markörer många fördelar. För det första täcker de hela genomet, både kodande- (exon) och icke kodande sekvenser (intron). För det andra är DNA-markörer obegränsade till antal och de varierar inte heller mellan olika växt- delar eller utvecklingsstadier. För det tredje påverkas de inte av miljön och dessutom kan man studera både mendelskt nedärvda markörer och icke-mendelskt nedärvda, p.g.a. att DNA finns i förutom kärnan även i kloroplaster och mitokondrier. Kloroplastgenomet nedärvs paternellt hos barrträd medan mitokondrie-DNA nedärvs överlag maternellt. Det här betyder att man med DNA-markörer kan studera variation som nedärvs endast genom den ena föräldern. För det fjärde kan man med PCR-teknik kopiera DNA från mycket små ursprungsmängder och analysens olika steg, såsom DNA-extrahering, pipettering och körning av PCR-reaktionen, elektrofores samt dokumentering kan automatiseras (Wagner, 1992; Neale, m.fl., 1992; Rafalski & Tingey, 1993; Savolainen, 1994, Weising, m.fl., 1995).

RFLP-tekniken

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), som togs i bruk under 1980-talet, var den första DNA-markörtekniken. Den här metoden baserar sig på att från växten extraherat DNA spjälkas med restriktionsenzymer. Varje restriktionsenzym har en egen karakteristisk spjälkningssekvens i DNA. Resultatet är DNA-fragment av varierande längd beroende på spjälkningssekvensernas antal och placering i genomet. DNA-fragmenten avskiljs med hjälp av gelelektrofores, överflyttas till membran och åskådliggörs efter DNA-hybridisering med ett modell-DNA (s.k. probe). I jämförelse med enzymmarkörer hittar man flera RFLP-markörer, men metoden är arbetsam och kräver rikligt med DNA (tabell 1).

Markörtekniker som baserar sig på PCR

Många olika markörtekniker har utvecklats sedan PCR (Polymerase Chain Reaction) uppfanns i mitten på 1980-talet (Saiki, m.fl., 1985). Med PCR-tekniken kan specifikt DNA kopieras med hjälp av primers och DNA-polymerasenzym. Primers är korta, syntetiskt framställda DNA-fragment som basparas till en komplementär enkel DNA-sträng. DNA-polymerasenzym är ett enzym som katalyserar framställningen av en DNA-kopia. Markörtekniker som baserar sig på PCR är bl.a. RAPD, SSR och AFLP. Även dessa tekniker baserar sig, liksom RFLP, på jämförelse av olikstora DNA-fragment, men DNA-fragmenten produceras genom kopiering och inte genom spjälkning.



Figur 2.
En förenklad bild av analysering
av okänt växt-DNA med PCR-
RAPD-metod.

RAPD

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)-tekniken baserar sig på PCR-förökning av DNA-segment med slumpmässiga ungefär 10 baspar långa primers (Williams m.fl., 1990). I PCR-reaktionens första skede åtskiljs DNA-stängarna ifrån varandra i hög temperatur (denaturering), (figur 2, steg 1). Sedan sänks temperaturen för att primers skall baspara sig med en komplementär sekvens på de enkla DNA-strängarna (annealing), (figur 2, steg 2) och till sist framställer polymerasenzymet DNA-kopior mellan primernas basparingsställen (elongering) (figur 2, steg 3) i en aningen högre temperatur än för föregående stadium. Genom att upprepa denna cykel 25–50 gånger förökas DNA-sekvensen mellan primerna exponentiellt. Tekniken är lätt och snabb, men tyvärr är RAPD-markörerna dominanta (tabell 1), vilket begränsar teknikens användningsområde.

SSR

SSR står för Simple Sequence Repeats. Ett annat namn för SSR är mikrosatelliter. Mikrosatelliter är korta DNA-segment (1–6 baspar) som upprepas efter varandra (från 5 upp till 100 upprepningar) ett varierande antal gånger (Tautz, 1993) och som saknar känd funktion. De förekommer spridda över hela genomet (nukleärt DNA, kloroplast DNA och mitokondrie DNA), men oftast i de icke-kodande områdena. Denna variation kan användas som markör förutsatt att man känner till den omkringliggande DNA-sekvensen för utveckling av lämpliga primers. Då kan mikrosatellitsekvensen förökas genom vanlig PCR-teknik, likt RAPD. Fördelen med mikrosatelliter är markörernas riklighet

och variation samt att de är codominanta (tabell 1). Nackdelen med att använda mikrosatelliter är att det är tämligen dyrt och tekniskt krävande att utveckla markörer, speciellt för skogsträd med stora genom och mycket repetitivt DNA. Trots detta finns det redan nu en stor mängd mikrosatelliter för flertalet ekonomiskt viktiga trädarter, såsom *Picea abies* (Lefort, m.fl., 1999), *Pinus sylvestris* (Kostia, m.fl., 1995, Soranzo, m.fl., 1998), *Pseudotsuga menziesii* (Lefort, m.fl., 1999), *Quercus* (Dow, m.fl., 1995), *Fraxinus* (Lefort, m.fl., 1997) och *Populus* (Strauss, m.fl., 1998).

AFLP

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Vos, m.fl., 1995) är en markörteknik som kombinerar RFLP och RAPD genom att selektivt mångfaldiga restriktionsfragment med PCR. I den här tekniken spjälkas DNA först med två olika restriktionsenzymer för att vid senare steg amplifieras med PCR i två omgångar med speciella primers. Den största fördelen med AFLP är den stora mängd polymorfa markörer som kan analyseras per experiment, men AFLP är en tämligen dyr teknik och tekniskt krävande (tabell 1). AFLP-markörer är likt RAPD-markörer oftast dominanta.

Framtida markörtekniker

Tack vare de många pågående sekvenseringsprojekten av potentiellt funktionella gener (t.ex. Sterky, m.fl., 1998, Welling, m.fl.) kommer det småningom finnas en möjlighet att använda variation inom funktionella gener som markörer, t.ex. ESTs. EST, Expressed Sequence Tag, är benämningen på en kort nukleinsyresekvens av en funktionell gen identifierad från ett genbibliotek. Ett genbibliotek är en samling celler, oftast bakterie- eller jästceller, som innehåller DNA-fragment från en art eller en specifik vävnad. Ifall EST-fragmenten representerar delar av gener, som inverkar på växtens adaptiva processer, och de är polymorfa, kan EST-fragment fungera som informativa icke-neutrala markörer. EST anses som icke-neutrala markörer eftersom de är delar av gener som påverkas av det naturliga urvalet.

Vilken markör för vilket ändamål?

Vilken teknik man skall välja för vilket arbete är beroende på många faktorer, t.ex. hur många markörer man behöver, hurdana resurser man har, DNA-mängd och om markörtekniken är codominant eller dominant (tabell 1). Med en dominant markörteknik kan man inte urskilja heterozygoter från dominanta homozygoter, medan detta är möjligt med en codominant markörteknik. Analysmetoderna skiljer sig också från varandra beroende på vilken markörteknik man använder sig av.

När det gäller uppskattning av genetisk variation och användning av biokemiska- och DNA-markörer i fröplantager har isoenzymmarkörer använts (t.ex. Harju, A., 1995; Lindgren, D. & Yazdani, R., 1988). Orsaken till detta är att dessa biokemiska markörer länge varit den enda existerande markörtekniken vid sidan om morfologiska markörer. Isoenzymer är billiga och tekniskt lätta att använda samt codominanta, vilket är en tydlig fördel vid analysering av fröplantager. Å andra sidan gynnar barrträdens stora genom och rikliga förekomst av repetitivt DNA metoder där man använder DNA-markörer,

eftersom DNA-markörer täcker hela genomet och därmed ger en mera representativ bild av variationen. RAPD-tekniken har t.ex. använts flitigt för att uppskatta genetisk variation (bl.a. Passerieux, m.fl., 1999; Wu, m.fl., 1999). Vid studier av genetisk variation inom adaptiva egenskaper eller differentiering mellan populationer förorsakad av naturligt urval är metriska egenskaper eller icke-neutrala markörer, såsom ESTs, att föredra. Neutrala markörer kan också användas ifall en koppling mellan markör och egenskap fastställts.

Tabell 1.
Jämförelse mellan olika markörtekniker (anpassat från Rafalski & Tingey, 1993 och Staub, m.fl., 1996).

	Enzymer	RFLP ¹	RAPD ²	SSR ³	AFLP ⁴
Metod	Färgning av specifika enzym från proteinextrakt	Spjälkning med restriktions-enzym och hybridisering	Amplifiering med slumpvisa primers	Amplifiering av ssr	Selektiv amplifiering av dna fragment
Typ av polymorfism	Aminosyre-ändringar	Insertioner eller deletioner	Insertioner eller deletioner	Upprepningens längd	Insertioner eller deletioner
Antal	~50	Obegränsade	Obegränsade	Varierar beroende på art	Obegränsade
Polymorfism	Måttlig	Måttlig	Måttlig	Riklig	Måttlig
Antal lokus analyserade/reaktion	1–2	1–2	5–20	1	40–100
Dominans	Codominant	Codominant	Dominant	Codominant	Dominant
Behov av DNA-mängd	–	2–10 µg	10–25 ng	25–50 ng	100–200 ng
Behov av DNA-sekvens	Nej	Nej	Nej	Ja	Nej
Utveckling av metoden	Dyr	Dyr	Billig	Mycket dyr	Dyr
Pris/prov	Billig	Dyr	Billig	Billig	Dyr

¹ Restriction Fragment Length Polymorphism

² Random Amplified Polymorphic DNA

³ Simple Sequence Repeats

⁴ Amplified Fragment Length Polymorphism

För identifiering av arvsmassa är mikrosatelliter en bra teknik, dels för att de är codominanta och dels för att ett lokus har ofta väldigt många alleler. Dessutom kan man vid faderskapstester hos barrträd använda sig av mikrosatelliter belägna i det paternellt nedärvda kloroplastgenomet (Stoehr, m.fl., 1998, Ziegenhagen, B., 1998). Om arten man studerar eller dess nära släktingar saknar identifierade mikrosatelliter eller syftet är att identifiera arter eller kloner där codominant information inte nödvändigtvis behövs, kan en rikligt förekommande dominant markörteknik såsom RAPD och AFLP likväl användas. RAPD-teknik har t.ex. använts för identifiering av kloner och ympar (t.ex. Castiglione, m.fl., 1993; Keil & Griffin, 1994).

Vid framställning av markörgenkartor är det viktigt att få så stora delar av genomet som möjligt täckt av markörer. För detta behövs en teknik där markörantalet är obegränsat t.ex. RFLP, RAPD eller AFLP. Det är också möjligt att kombinera information från flera olika markörtekniker i en och samma karta.

Vid urval med hjälp av markörer kommer man i framtiden att kunna använda identifierade funktionella gener (t.ex. ESTs), som uttrycker någon intressant kvantitativ egenskap, som markörer vid MAS. Detta skulle öka precisionen avsevärt, eftersom man då direkt studerar en funktionell gen som påverkar den egenskap man är intresserad av.

Referenser

- Aronen, T.S., Krajnakova, J., Häggman, H.M. & Ryyänen, L.A. 1999. Genetic fidelity of cryopreserved embryogenic cultures of open-pollinated *Abies cephalonica*. *Plant Science* 142: 163–172.
- Castiglione, S., Wang G., Damiani, G., Bandi, C., Bisoffi, S. & Sala, F. 1993. RAPD fingerprints for identification and for taxonomic studies of elite poplar (*Populus* spp.) clones *Theor Appl Genet* 87:54–59.
- DeVerno, L.L., Park, Y.S., Bonga, J.M. & Barrett, J.D. 1999. Somaclonal variation in cryopreserved embryogenic clones of white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss.). *Plant Cell Reports* 18:948–953.
- Dow, B. D., Ashley, M. V. & Howe, H. F. 1995. Characterisation of highly variable (GA/CT) microsatellites in the bur oak, *Quercus macrocarpa*. *Theor Appl Genet* 91:137–141.
- Emebiri, L.C., Devey, M.E., Matheson, A.C. & Slee, M.U. 1998. Age-related changes in the expression of QTLs for growth in radiata pine seedlings. *Theor Appl Genet* 97:1053–1061.
- Harju, A. 1995. Genetic functioning of Scots pine seed orchards. *Acta Univ. Oul. A.* 271. Oulu, Finland.
- Karhu, A., Hurme, P., Karjalainen, M., Karvonen, P., Kärkkäinen, K., Neale, D. & Savolainen, O. 1996. Do molecular markers reflect patterns of differentiation in adaptive traits of conifers? *Theor Appl Genet* 93:215–221.
- Keil, M. & Griffin, A. R. 1994. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in the discrimination and verification of genotypes in *Eucalyptus*. *Theor Appl Genet* 89: 442–450.
- Kostia, S., Varvio, S., Vakkari, P. & Pulkkinen, P. 1995. Microsatellite sequences in a conifer, *Pinus sylvestris*. *Genome* 38: 1244–1248.
- Lefort, F., Echt, C., Streiff, R. & Vendramin, G. G. 1999. Microsatellite sequences: A new generation of molecular markers for forest genetics. *Forest Genetics* 6(1): 15–20.
- Lefort, F., Edwards, K. J. & Douglas, G. C. 1997. Identification of microsatellites regions of ash (*Fraxinus excelsior* L.) *Dendrome* 4(2):4.
- Lindgren, D. & Yazdani, R. 1988. Paternal contribution following artificial pollination in *Pinus sylvestris* (L.). *Scand. J. For. Res.* 3: 299–304.
- Neal, D. B., Devey, M. E., Jermstad, K. D., Ahuja, M. R., Alosi, M. C. & Marshall, K. A. 1992. Use of DNA markers in forest tree improvement research. *New Forest* 6:391–407.

- Passerieux, E., Baud, S., Dulieu, H. & Pâques, M. 1999. RAPD variation in a Norway spruce seedlot: consequences of somatic embryogenesis. *The Journal of Heredity*. 90(6):662–667.
- Rafalski, J. A. & Tingey, S. V. 1993. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends in Genetics* 9:275–280.
- Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. & Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350–1354.
- Savolainen, O. 1994. DNA – merkit jalsotuksen käytössä. Julkaisussa Metsänjalostusta Punkaharjulla ja 70 vuotta. (toim.) Esko Oksa, Mestäntutkimuslaitoksen tiedonantoja 525.
- Soranzo, N., Provan, J. & Powell, W. 1998. Characterisation of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. *Molecular Ecology* 7: 1260–1261.
- Staub, J.K., Serquen, F.C. & Gupta, M. 1996. Genetic markers, map construction and their application in plant breeding. *HortScience*. Vol. 31(5).
- Sterky, F., Regan, S., Karlsson, J., Hertzberg, M., Rhode, A., Holmberg, A., Amini, B., Bhalerag, R., Larsson, M., Villarroel, R., Van Montague, M., Sandberg, G., Olsson, O., Teeri, T. T., Boerjan, W., Gustafsson, P., Uhlén, M., Sundberg, B. & Lundberg, J. 1998. Gene discovery in the wood-forming tissues of poplar: Analysis of 5,692 expressed sequence tags. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95: 13330–13335
- Stoehr, M.U., Ovar, B.L., Vo, T.M., Gawley, J.R., Webber, J.E. & Newton, C. H. 1998. Application of a chloroplast DNA marker in seed orchard management evaluations of Douglas-fir. *Can. J. For. Res.* 28:187–195.
- Strauss, S. H., Lande, R. & Namkoong, G. 1992. Limitations of molecular-marker-aided selection in forest tree breeding. *Can. J. For. Res.* 22:1050–1061.
- Strauss, S. H., Meilan, R., Difazio, S., Leonardi, S., Brunner, A., Skinner, J., Mohamed, R. & Krutowski, K. 1998. Tree genetic engineering Research co-operative (TGERC) annual report: 1997-1998. Forest Research laboratory, Oregon State University, Corvallis, USA.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for - polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 17:6463–6471.
- Tautz, D. 1993. Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. *DNA Fingerprinting: State of the Science* (S.D.J Pena, R. Chakraborty, J. T. Epplen & A. J. Jeffreys, eds.) Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland. pp 21–28.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van der Lee, T, Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. & Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23:4407–4414.
- Wagner, D. B. 1992. Nuclear, chloroplast and mitochondrial DNA polymorphisms as biochemical markers in population genetic analyses of forest trees. *New Forest* 6:373–390.

- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K. & Meyer, W. 1995. DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press, Boca raton, Florida, USA, 322 s.
- Welling, A., Boije, M., Aalto, O., Li C., Puhakainen, T., Ojala, K., Heino, P. & Palva, E. T. Cold acclimation in birch (*Betula pendula* Roth): Use of expressed sequence tags for analysis of cold acclimation related genes. *Tree Physiology* (submitted).
- Welsh, J. & McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* vol 18. No.24:7213–7218.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. & Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* Vol 18. No.22:6531–6535.
- Wu, J., Krutovskii, K.V. and Strauss, S.H. 1999. Nuclear DNA diversity, population differentiation, and phylogenetic relationship in the California closed-cone pine based on RAPD and allozyme markers. *Genome* 42: 893–908.
- Ziegenhagen, B., Scholz, F., Madaghiele, A. & Vendramin, G. G. 1998. Chloroplast microsatellites as markers for paternity analysis in *Abies alba*. *Can. J. For. Res.* 28:317–321.

Ordlista

AFLP, (Amplified Fragment Length Polymorphism) markörteknik där DNA först spjälkas med restriktionsenzym och sedan selektivt mångfaldigas genom PCR.

Amplifiering, att öka antalet kopior av en DNA-sekvens t.ex. med PCR-teknik.

Codominant, situationen då båda allelerna hos en heterozygot bidrar med samma effekt. Proteinpolymorfism och mikrosatelliter visar codominans: heterozygoter har två band medan homozygoter har bara ett band.

Deletion, typ av mutation som förorsakats av förlust av en eller flera baser i DNA-molekylen.

DNA-fingerprinting, en gemensam benämning på tekniker där arvsmassan analyseras med hjälp av DNA-fragment.

Dominant, beteckning på en allel vars effekt på en viss egenskap är lika i heterozygoten som i homozygoten.

Exon, DNA-sekvens som översätts till RNA och vidare till proteiner.

Gelelektrofores, metod där molekyler avskiljs från varandra i ett elektriskt spänningsfält.

Genetisk markör, en identifierbar DNA-sekvens som underlättar studier av nedärvningen av en egenskap eller en gen.

Heritabilitet, andelen genetisk variation av den totala fenotypiska variationen.

Hybridisering, situation då två polynukleotidsträngar basparas med varandra.

Insertion, ändringar i DNA-molekylens bassekvens som förorsakats av slumpmässig integration av DNA med annan härstamning.

Intron, icke-kodande DNA-sekvens.

Komplementaritet, förhållandet mellan dubbelspiralens DNA-strängar, där basen Adenin basparas med Tymin och Guanin med Cytosin.

Koppling, en situation då gener inte nedärvs oberoende av varandra utan tillsammans mera än förväntat.

Kryolagring, förvaringsmetod av arvs massa genom nedfrysning i flytande kväve.

Markörgenkarta, karta över ett genom som är täckt av genetiska markörer, vars position i arvs massan och avstånd mellan varandra är känt.

MAS, (Marker Assisted Selection) urval med hjälp av markörer.

PCR, (Polymeras Chain Reaction) metod för uppförökning av DNA – sekvenser.

Polymerasenzym, enzym som katalyserar bildandet av polymerer från monomerer. DNA-polymerasenzym katalyserar bildandet av en DNA-sträng från nukleotider genom att använda en komplementär DNA-sträng som modell.

Polymorfism, förekomst av en eller flera alleler i ett locus i en population.

Primers, kort DNA eller RNA fragment som basparar sig med ett templat-DNA.

Probe, DNA-molekyl som används för att upptäcka komplementära nukleinsyremolekyler genom molekylär hybridisering.

QTL, (Quantitative Trait Loci), DNA-segment på en kromosom, som kodar för kvantitativa egenskaper.

RAPD, (Random Amplified Polymorphic DNA) markörteknik där slumpmässiga DNA-fragment mångfaldigas med PCR.

Repetativt DNA, DNA sekvens som förekommer i flera kopior i ett genom.

Restriktionsenzym, enzym som spjälkar DNA vid en sekvens som är specifik för just det restriktionsenzymet.

RFLP, (Restriction Fragment Length Polymorphism) markörteknik där restriktionsenzymer används för att framställa DNA-fragment.

Somatisk embryogenes, en vegetativ förökningsmetod där somatiska embryon bildas i mängder från sterila cellkulturer initierade från fröembryon.

Somaklonal variation, ändringar i arvsmassan till följd av vegetativ förökning.

SSR, (Simple Sequence Repeat), markörteknik där högrepetativt DNA mångfaldigas med PCR.