

Genetische diversiteit van de INBO-zaadboomgaard van boskers

De Cuyper Bart

INBO.R.2015.7158296
D/2015/3241/051

Inleiding

Het bosbeleid in Vlaanderen staat een toenemend gebruik voor van inheemse ‘edele’ loofboomsoorten bij her(bebossing) en bestandsomvorming. Voor Boskers (*Prunus avium* L.) wordt dit mede geïnspireerd door de erkenning van de hoge bosbouwkundige, ecologische en economische waarde (hoge houtkwaliteit). Mits aan bepaalde standplaatsvoorwaarden is voldaan, biedt deze boomsoort bovendien perspectieven als alternatief voor populier in het kader van de bebossing van landbouwgronden.

Deze beleids optie brengt met zich mee dat kwalitatief hoogwaardig teeltmateriaal ter beschikking dient te zijn.

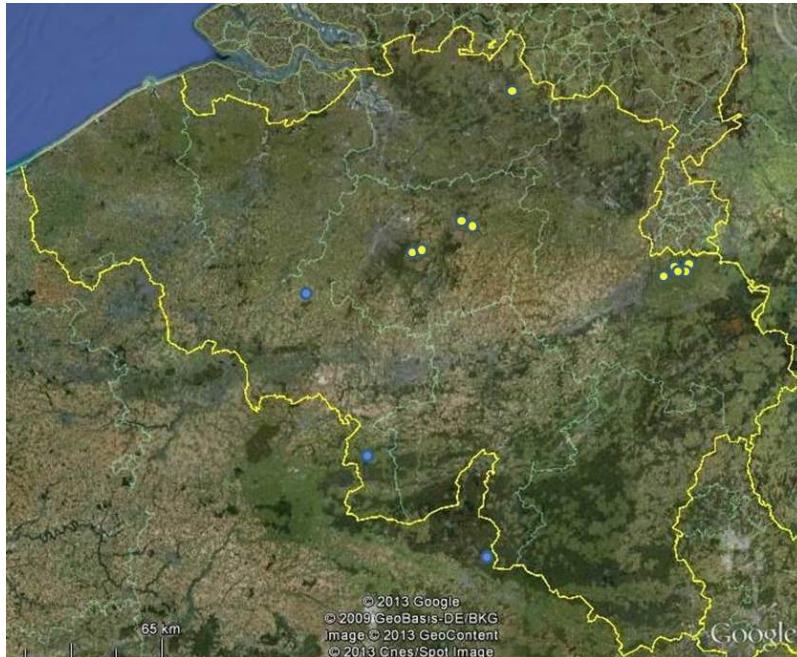
Bovendien werd vanaf 2003 boskers door de implementatie van de E.U. richtlijn 1999/105/EG van 22 december 1999 - betreffende het in de handel brengen van bosbouwkundig teeltmateriaal - een verplicht te certificeren boomsoort. Dit brengt met zich mee dat de kwaliteit van het teeltmateriaal van boskers geproduceerd op Vlaams grondgebied expliciet dient gewaarborgd.

Het aanbod aan inheems teeltmateriaal was in het verleden totaal ontoereikend gezien het lage opbrengstvermogen van het voorhanden zijnde uitgangsmateriaal. In de in 1988 aangelegde zaadboomgaard Mommedeel (0VB1502 - 0.85 ha) worden de voorbije jaren ernstige sterfteverschijnselen vastgesteld. Daarnaast beschikt Vlaanderen slechts over twee kleine zaadbestanden, met name Vrebos (5VB1005 - 0.28 ha) en Rattenberg (5VB1039 - 0.37 ha). De selectie van bijkomende zaadbestanden biedt zich bovendien niet echt aan wegens het veelal voorkomen van boskers als individuen of kleine clusters, verspreid binnen gemengde bestanden.

Sinds 1996 spitst het selectie- en veredelingsprogramma zich derhalve toe op de aanleg van een nieuwe hoogkwalitatieve én hoogproductieve klonale zaadboomgaard van boskers. De basis voor de selectie van de constituenten van de zaadboomgaard werd gevormd door een basiscollectie van 232 genotypes opgebouwd uit vier genetische “pools”:

- Pool 1: 41 individuele fenotypisch hoogwaardige bomen (plus bomen) geselecteerd in 16 populaties in Vlaanderen (*10 moederbomen geselecteerd in 7 populaties*)
- Pool 2: 126 plus bomen geselecteerd in de half-sib afstamming van een klonale aanplanting te Herne (*21 moederbomen geselecteerd*)
- Pool 3: 39 plus bomen geselecteerd in de half-sib afstamming van een populatie in Solre-Saint-Géry (*8 moederbomen geselecteerd*)
- Pool 4: 26 plusbomen geselecteerd in een natuurlijk verjongde populatie gesitueerd in Anor (FR) (*5 moederbomen geselecteerd*)

Vanaf 1996 werden 14 proefpercelen (totale oppervlakte = 22.4 ha) aangelegd met de half-sib afstamming van alle genotypes in de basiscollectie. Na jarenlange, regelmatige observatie van bosbouwkundig relevante kenmerken (groei, morfologie, fenologie, ziekteresistentie) werden in 2010 44 genotypes geselecteerd voor de aanleg in 2012 van een klonale zaadboomgaard in de proefkwekerij van het INBO te Grimminge (Fig. 1). Het aantal geselecteerde moederbomen wordt hierboven vermeld (*cursief*). De geselecteerde moederbomen werden afgeënt op de dwergvormende onderstam “Gisela 5”. De zaadboomgaard werd aangelegd volgens het systeem van leibomen (“en espalier”) met een plantafstand van 2.5 m in de lijnen en 4.0 m tussen de lijnen en beslaat een oppervlakte van 1.16 ha (i.e. 1159 bomen). Het aantal ramets (replica’s) per moederboom varieert tussen 24 en 51 (gemiddeld 27).



Figuur 1. Lokalisatie van de oorsprong van de geselecteerde genotypes. Individuele plus bomen (●), half-sib afstamming van populaties/klonale aanplantingen (●)

Doelstelling

Voorafgaand aan de aanleg van de zaadboomgaard werd als voorwaarde een voldoende genetische diversiteit van de constituenten (genotypes) vooropgesteld. Deze studie beoogt het duiden van deze genetische diversiteit.

Materiaal en methoden

In het voorjaar van 2014 werd bladmateriaal verzameld van alle genotypes aanwezig in de zaadboomgaard te Grimminge. Genomisch DNA werd geëxtraheerd uit bladmateriaal met de DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) (5 mg gevriesdroogd bladweefsel per boom).

Elk genotype werd moleculair gekarakteriseerd door gebruik van microsatellieten (SSR) merkers.

De keuze van de microsatellieten merkers was gebaseerd op een aantal criteria geformuleerd tijdens een internationale Microsatellite Workshop georganiseerd door East Malling Research (East Malling (GB), 7-8 december 2006):

- vrij beschikbaar (i.e. gepubliceerd)
- specifiek ontwikkeld voor *Prunus avium*
- hoog polymorfisme, doch gemakkelijk te scoren
- hoge Polymorphic Information Content (PIC) waarden (Nagy *et al.* 2012)
- hoge Power of Discrimination (PD) waarden (Kloosterman *et al.* 1993)
- afwezigheid van null alleles
- spreiding over het genoom, i.e. niet gelinked
- mogelijkheid tot multiplexing

Op basis van deze criteria werden uit 35 microsatellieten ontwikkeld voor boskers door Horticulture Research International (Clarke *et al.* 2003) en door East Malling Research (Vaughan *et al.* 2004) acht SSRs geselecteerd (Tab. 1). Deze SSRs konden worden gegroepeerd in twee multiplexen, bestaand uit respectievelijk vijf en drie SSRs.

Locus	SSR motif	Forward and reverse primer sequences (5'-3')	Allele size (bp)	No. Alleles	DP	PIC
Empa004	[GA] ₄ AA[GA] ₄ AA[GA] ₁₅	F: NED-ta cggta ggcttctgca a gg R: ttggca ggttctgttca ca t	180-188	4	0,79	0,63
Empa005	[CT] ₃ CAT[CT] ₁₂ T[AC] ₂₃	F: FAM-tgggtttga gca a ta tgca a R: ca cca a ta ca ca tgca ca cg	237-253	4	0,71	0,71
Empa018	[GA] ₁₈	F: FAM-tcca aga a ca a a gccca a a a tc R: a a ttca a tgca ttctgga ta g	94-106	5	0,79	0,70
EmpaS02	[TTG] ₇ CTGC[TG] ₁₀ [AG] ₈	F: FAM-cta cttcca tga ttgcctca c R: a a ca tcca ga a ca tca a ca ca c	133-145	5	0,87	0,68
EmpaS06	[CT] ₁₂	F: VIC-a agcgga a agca ca ggta g R: ttgcta gca taga a a aga a ttgta g	200-218	5	0,81	0,68
EmpaS10	[GA] ₂₈	F: NED-gcta a ta tca a a tccca gctctc R: tga aga a gta tggcttctgtgg	151-183	6	0,83	0,88
EmpaS12	[TG] ₁₀ A[GA] ₁₀ AA[GA] ₁₃	F: FAM-tgtgcta a tgcca a a a ta cc R: a ca tgca tttca a ccca ctc	122-148	5	0,83	0,73
EmpaS14	[TC] ₁₀ CCAT[TC] ₅ CCAT[TC] ₈	F: VIC-tccgcca ta tca ca a tca a c R: ttcca ca ca a a a ccca a tcc	196-210	3	0,75	0,59

Tabel 1. Selectie van microsatellieten merkers voor de duiding van de genetische diversiteit in de zaadboomgaard van boskers. De SSRs kunnen worden gemultiplexed in twee groepen (geel en groen)

De genetische diversiteit van de zaadboomgaard werd afgeleid uit de schatting van de genetische afstand tussen de aanwezige genotypes. Deze genetische afstand wordt berekend op basis van het aandeel gemeenschappelijke allelen P tussen de genotypes (Bowcock *et al.* 1994)

$$P = \frac{\sum_u S}{2u}$$

waarbij het aantal gemeenschappelijke allelen S wordt gesommeerd over alle loci u. De genetische afstand D tussen twee genotypes wordt geschat door

$$D = 1 - P$$

De D waarde werd berekend voor alle mogelijke combinaties tussen de 44 genotypes aanwezig in de zaadboomgaard te Grimminge (Annex 1).

Resultaten

De juiste keuze van de acht microsatellieten blijkt uit de hoge PIC waarden (0.68 – 0.88) en dito DP waarden (0.71 – 0.87).

De globale genetische afstand D berekend over alle genotypes in de zaadboomgaard bedraagt 0.66 ± 0.09 .

De genetische afstand werd tevens berekend tussen en binnen elk van de vier voornoemde “genetische pools” (Tab. 2).

	Pool 1	Pool 2	Pool 3	Pool 4
Pool 1	$0,64 \pm 0,12$	$0,65 \pm 0,13$	$0,64 \pm 0,12$	$0,67 \pm 0,13$
Pool 2		$0,65 \pm 0,13$	$0,66 \pm 0,14$	$0,68 \pm 0,12$
Pool 3			$0,60 \pm 0,14$	$0,67 \pm 0,11$
Pool 4				$0,73 \pm 0,09$

Tabel 2. Genetische afstand binnen en tussen elk van de genetische pools

Besluit

De gebruikte set van acht microsatellieten blijkt is geschikt voor de karakterisatie van de genetische diversiteit van boskers zoals blijkt uit de hoge PIC en DP waarden.

De variatie van de genetische diversiteit , zowel voor:

- de volledige collectie aan genotypes
- binnen de pools
- tussen de pools

blijkt miniem te zijn zoals blijkt uit de lage waarden van de standaardafwijkingen.

Het verschil in genetische diversiteit berekend binnen en tussen de Pools is zeer laag: range = 0.60 – 0.73, variantie = 0.001).

Opmerkelijk hierbij is dat:

- Normaliter een hoge genetische diversiteit werd verwacht in Pool 1. Deze bestaat immers uit 10 niet gerelateerde genotypes (plusbomen afkomstig uit zeven geografisch geïsoleerde populaties). Niettemin blijkt de genetische diversiteit (0.64) de op één na laagste te zijn.
- Anderzijds kon een lage diversiteit verwacht worden in Pool 4 aangezien deze genotypes werden geselecteerd in een natuurlijk verjongde populatie (Anor). De diversiteit blijkt echter de hoogste te zijn (0.73).

Besluitend kan gesteld worden dat de globale genetische diversiteit van de zaadboomgaard (0.66) aanvaardbaar is (De Rogatis *et al.* 2013).

Een volgende onderzoeksvraag is de vergelijking van de genetische diversiteit van de afstamming van de zaadboomgaard met die van i. natuurlijk verjongde populaties en ii. geselecteerde zaadbestanden van boskers.

Referenties

Bowcock, A.M. *et al.* 1994. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature* **368**: 455-457

Clark, J.B. and K.R. Tobutt. 2003. Development and characterization of polymorphic microsatellites from *Prunus avium* 'Napoleon'. 2003. *Molecular Ecology Notes* **3**, 578-580

De Rogatis, A., Ferazini, D., Ducci, F., Guerri, S., Carnevale, S. and P. Belletti. 2013. Genetic variation in Italian wild cherry (*Prunus avium* L.) as characterized by nSSR markers. *Forestry* **86**: 391-400

Kloosterman, D., Budowic, D. and P. Daselaar. 1993. PCR-amplification and detection of the human D1S80 VNTR locus. *Int. j. Leg. Med.* **105**: 257-264

Nagy, S., Poczai, P., Cernak, I., Gorji, A.M., Hegedüs, G. and J. Taller. 2012. PICcalc: an online program to calculate Polymorphic information content for molecular genetic studies. *Biochem. Genet.* **50**: 670-672

Vaughan, S.P. and K. Russell. 2004. Characterization of novel microsatellites and development of multiplex PCR for large-scale population studies in wild cherry, *Prunus avium*. *Molecular Ecology Notes* **4**, 429-431