

**Notkun DNA bandamynstra (DNA
fingerprinting) til aðgreiningar á
arfgerðum alaskaaspar (*Populus
trichocarpa*) með RAPD aðferðinni
(Random Amplified
Polymorphic DNA)**



**RANNSÓKNASTÖÐ
SKÓGRÆKTAR RÍKISINS**

Fjölrit Rannsóknastöðvar Skógræktar ríkisins
Nr. 10
Mái 1995

**Notkun DNA bandamynstra (DNA
fingerprinting) til aðgreiningar á
arfgerðum alaskaaspar (*Populus
trichocarpa*) með RAPD aðferðinni
(Random Amplified
Polymorphic DNA)**

**Vignir Sigurðsson^{1,2}, Kesara Anamthawat-Jónsson¹ og
Aðalsteinn Sigurgeirsson²**

¹Rannsóknastofnun Landbúnaðarins, Keldnaholti, 112 Reykjavík
²Rannsóknastöð Skógræktar ríkisins, Mógilsá, 270 Mosfellsbær

Útgefandi:

**Rannsóknastöð Skógræktar ríkisins
Mógilsá, 270 Mosfellsbær**

*Iceland Forest Research Station
Mógilsá, IS-270 Mosfellsbær, ICELAND*

EFNISYFIRLIT

Ágrip	3
Inngangur.	4
Erfðamerki og DNA greining.....	5
Um RAPD.	6
Efniviður og aðferðir.....	6
Niðurstöður	7
Umræða.....	11
Lokaorð	13
Þakkir	13
Heimildaskrá	14

Ágrip

Vignir Sigurðsson, Kesara Anamthawat-Jónsson og Aðalsteinn Sigurgeirsson. 1995. Notkun DNA bandamynstra (DNA fingerprinting) til aðgreiningar á arfgerðum alaskaaspar (*Populus trichocarpa*) með RAPD aðferðinni (Random Amplified Polymorphic DNA). Fjölrit Rannsóknastöðvar Skógræktar ríkisins nr. 10.

RAPD aðferðinni var beitt til að aðgreina níu tré af alaskaösp (*Populus trichocarpa* Torr. & Gray) sem öll eru af sama kvæminu. Til að leiða í ljós RAPD- erfðamerki sem hægt væri að nota til aðgreina klónana, voru notaðir tíu mismunandi 10-basa vísar. Af þessum tíu vísnum mynduðu níu þeirra skýr DNA bönd, þar af voru tveir vísar sem gáfu bandamynstur sem gátu aðgreint alla klónana. Átta klónar voru aðgreindir úr þeim níu trjám sem sýni voru tekin af. Tvö tré voru með eins bandamynstur hjá hverjum vísi fyrir sig og því ályktað að þau séu af sama klóni. RAPD aðferðin er öflug þó að hún sé í eðli sínu einföld; einn vísir nægir til þess að aðgreina klóna en nota má fleiri en einn vísir til að auka nákvæmni og draga úr líkunum á samskonar bandamynstri hjá mismunandi arfgerðum.

Abstract

Vignir Sigurðsson, Kesara Anamthawat-Jónsson and Aðalsteinn Sigurgeirsson. 1995. DNA fingerprinting of *Populus trichocarpa* clones using RAPD markers. Iceland Forest Research Station Report no. 10.

Nine trees from a single, natural population of black cottonwood (*Populus trichocarpa* Torr. & Gray) in Alaska were screened for randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers with ten different 10-base oligonucleotide primers of arbitrary sequence in order to evaluate the use of RAPD analysis for distinguishing black cottonwood clones. Of the ten primers used, nine primers amplified the genomic DNA targets, and two were able to differentiate all clones. Eight clones were distinguished among the nine tree samples assayed. Two trees showed identical band patterns by all primers used, and therefore it is suggested that these trees are members of the same clone. The RAPD fingerprinting method is simple and powerful - one single primer can distinguish different clones, while the use of multiple primers reduces fingerprint similarity and resolves discrepancies.

Lykilorð/Key words: Alaskaösp (*Populus trichocarpa*)
Klónn (clone)
Erfðamark (Genetic marker)
Vísir (Primer)
RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)
DNA bandamynstur (DNA fingerprint)

Inngangur

Alaskaösp (*Populus trichocarpa* Torr. & Gray) er trjátegund af víðiætt (Salicaceae). Uppruni hennar er í vesturhluta N-Ameríku þar sem hún vex allt frá Alaska í norðri til Californíu í suðri. Líkt og í sínum náttúrlegu heimkynnum er alaskaöspin í norðvestur Evrópu meðal þeirra aspartegunda sem hefur hvað mest hefur verið notuð til skógræktar (Mühle-Larsen 1976; Langhammer 1976).

Alaskaösp var fyrst flutt inn hingað til Íslands frá Alaska árið 1944 (Sigurður Blöndal 1977; Vigfús Jakobsson 1947) og er því áratuga reynsla af veru þessarar tegundar hérlandis. Síðan hafa margar söfnunarferðir verið farnar vestur um haf og er fjöldi innfluttra klóna og kvæma töluverður. Reynslan af þeim er misjöfn en skipulögðu aðhaldi og varðveislu á því efni sem flutt hefur verið inn verið ábótavant.

Alaskaösp er nær eingöngu fjölgað með græðlingum. Síðastliðin ár hefur ræktun hennar stóraukist og er henni plantað í miklu magni árlega. Rannsóknastöð Skógræktar ríkisins hefur í ljósi þessa staðið að ýmsum tilraunum sem miða að því að bæta ræktunina (Úlfur Óskarsson 1990; Úlfur Óskarsson og fl. 1990; Verkefnaskrá 1993). Engu að síður er ljóst að hámarks árangri verður seint náð nema sá efniviður sem til er í landinu sé vel skilgreindur.

Stór hluti þeirra plantna sem nú eru í ræktun er úr söfnunarferð sem farin var af Hauki Ragnarssyni á vegum Skógræktar ríkisins árið 1963. Til er ættbók þessara trjáa (Líneik A. Sævarsdóttir & Úlfur Óskarsson 1990) þar sem skráðir eru 89 klónar og þeir flokkaðir eftir svipfari (útliti laufblaða, krónulögun, lit og útliti barkar, breytileika í laufgunar- og lauffallstíma). Svona flokkun er gagnleg, en slíku mati á breytileika er ekki hægt að treysta fullkomlega. Umhverfisþættir eru margir og hafa mismunandi áhrif. Einnig má ekki gleyma því að kynslóðabilið er oft langt hjá trjám og ýmsir mikilvægir eiginleikar koma margir hverjir ekki fram fyrr en einstaklingurinn hefur náð kynþroska.

Það gefur auga leið að það að vita ekki nákvæmlega hversu margar arfgerðir búa að baki þeim trjám sem hér eru í ræktun, stendur eðlilegri framvindu kynbóta-verkefna fyrir þrífum.

Í þessu verkefni er beitt nýlegri aðferð til að aðgreina klóna sem byggist á skoðun erfðavísa sem ekki verða fyrir áhrifum umhverfisþátta. Aðferðin nefnist Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) og var fyrst lýst árið 1990 (Williams og fl. 1990) og hefur hún á stuttum tíma sannað ágæti sitt og verið mikið notuð við kortlagningu erfðaeftna, stofnerfðafræði, flokkunarfræði og DNA-bandamynstra greiningu (Tingey og fl. 1991; Chapco og fl. 1992; Koller og fl. 1993; Reiter og fl. 1992).

Erfðamerki og DNA greining.

Erfðamerki (genetic markers) eru til af ýmsum gerðum. Þegar þau eru notuð til að meta hvort einstaklingar séu erfðafræðilega eins eða ekki er sú aðferð kölluð DNA-bandamynstursgreining (DNA-fingerprinting) og er þar vísað til aðferðar sem um árabíl hefur verið notuð innan réttarlæknisfræðinnar.

Með aukinni tækni og þekkingu hefur rannsóknum í skógrækt, þar sem notast er við erfðavísa, farið mjög fram og stöðugt er verið að þróa nýjar aðferðir (Neale og fl. 1992). Samsætuvísar (isozyme markers) auk annarra lífefnavísa (biochemical markers) hafa verið notaðir töluvert undanfarin áratug m.a. við rannsóknir á breytileika og til aðgreiningar meðal aspartegunda. (Hyun og fl. 1987; Cheliak og fl. 1984). Síðan hafa verið þróaðar aðferðir til að mynda DNA-erfðamerki. Hér er aðallega átt við RAPD og skerðibútagreiningu (RFLP)¹ Þessi DNA tengdu erfðamerki hafa margt umfram lífefnafræðilegu erfðamerkin. Í fyrsta lagi er fjöldi DNA-erfðamerkjanna geysilega mikill, í öðru lagi fæst sama niðurstaða óháð því af hvaða hluta plöntunnar sýni eru tekin, ólíkt því sem oft er raunin með samsætuvísana. Síðast en ekki síst hafa umhverfisþættir engin áhrif á þessa erfðavísa.

Aðferðirnar tvær, RFLP og RAPD, hafa hvor um sig sína kosti og galla.

RAPD aðferðin hefur ma. það framyfir RFLP að hún er ódýrari og fljótlegri, en ekki verður nánar vikið að samanburði hér (sjá Neale og fl.1992).

¹ RFLP=Restriction fragment length polymorphisms. DNA greiningaraðferð þar sem skerðiensím eru notuð til að búa niður erfðaeftnið og síðan beitt ákveðinni tækni til að finna breytileika innan þess.

Um RAPD.

Fyrst var greint frá þessari aðferð árið 1990 og hefur hún á fáum árum verið mikið notuð og sannað ágæti sitt.

Þessi aðferð byggist á því að nota vísi (primer) með einhverri slembibasaröð (random base sequence). Ef slíkur vísir hefur stutta basaröð er nokkuð víst að samstæðar basaraðir munu vera margar í því erfðamengi sem verið er að rannsaka. Ef þessi tíðni er næg, er líklegt að tvær samstæðar basaraðir við vísinn séu ekki aðeins nálægt hver annarri heldur líka að þær snúi hver að annarri (Oliver 1990). Við þessar aðstæður mun tenging vísisins mynda magnaða búta með hjálp hitapolins DNA fjölliðunarensíms (DNA polymerase enzyme) eftir ákveðna meðhöndlun í PCR² tæki (Mullis 1990). DNA bútamir geta verið mismunandi eftir einstaklingum eða tegundum sem verið er að rannsaka. Þessir vísar geta þar með sýnt fjölbreytni (polymorphism) og verkað sem erfðamerki við kortlagningu erfðamengja og DNA bandamynstursgreiningu.

Engin erfða- eða sameindafræðileg þekking þarf að vera til um þá á lífveru sem verið er að rannsaka hverju sinni til að beita þessari aðferð. Því er hægt að nota hana við margskonar rannsóknir eins og áður var nefnt.

² PCR= Polymerase chain reaction. Aðferð til að fjölfalda erfðaeefnið eða hluta þess.

Efniviður og aðferðir.

a) Tilraunaplöntur.

Rannsóknastöð skógræktar ríkisins útvegaði plöntur í rannsóknina. Um er að ræða sýni af vefjaræktuðum öspum sem upphaflega voru fengin úr söfnunarferð Sørensen Ødum og Tronds Leivssonar til Alaska árið 1988 (Skaret og Rosvall 1993). Allar eru þær frá sama upprunastað (East Cordova, Alaska, 60°28 norðlægrar breiddar og 145°24 vestlægrar lengdar. H.y.s 25 m). Númer á klónum fylgja númerakerfi Rannsóknastöðvar Skógræktar ríkisins. Eftirfarandi klónanúmer voru notuð:

88-460-002
88-460-012
88-460-021
88-460-035
88-460-040
88-460-050
88-460-056
88-460-071
88-460-089

Eftirfarandi skammstafanir verða hér notaðar til þess að auðkenna þessa klóna: 2, 12, 21, 35, 40, 50, 56, 71 og 89.

b) DNA einangrun.

DNA var einangrað úr tíu plöntum, þar af voru tvö aðgreind sýni tekin af sömu plöntunni til samanburðar (klónn nr. 12). Beitt var CTAB aðferðinni (Doyle og Doyle 1990) með breytingum fyrir trjátegundir (Anamthawat-Jónsson og Heslop Harrison; handrit í undirbúningi).

DNA styrkur var fenginn með samanburði á öðrum rafdrengnum mældum sýnum.

c) PCR keyrslur.

Hver RAPD keyrsla var 50µl að heildarrúmmáli og innihélt eftirfarandi: dATP, dTTP, dCTP og dGTP - 200µM af hverju, 100 ng DNA, 200mM af 10-basa oligonucleotide primer (vísir) (frá Operon Technologies, USA; kit AA; OPAA 01-OPAA 10). Dynazyme dúi (buffer) (10mM Tris-cl, pH 8.8, 1.5mM MgCl₂ - (heildarmagn MgCl₂ = 3.5 mM), 0,6 einingar af Dynazyme DNA fjölliðunarensími (DNA polymerase) frá Genis, Íslandi; (unnið úr *Rhodothermus brockianus*). Fyllt var upp að heildarrúmmáli með H₂O. Til að hindra uppgufun var 60µl af paraffin olíu sett yfir. PCR keyrsla innihélt 40 "hringi" (cycles) sem hver samanstóð af 1 mín. í 90°C, 1 mín. í 35°C og 2 mín. í 72°C. Lokahringurinn var með 72°C í 5 mín. Sýni voru rafdrengin í 2.0 % agarosa hlaupi með TAE buffer (40mM Tris, 100mM EDTA, pH 8.0) sem innihélt 0,5µg/ml af ethidium bromide. Sýni voru lýst upp í UV-ljósaborði. Myndir voru teknar á Polaroid 665 og 667 filmur.

Í hverri RAPD keyrslu var eitt sýni sem ekki innihélt DNA (negative control) auk hinna sem innihéldu DNA. Hver vísir var endurtekinn á flestöllum sýnunum til að kanna stöðugleika og reyndist hann vera í öllum tilvikum.

Niðurstöður

Tíu vísar voru prófaðir á öll tíu sýnin. Allir nema einn (OPAA-05) gáfu fjölfölduð DNA bönd (Tafla 1). Böndin voru á bilinu 200bp-2kb að stærð (Mynd 1). Fjöldi banda var breytilegur eftir því um hvaða vísi og DNA sýni var að ræða. (Mynd 1 og 2)

Við úrvinnslu á gögnum voru aðeins notuð þau bönd sem voru sterk og greinileg (intensive). Bönd sem sýndu minna en helmingi minni styrk en sterkustu böndin voru ekki tekin með. Að þessu gefnu var fjöldi bandamynstra sem hver vísir gaf fundinn (Tafla 1). Vísir AA-05 sýndi enga mögnun. Vísir AA-10 sýndi mestan fjölda fingrafara eða samtals átta. Aðrir vísar voru með tvö til sjö mismunandi mynstur. Sýni af klón nr. 12 sem tekin voru hvort í sínu lagi sýndu alltaf sama mynstrið með öllum vísnum.

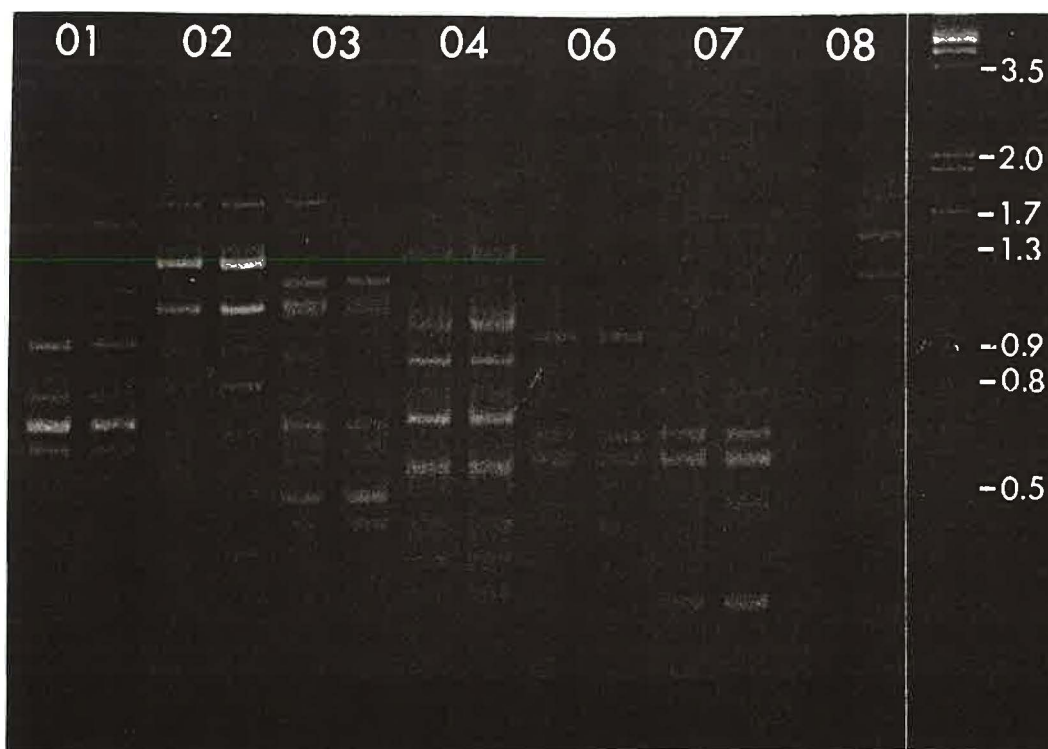
Tafla 1. Basaraðir vísanna og fjöldi þeirra fingrafara sem fékkst með hverjum þeirra.

Nr. á vísun	Basaröð (5' til 3')	Fjöldi fingrafara
OPAA-01	AGACGGCTCC	4
OPAA-02	GAGACCAGAC	5
OPAA-03	TTAGCGCCCC	5
OPAA-04	AGGACTGCTC	6
OPAA-05	GGCTTTAGCC	0
OPAA-06	GTGGGTGCCA	4
OPAA-07	CTACGCTCAC	7 *
OPAA-08	TCCGCAGTAG	2
OPAA-09	AGATGGGCAG	5
OPAA-10	TGGTCGGGTG	8

(* ekki athugað fyrir klón 71)

Tré nr. 2 og nr. 50 sýndu einnig eins mynstur hjá öllum vísun (Mynd 1.) sem

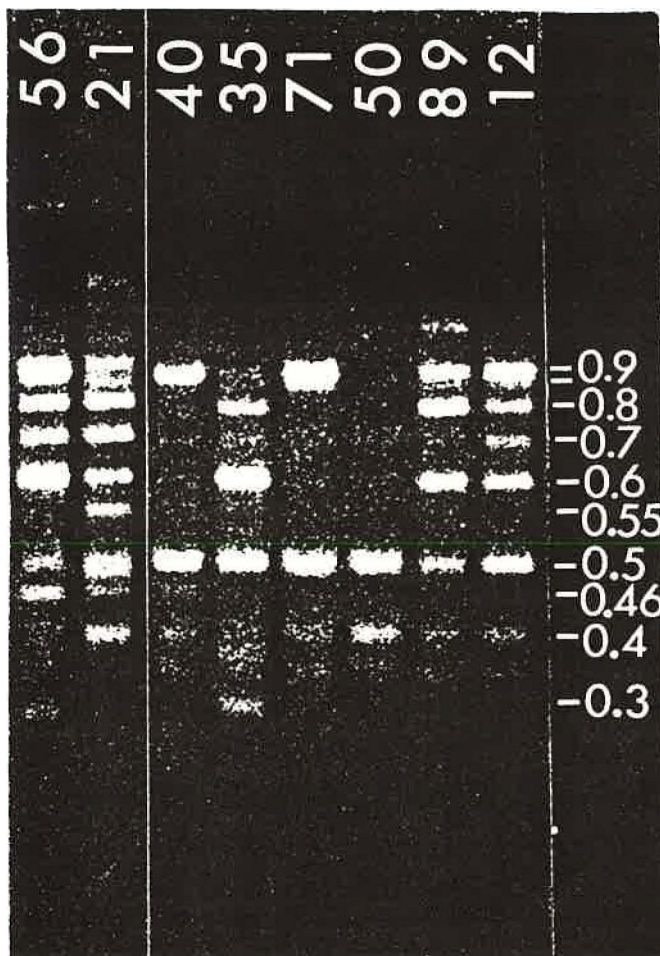
bendir til þess að þessi tré séu af eina og sama klóninum



Mynd 1. Myndin sýnir eins bandamynstur hjá trjám nr. 2 og 50 með sjö mism. vísun. Númer á vísun (OPAA-) er fyrir ofan brautimar en til hliðar er *lambda* mælikvarði sem sýnir stærð banda í kb.

Tveir vísar gátu aðgreint alla klónana, fyrir utan klónanúmerin 2 og 50. Vísir OPAA-07 aðgreindi 7 klóna (þó ekki athugað fyrir klón nr. 71) og vísir OPAA-10 aðgreindi öll átta sýnin (Mynd 2). Stærð þeirra banda sem farið var eftir er sýnd í töflu 2. Níu RAPD erfðamerki fengust með vísir

OPAA-07 og tíu RAPD erfðamerki með vísir OPAA-10. Mynd 2 og tafla 2 sýna að sum erfðamerki eru sameiginleg öllum klónum (07-280;10-500), önnur eru sérstök fyrir hvern klón (07-920;10-550) og enn önnur finnast hjá tveimur eða fleiri klónum (07-750;10-800).



Mynd 2.

Mögnun á erfðafni alaskaaspar sem sýnir átta mismunandi RAPD bandamynstur fengin með vísir OPAA-10. Númer fyrir ofan brautir vísa til trjáa en til hliðar er stærð RAPD erfðamerkjanna í kb.

Tafla 2. RAPD erfðamerki sem fengust með tveimur vísnum (OPAA-07 og OPAA-10) hjá átta klónum. Erfðamerkin eru merkt með númeri vísis og stærð bandanna í basapörum. Plúsmerki (+) gefur til kynna að erfðamerki er til staðar en mínusmerki (-) að það vantar. (++) merkir að um tvö bönd er að ræða. Sjá mynd 2 fyrir vísí OPAA-10. (eg= engin gögn)

RAPD- Erfðamerki	Trjánúmer							
	56	21	40	35	71	50/2	89	12
07-250	-	-	-	-	eg	-	-	+
07-280	+	+	+	+	eg	+	+	+
07-450		+			eg		+	
07-570	+	+	+	+	eg	+	+	+
07-600		+			eg		+	+
07-750		+		+	eg			+
07-920	+				eg			
07-1100			+		eg		+	
07-1730					eg		+	+
10-300				+				
10-400		+				+		
10-460	+							
10-500	+	+	+	+	+	+	+	+
10-550		+						
10-600	+	+		+			+	+
10-700	+	+						+
10-800	+	+		+			+	+
10-900	++	+	+		++		+	+

Úr töflu 2 voru fundnar út líkurnar á því að tvö mismunandi tré hafi ens bandamynstur. Þá eru bandamynstur milli allra trjáa borin saman tvö og tvö (similarity index).

Niðurstöðurnar eru í töflu 3. Vísir OPAA-10 aðgreinir alaskaösp betur en vísir OPAA-07, en með því að leggja saman niðurstöður beggja vísa fæst betri aðgreining en sé notaður einn vísir

Tafla 3. Svipfestuvísitala (Similarity index) sem fundin er úr gögnum sem sýnd eru í töflu 2. Hún segir til um líkur á því að óskyldir einstaklingar hafi eins bandamynstur. Niðurstöður eru fengnar með $x=2n_{ab}/(n_a+n_b)$ þar sem n_a og n_b er fjöldi banda sem eru í einstaklingum a og b og n_{ab} segir til um fjölda banda sem eru bæði á a og b (Wetton og fl. 1987; Rogstad og fl. 1991). Fjöldi einstaklinga með vísi AA-07 er sjö, en með vísi AA-10 eru þeir átta, þannig að fjöldi samanburða er annarsvegar 21 (AA-07) en hinsvegar 28 (AA-10). Líkurnar á sama bandamynstri = x^n , þar sem n er meðaltal banda sem voru notuð við úrvinnslu hjá hverjum einstaklingi (Jeffreys og fl. 1985a)

Vísir	Meðaltal (staðalfrávik)	Meðalfjöldi banda	Líkur
OPAA-07	0,62 (0,13)	4,375	$2,88 \cdot 10^{-2}$ (1/35)
OPAA-10	0,52 (0,19)	4,375	$1,43 \cdot 10^{-2}$ (1/70)
07 + 10	0,55 (0,13)	8,422	$1,94 \cdot 10^{-3}$ (1/515)

Umræða

Þessi skýrsla er sú fyrsta sem birt er um aðgreiningu á arfgerðum alaskaaspar þar sem RAPD aðferðinni er beitt. Átta af níu trjám voru aðgreind og tvö eru talin hafa verið af sama klóninum. Þessi rannsókn sýnir að einn einstakur vísir getur aðgreint ólíkar arfgerðir og með því að nota fleiri vísa er hægt að staðfesta aðgreininguna enn betur.

Aðgreining þessi er byggð á RAPD bandamynstrum sem eru ótvírætt margbreytileg meðal arfgerða (þ.e. annað hvort eru böndin til staðar eða ekki) og aðgreininguna er sums staðar hægt að staðfesta með einstökum RAPD erfðamerkjum (tafla 2). Bönd sem eru ekki augljóslega vel mögnuð eru ekki tekin með og eykur það nákvæmnina við aðgreininguna. Einnig var af fremsta megni reynt að draga úr þeim þáttum sem geta

haft neikvæð áhrif á RAPD keyrsluna að einhverju leyti (Devos og Gale 1992).

Aðgreining með RAPD aðferðinni hefur verið beitt á nokkrar plöntutegundir með góðum árangri s.s. hrísgrjón (Fukuoka og fl. 1992), bygg (Tinker og fl. 1993), epli (Koller og fl. 1993) og kakóplöntur (Russell og fl. 1993; Wilde og fl. 1992). Hinsvegar hefur möguleikinn á því að beita RAPD aðferðinni til að aðgreina einstaklinga innan stofna (kvæma; erfðahópa) ekki verið kannaður til hlítar. Þessi rannsókn á alaskaösp sannreynir það að RAPD aðferðin er vel nothæf til aðgreiningar á klónum.

RFLP greiningu á DNA mynstri hefur verið beitt á nóturösp (*Populus tremuloides*, Michx) (Rogstad og fl. 1991) þar sem notast var við M13 sem þreifara (probe), en M13 er þreifari í hópi

minisatellite DNA sem getur fundið óðafjölbreytileg set í erfðamengi mannsins (Jeffrey et al. 1985b). Líkurnar á því að eins mynstur finnist með M13 aðferðinni er svipaðar og með RAPD aðferðinni sem fékkst í þessari tilraun þ.e. 10^{-4} (M13) samanborið við 10^{-3} (RAPD). Hjá óskyldum einstaklingum meðal manna eru þessar tölur 10^{-11} (Jeffrey og fl. 1985a) og hjá gráspörvum 10^{-14} (Wetton et al. 1987). Þessar tölur eru ekki ósennilegar sé tekið tillit til genaflæðis í hverri tegund. Þó má geta þess að í þessari tilraun voru aðeins prófaðir tíu vísar sem er mjög lítið miðað við það sem algengt er. Afar líklegt er að aðrir og fleiri vísar sýni meiri fjölbreytni og aðgreini klónana betur. Einnig verður að hafa í huga að öll sýnin í þessari tilraun eru af sama kvæminu. Í tilraun Rogstads var t.d. 6 km á milli sýnatökustaða.

Meðal plantna er hlutfall eins bandamynstra hugsanlega háð því hversu arfblendni er mikil. Askhlynur (*Acer negundo* L.) hefur hátt hlutfall af innrækt og þar er gildi fyrir bandamynsturssamsvörun (fingerprint similarity) frekar hátt þ.e. 10^{-2} (Nybom og Rogstad 1990) sem er svipað og á ágræddum gúmmítrjám sem er 10^{-2} (Besse og fl. 1993). Alaskaöspin er hinsvegar vindfrævuð tegund og því ætti arfblendni að vera töluverð. Hvort að líkurnar á eins bandamynstrum sem fékkst í þessari tilraun séu ásættanlegar út frá þessum staðreyndum er erfitt að segja til um. Fróðlegt verður að sjá útkomu hvað þetta varðar þegar og ef klónasafnið verður allt kannað með þessari aðferð.

RAPD bandamynstur af trjám nr. 2 og 50 eru eins með öllum vísnum sem notaðir voru, bæði hvað varðar dauf og sterk bönd (Mynd 1.) Niðurstaða okkar er því sú að þessi tvö sýni séu af sama klóninum. Það er vitað að tvö eða fleiri aspartré í náttúrulegu umhverfi geta verið með sömu arfgerð, því alaskaösp líkt og aðrar aspir vaxa auðveldlega upp frá rótaskotum og stúfsprotum felldra trjáa (Fowells 1965; Heilman og Stettler 1990). Einnig er hugsanlegt að toppur eða grein brotni af og nái að rætast á öðrum stað t.d. neðar meðfram á eða fljóti (Schroeder og Walker 1991).

Kostir RAPD greiningar eru margir. Helstir eru einfaldleiki hennar og aðgangur að mörgum ólíkum vísnum. Með því að nota marga ólíka vísa eykst nákvæmnin töluvert. Eins og sýnt er í þessari skýrslu (Tafla 3) eru líkurnar á sama mynstri mun minni þegar tveir vísar eru notaðir (1 af 515) en þegar einn vísir er notaður (1 af <100). Líkurnar á því að óskyldir klónar hafi sama bandamynstrið minnka jafnvel enn frekar ef notaðir eru fleiri vísar við greininguna.

Lokaorð

Mikil og ör þróun hefur átt sér stað í rannsóknum þar sem erfðataekni, líftækni og sameindaerfðafræðilegri þekkingu er beitt. Skógrækt er þar ekki undanskilin. Hérlandis hefur nú verið byggð upp aðstaða og kunnátta sem brýnt er að nýta skógrækt og trjárækt til framdráttar. Þessi þekking gæti orðið lyftistöng fyrir

erfðarannsóknir og kynbætur á trjátegundum, jafnt innlendra sem innfluttra.

Aðferðin sem notuð var í þessu verkefni reyndist vel og því ekkert til fyrirstöðu að beita henni á það safn asparklóna sem til er í landinu og ætlað er til kynbóta. Einnig má hugsa sér að nýta þessa aðferð til annars en að aðgreina klóna. Má þar nefna möguleikan á því að staðsetja ákveðin landfræðileg svæði m.t.t. hámarks erfðafjölbreytni (Chalmers og fl.

1992; Huff og fl. 1993) og til að fá mat á skyldleika milli klóna sem nota skal til víxlunar (Yu og Pauls 1993). Samfara þessu mætti hugsa sér tengslakort unnið úr RAPD erfðamerkjum einum (Tingey og fl. 1991; Haley og fl. 1993) eða sett saman með öðrum erfðamerkjum t.d. RFLP og STS (sequence tagged site). Loks má slá því föstu, með hliðsjón af óbirtum niðurstöðum okkar, að þessari aðferð megi beita á aðrar trjátegundir með sama góða árangri.

Þakkir

Þetta verkefni fellur undir hluta af styrkveitingu frá Rannsóknarráði ríkisins og Framleiðnisjóði landbúnaðarins til handa Rannsóknarstofnun landbúnaðarins, Landgræðslu ríkisins og Skógræktar ríkisins til að koma á fót rannsóknarstofu í sameinda- og frumerfðafræði nytjaplantna.

Haukur Ragnarsson las yfir handrit og færði margt til betri vegar.

Heimildaskrá

- Besse, P., Lebrun, P., Seguin, M. & Lanaud, C. 1993. DNA fingerprints in *Hevea brasiliensis* (rubber tree) using human minisatellite probes. *Heredity* **70**:237-244.
- Chalmers, K.J., Waugh, R., Sprent, J.I., Simons, A.J. & Powell, W. 1992. Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculata* using RAPD markers. *Heredity* **69**:465-472.
- Chapco, W., Ashton, N.W., Martel, R.K.B., Antonishyn, N. & Crosby, W.L. 1992. A feasibility study of the use of random amplified polymorphic DNA in the population genetics and systematics of grasshoppers. *Genome* **35**:569-574.
- Cheliak, W.M. & Pitel, J.A. 1984. Electrophoretic identification of clones in trembling aspen. *Can. J. For. Res.* **14**:740-743.
- Devos, K.M. & Gale, M.D. 1992. The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. *Theor. Appl. Genet.* **84**:567-572.
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**:13-15.
- Fowells, H.A. 1965. Silvics of forest trees of the United States. USA Forest Service Agriculture Handbook. No. **271**:508-513.
- Fukuoka, S., Hosaka, K. & Kamijima, O. 1992. Use of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) for identification of rice accessions. *Jpn. J. Genet.* **67**:243-252.
- Haley, S.D., Miklas, P.N., Stavely, J.R., Byrum, J. & Kelly, J.D. 1993. Identification of RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean. *Theor. Appl. Genet.* **86**:505-512.
- Heilman, P.E. & Stettler, R.F. 1990. Genetic variation and productivity of *Populus trichocarpa* and its hybrids. IV. Performance in short-rotation coppice. *Can. J. For. Res.* **20**:1257-1264.
- Huff, D.R., Peakall, R. & Smouse, P.E. 1993. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss (*Buchloë dactyloides* (Nutt) Engelm. *J. Theor. Appl. Genet.* **86**:927-934.
- Hyun, J.O., Rajora, O.P. & Zsuffa, L. 1987. Genetic variation in trembling aspen in Ontario based on isozyme studies. *Can. J. For. Res.* **17**:1134-1138.
- Jeffreys, A.J., Wilson, V. & Thein, S.L. 1985a. Individual-specific "fingerprints" of human DNA. *Nature* **316**:76-79.
- Jeffreys, A.J., Wilson, V. & Thein, S.L. 1985b. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature* **314**:67-73.
- Koller, B., Lehmann, A., McDermott, J.M. & Gessler, C. 1993. Identification of apple cultivars using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* **85**:901-904.
- Langhammer, Á. 1976. Poplar breeding in Norway. Í: Proc.XVI IUFRO World Congress, Oslo, Div.II.,bls. 198-205.

- Líneik A. Sævarsdóttir & Úlfur Óskarsson. 1990. Ættbók alaskaaspar á Íslandi. I: Safnið frá 1963. Rannsóknastöð Skógræktar Ríkisins, Mógilsá. Rit 4 (10).
- Mullis, K.B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* **262**:36-43.
- Mühle-Larsen, C. 1976. Recent advances in poplar breeding. *Int. Rev. For. Res.* **3**:1-67.
- Neale, 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 Forests* **6**:391-407.
- Nybom, H., & Rogstad, S.H. 1990. DNA "fingerprints" detects genetic variation in *Acer negundo* (*Aceraceae*). *Pl. Syst. Evol.* **173**:49-56.
- Oliver, R.P. 1990. DNA polymorphisms revealed using PCR and arbitrary primers. *Biological research in Norwich*. Issue no 5. Winter 1990. Bls. 4.
- Reiter, R.S., Williams, J.G.K, Feldmann, K.A., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. & Scolnik, P.A. 1992. Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol.**89**:1477-1481.
- Rogstad, S.H., Nybom, H. & Schaal, B.A. 1991. The tetrapod "DNA fingerprinting" M13 repeat probe reveals genetic diversity and clonal growth in quaking aspen (*Populus tremuloides*, *Salicaceae*). *Pl. Syst. Evol.* **175**:115-123.
- Russell, J.R., Hosein, F., Johnson, E., Waugh, R. & Powell, W. 1993. Genetic differentiation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) populations revealed by RAPD analysis. *Mol. Ecol.* **2**:89-97.
- Schroeder, W.R. & Walker, D.S. 1991. Effect of cutting position on rooting and shoot growth of two poplar clones. *New Forests* **4**:281-289.
- Sigurður Blöndal. 1977. Innflutningur trjátegunda til Íslands. Í: Skógarmál, bls 173-223. Reykjavík.
- Skaret, G. & Rosvall, O. 1993. Seed collections from North American trees for marginal sites in the Nordic countries, bls. 277-291. Í: Alden, J., Mastrantonio, J.L. & Ødum, S. (Eds.), *Forest Development in Cold Climates*, Plenum Press, New York.
- Tingey, S.V., Rafalski, J.A., Williams, J.G.K. & Sebastian, S. 1991. Soybean genome analysis: DNA polymorphisms are identified by oligonucleotide primers of arbitrary sequence, bls. 263-268 í : Herrmann, R.G. & Larkins, B. (Eds) *Plant Molecular Biology* 2. Plenum Press, New York.
- Tinker, N.A., Fortin, M.G. & Mather, D.E. 1993. Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationships in spring barley. *Theor. Appl. Genet.* **85**:976-984.
- Úlfur Óskarsson, Þorbergur H. Jónsson & Kristján Þórarinsson. 1990. Hraðfjölgun á alaskaösp I. Áhrif klippingar á laufum og toppi á líf og vöxt smágræðlinga. *Búvísindi* **4**:37-40

- Úlfur Óskarsson & Kristján Þórarinsson. 1990. Hraðfjölgun á alaskaösp II. Áhrif mismunandi ræktunarmoldar á líf og vöxt smágræðlinga. *Búvísindi* **4**:41-48.
- Verkefnaskrá 1993. Rannsóknastöð Skógræktar ríkisins. Mógilsá.
- Vigfús Jakobsson. 1947. Aspirnar frá Alaska. *Ársrit Skógræktarfélags Íslands* **1947**: 28-34.
- Wetton, J.H., Carter, R.E., Parkin, D.T. & Walters, D. 1987. Demographic study of a wild house sparrow population by DNA fingerprinting. *Nature* **327**:147-149.
- Wilde, J., Waugh, R. & Powell, P. 1992. Genetic fingerprinting of *Theobroma* clones using randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theor. Appl. Genet.* **83**:871-877.
- 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. *Nucleic Acids Res.* **18**:6531-6535.
- Yu, K. & Pauls, K.P. 1993 Rapid estimation of genetic relatedness among heterogenous populations of alfalfa by random amplification of bulked genomic DNA samples. *Theor. Appl. Genet.* **86**:788-794.