

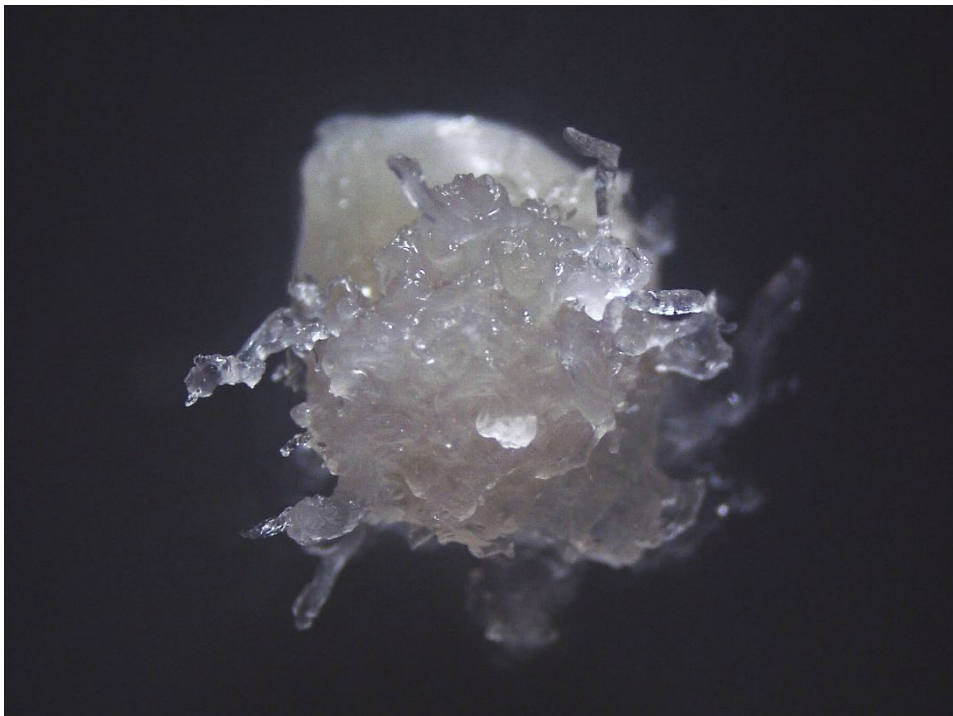


Skillnader mellan granindivider gällande initieringsfrekvens för somatisk embryogenes

*Differences in somatic embryogenesis initiation rates between
individual trees of Norway spruce*

JOSEFINE BJÖRS

JONATHAN SJÖGREN



Examensarbete i skogshushållning, 15 hp

Serienamn: Examensarbete /SLU, Skogsmästarprogrammet 2023: 01

SLU-Skogsmästarskolan

Box 43

739 21 SKINNSKATTEBERG

Tel: 0222-349 50

Skillnader mellan granindivider gällande initieringsfrekvens för somatisk embryogenes

Differences in somatic embryogenesis initiation rates between individual trees of Norway spruce

Josefine Björs

Jonathan Sjögren

Handledare: Daniel Gräns, Elisabeth Wallin (båda från SLU Skogsmästarskolan) samt Ulrika Egertsdotter (SLU Institutionen för skoglig genetik och växtfysiologi)

Examinator: Staffan Stenhag, SLU Skogsmästarskolan

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: Självständigt arbete (examensarbete) med nivå och fördjupning G2E med möjlighet att erhålla kandidat- och yrkesexamen

Kurstitel: Kandidatarbete i Skogshushållning

Kursansvarig institution: Skogsmästarskolan

Kurskod: EX0938

Program/utbildning: Skogsmästarprogrammet

Utgivningsort: Skinnskatteberg

Utgivningsår: 2023

Omslagsbild: Tidiga stadier av somatiska embryon (proembryogena massor) initierade från fröembryo via somatisk embryogenes, *Picea abies*. Foto: Josefine Björs

Elektronisk publicering: <https://stud.epsilon.slu.se>

Serietitel: Examensarbete/SLU, Skogsmästarprogrammet

Delnummer i serien: 2023: 01

Nyckelord: Skogsträdsförädling, *Picea abies*, fröklonförökning



Sveriges lantbruksuniversitet
Skogsvetenskapliga fakulteten
Skogsmästarskolan

Sammanfattning

Gran (*Picea abies*) har länge varit ett viktigt trädslag för den svenska skogsnäringen. Skogsbruket står inför en oviss framtid och med ett alltmer ostadigt klimat behövs ett genetiskt material som kan klara dessa nya prövningar. Målet är ett stort utbud av granmaterial med egenskaper som god tillväxt, högklassig virkeskvalitet och den alltmer nödvändiga förmågan att stå emot skadeinsekter och patogena svampar. En del i detta arbete för granens framtid är somatisk embryogenes (SE) som är en form av vegetativ förökning. SE är i sig en kostsam och tidskrävande process vilket gör att behovet av att välja ut träd med god initieringsframgång är av högsta prioritet. I denna studie undersöktes individer tillhörande olika trädfamiljer, gällande deras kapacitet i SE-initieringsförmåga.

Resultatet från studien kommer utgöra en grund för att i ett annat projekt undersöka om initieringsfrekvensen kan sammankopplas (associeras) med molekylära markörer i en 'Genome-Wide Association Study (GWAS)'. Studien ingår därmed i ett forskningsprojekt 'GWAS: Marker-based earlier selection for high somatic embryo-initiation in Norway spruce' för den efterföljande associationsstudien. Projektet är finansierat av 'UPSC Kompetenscentrumprojekt' tillsammans med Umeå Plant Science Centre (UPSC), Sveriges lantbruksuniversitet, Skogforsk och SweTree Technologies.

Materialet till projektet utgjordes av omogna embryon från grankottar från olika moderträd plockade i klonarkiv i Ekebo (Svalöv) samt Maltesholm (Tollarp). Försöken genomfördes i Skogsmästarskolans laboratorium i Skinnskatteberg sommaren 2022. Under åtta veckor testades 101 trädindivider gällande deras initieringsförmåga. Resultaten kontrollerades därefter var tredje och var sjätte vecka och all information sammanställdes i en databas. Utvecklingsstadiet hos de zygotiska embryona (fröembryon) var av betydelse för resultaten. Små och outvecklade embryon var svårhanterliga för den laborativa processen vilket försvårade extraktionsprocessen. Förvaringen av kottarna hade en avgörande betydelse och lagringsförhållandena bör förbättras inför framtida studier. Problem med mögel, luftfuktighet och angrepp av sjukdomar och larver gav ett delvis defekt arbetsmaterial vilket påverkade den totala mängden användbart datamaterial som kunde samlas in.

Skillnader kunde observeras mellan trädindivider gällande initieringsfrekvens. Av studiens 101 träd visade 66 träd initiering. Av de 35 träd där initiering helt uteblev hade embryon från 13 träd dock testats på ett icke optimalt sätt. Knappt en tredjedel (30 procent) av de 66 träden uppvisade lyckad initiering på en nivå mellan 10 och 20 procent av testade embryon. Något mer än en tredjedel (36 procent) uppvisade en initieringsandel på 30 till 40 procent. För knappt en tredjedel (33 procent) av träden registrerades en initieringsnivå på över 40 procent av. Endast ett testat träd hade 100 procent lyckade initieringar.

Nyckelord: Skogsträdsförädling, *Picea abies*, fröklonförökning

Abstract

Norway spruce (*Picea abies*) is an important tree species in Swedish forestry. With the uncertain future that forestry faces in an increasingly unstable climate, there is a need for genetic material that can withstand these new challenges. The goal is to secure good supply of Norway spruce genetic material and further improve traits such as optimal growth, high timber quality, and ability to resist pathogens and insect attacks. One potentially important part of the work of securing the future of Norway spruce in commercial forestry is somatic embryogenesis (SE), a form of vegetative propagation. SE is still a costly and time-consuming process, making the need to select trees with good initiation capacity a top priority. This study examined the SE initiation capacity of different tree families.

The results will be utilized in a different study investigating whether initiation ability could be associated with certain molecular markers in a Genome-Wide Association Study (GWAS). The study was performed as one component within the project 'GWAS: Marker-based earlier selection for high somatic embryo initiation in Norway spruce'. The project was financed by 'UPSC Competence Centre' in collaboration with Umeå Plant Science Centre (UPSC), The Swedish University of Agricultural Sciences, Skogforsk (the Forestry Research Institute of Sweden), and SweTree Technologies.

The investigated material consisted of immature embryos from seed of Norway spruce cones harvested from mother trees collected in the clone archives Ekebo (Svalöv) and Maltesholm (Tollarp). The experiment was carried out in the laboratory at the SLU School for Forest Management in Skinnskatteberg during the summer of 2022. During eight weeks 101 trees were tested regarding their initiation ability and thereafter the development was monitored every three and six weeks. The recorded information was compiled in a database. The stage of development of the zygotic embryos (seed embryos) had a major impact on the results; small and undeveloped embryos were difficult to handle in the laboratory process and made the embryo extraction process much more difficult. Storage conditions negatively affected parts of the cone material and should be further improved in future studies. Problems with mold, non-optimal humidity, and infestation of diseases and larvae resulted in partly defective sample material for a subset of trees, which affected the total amount of usable data obtained in this study.

Differences were observed regarding initiation ability of different trees. Of the total 101 trees in the study, 66 trees showed initiation. However, of the 35 trees that failed to initiate at all, embryos from 13 trees had been tested in a sub-optimal way. Slightly less than one third of the trees (30 percent) showed initiation rates of 10 to 20 percent of tested embryos. More than one-third (36 percent) showed initiation rates of 30 to 40 percent. For one-third (33 percent) of the trees, initiation rates were above 40 percent. Only one tested tree had 100 percent successful initiations.

Keywords: Tree improvement, *Picea abies*, Clonal propagation

Förord

Denna studie är vårt examensarbete med omfattningen 15 högskolepoäng på Skogsmästarprogrammet, SLU Skinnskatteberg. Arbetet genomfördes från juni till december 2022 och är en del av ett större projekt som drivs av Umeå Plant Science Centre (UPSC) i samarbete med Sveriges lantbruksuniversitet, Skogforsk och SweTree Technologies.

Denna studie har varit omfattande och skulle inte ha varit möjligt utan de personer som funnits med oss under arbetets gång. För det första vill vi rikta ett stort varmt tack till våra tre handledare som på olika sätt har stöttat oss genom detta arbete. Ulrika Egertsdotter som bidragit med sin oändligt värdefulla kunskap och hjälpt oss att gå från noviser till mästare på granfröskalning och embryoextraktion. Elisabeth Wallin som hjälpt oss i Skogsmästarskolans laboratorium och bidragit med sin tid, stöd och fantastiska lösningsförmåga vid uppkomna problem. Och till Daniel Gräns som hjälpt oss med skrivandet genom hela hösten och sett till att arbetet nådde sin fulla potential.

Vi vill även rikta ett varmt hjärtligt tack till Marianne Vemhäll som hjälpte oss i labbet under de sista två veckorna. Stort tack till Andreas Helmersson och Lars Wremert på Skogforsk som hjälpte till med insamlingen av kottarna från klonarkiven. Varmt tack till Sofie Johansson på UPSC som bidragit med sin kunskap och hjälpt oss att få rätt utrustning och tillbehör i labbet. Tack till Andreas Bergstrand som hjälpte oss med kottsterilisering och fröplockning. Även Tommy Abrahamsson och Mats Jonsell ska ha ett stort tack för hjälp i arbetet med att lista ut vad det var för larver som hade bosatt sig i delar av kottmaterialet.

Uppsala och Vrigstad, december 2022.

Josefine Björs & Jonathan Sjögren

Innehåll

1. INLEDNING	1
1.1 BAKGRUND	1
1.2 BESKRIVNING AV TENIKEN FÖR SE	1
1.3 TILLÄMPNING AV SE	2
1.4 SYFTE	3
2. MATERIAL OCH METOD	4
2.1 MATERIAL	4
2.1.1 VÄXTMATERIAL FÖR ÖVNING RESPEKTIVE INITIERINGSEXPERIMENT	4
2.1.2 PROTOKOLL	4
2.2 TESTOMGÅNGAR	5
2.2.1 TESTOMGÅNG 1 - ÄLDRE FRÖER	5
2.2.2 TESTOMGÅNG 2 - FRYSTA FRÖER	5
2.3 INITIERINGSEXPERIMENT	6
2.3.1 FÖRVARING AV KOTTARNA	6
2.3.2 ISOLERING AV FRÖEMBRYO	7
2.3.3 KONTROLLER	8
2.4 DATAHANTERING	9
2.4.1 DATAINSAMLING	9
3. RESULTAT	10
3.1 INITIERINGAR	10
3.1.1 INITIERINGSRESULTAT	10
3.1.2 INITIERINGSFREKVENS	12
3.2 EJ INITIERADE TRÄD	15
3.3 LARVER, MÖGEL, JÄSTSVAMPAR, OCH BAKTERIER	17
4. DISKUSSION	19
4.1 ASSOCIATIONS-STUDIE FÖR FÖREKOMST AV MÖJLIGA MOLEKYLÄRA MARKÖRER FÖR SE INITIERING	20
4.2 METODUTVECKLING UNDER ARBETETS GÅNG	20
4.3 FELKÄLLOR	21
4.4 ERFARENHETER GÄLLANDE FÖRVARING AV KOTTAR	21
4.5 SLUTSATSER	22
REFERENSER	25
BILAGOR	28

1. Inledning

1.1 Bakgrund

I Sverige planterades under 2021 totalt 452 miljoner skogsplantor (Skogsstyrelsen 2022) varav 43,7 procent var gran (*Picea abies*). Skogsbruket efterfrågar genetiskt material och planttyper anpassade till nuvarande och framtida klimatförhållanden med bra överlevnad och tillväxt på aktuell ståndort (Rosvall et al. 2019c). Egenskaper som virkeskvalitet och motståndskraft mot svampangrepp (Chen et al. 2018) samt plantans förmåga att klara av insektsangrepp (Puentes et al. 2018) är också viktiga. Genetisk skogsträdsförädling med urval, korsning och testning har länge pågått i Sverige, se t.ex. Rosvall et al. (2016) och för gran omfattar förädlingsprogrammet i dagsläget 22 delpopulationer. För att få ut de genetiska vinsterna i skogsbruket anläggs fröplantager där frö från förädlade träd så småningom kan skördas i stor skala för sådd i plantskola eller direkt på hyggen (Rosvall et al. 2016).

Efterfrågan på förädlad granfrö är större än tillgången i Sverige (Rosvall et al. 2016). Det finns potentiella vinster att hämta genom att undvika eller förkorta den period av väntan som det innebär innan nyanlagda fröplantager börjar producera kottar. En del i lösningen gällande dessa utmaningar skulle kunna vara storskalig användning av metoder för vegetativ förökning. Generellt definieras vegetativ förökning som att "[...]delar av en växt behandlas så att delarna växer ut till kompletta plantor." (Rosvall et al. 2016:72). På detta sätt går det att få fram nya genetiskt identiska plantor från samma ursprungsplanta och behovet av fröplantager skulle därmed kunna minska. Fälttester av nya grangenerationer som sker löpande i förädlingsprogrammen görs redan idag med vegetativt förökade individer genom att använda s.k. sticklingar (Rosvall et al. 2016). Rotade sticklingar av granplantor finns även i begränsad skala till försäljning för plantering i operationellt skogsbruk, ofta till ett betydligt högre pris än vanliga fröplantor (Södra 2021). Nu vidareutvecklas en annan metod för vegetativ förökning s.k. somatisk embryogenes (SE) som utgår från fröembryon (Rosvall et al. 2019c).

1.2 Beskrivning av tekniken för SE

Initieringen av somatisk embryogenes sker i en steril miljö (*in vitro*) för att undvika kontamination från svampar och bakterier i den nya *in vitro*-kulturen vilket i sin tur kan förstöra möjligheterna för vidareutveckling av de somatiska embryona till en planta. Genom att isolera fröembryona under sterila förhållanden och lägga de på ett odlingsmedium med tillväxtregulatorer bestående av auxin och cytokinin kan man framkalla ett kontinuerligt bildande (multiplicering) av tidiga stadier av somatiska embryon, så kallade proembryogena massor (PEM:s). Det är denna del av processen som undersökts i denna studie. När dessa PEM:s därefter flyttas från det ursprungliga odlingsmediet till ett medium som istället för auxin och cytokinin innehåller en annan tillväxtregulator, abskisinsyra, upphör multipliceringsprocessen och de proembryogena massorna övergår till att bilda mogna somatiska embryon. Dessa embryon kommer senare, vid rätt odlingsförhållanden, kunna gro och bilda växter (Egertsdotter 2019).

1.3 Tillämpning av SE

Vegetativ förökning via SE ger möjligheter till snabb produktion av plantmaterial anpassat för till exempel nya miljöförhållanden och nya skadegörare (Rosvall et al. 2019c). Konventionellt klonskogsbruk med testning, uppförökning och användning av de allra bästa granklonerna skulle enligt Chen et al. (2020) kunna ge minst 50 procent ökad genetisk vinst jämfört med användning av förädlade fröplantor. SE kan även användas i bevarandeprogram för att producera plantor från trädslag som genererar få fröer eller som är svåra att föröka på naturlig väg (Egertsdotter 2019). Kulturer av PEM:s eller de mogna somatiska embryona kan även kryolagras. Det är en metod för långtidsförvaring under mycket kalla temperaturer. Vilket är användbart när olika cellinjer ska utvärderas i fältförsök. Resultaten av fältförsöken kan sedan användas för att avgöra vilka cellinjer som är mest lämpliga eftersom det kan finnas olika strategier för hur cellinjer väljs. De cellinjer som motsvarar de träd som har visat bästa resultat i fält kan då tinas upp från kryolagret och börja förökas för masskloning (Egertsdotter 2019).

En annan möjlig användning av SE i kommersiellt skogsbruk är via s.k. familjeskogsbruk. Familjeskogsbrukmetoden är en gren inom vegetativ förökning som ger möjligheter att snabbt få fram obegränsat med plantor från kontrollpollinerade trädfamiljer som vanligen bara ger ifrån sig några hundra fröer från varje korsning (Egertsdotter 2019). Skogsindustrin kan på så sätt med familjeskogsbruk möjliggöra en snabbare och större produktion av plantor från korsningar mellan träd med särskilt attraktiva egenskaper. Familjeskogsbruk med otestade kloner har föreslagits som en möjlig väg för en begränsad areal i svenskt skogsbruk. Eftersom de otestade klonerna i familjeskogsbruket baseras på korsningar mellan de allra bästa testade klonerna skulle detta kunna ge nästan lika stora förädlingsvinster som traditionellt klonskogsbruk (Rosvall 2019).

Ett sätt att minska kostnaden för storskalig produktion av SE-plantor skulle vara att identifiera trädindivider som har god potential att producera frö med hög SE-initieringsförmåga och sedan använda frö från dessa. Tidigare studier genomförda på t.ex. *Picea mariana* (svartgran) (Cheliak & Klimaszewska 1991), *Picea glauca* (Park et al. 1993), *Pinus taeda* (MacKay et al. 2006a), och *Eucalyptus* (Pinto et al. 2008) har visat att det finns en genetisk variation för denna egenskap. Dock rapporterade Högberg et al. (1998) för *Picea abies* en förhållandevis svag genetisk kontroll av initieringsstadiet.

Möjligheterna med helgenomstudier och 'Genome-Wide Association Studies' (GWAS), beskrivs av t.ex. Uffelmann et al. (2021). Metoden kan användas för exempelvis träd i syfte att undersöka genetiken bakom komplexa egenskaper som påverkas av många gener (Du et al. 2018, Tibbs Cortes et al. 2021). En viss egenskap (fenotyp) som är gemensam för en grupp individer kan genom denna teknik kopplas (associeras) till molekylära markörer. Information från associationsstudier kan sedan användas som ett verktyg inom skogsträdsförädlingen (Isik 2014). Vid tidigare genomförda associationsstudier på gran har markörer kopplade till bland annat vedegenskaper (Baison et al. 2019, 2020) och resistens mot rotröta (Elfstrand et al. 2020) identifierats.

Tidpunkten för skörd av frömateriäl till SE bör optimeras för bästa resultat. Enligt en studie av Park et al. (1993) hade omogna embryon från vitgran (*Picea glauca*) i ett tidigt stadium (fyra veckors odling) cirka tre gånger fler SE-initieringar än ett fullt utvecklade embryon vid motsvarande tidpunkt. Detta gör att det är viktigt att bevaka temperatursumman i det område där kottarna ska plockas. När den nått cirka 800 dygnsgrader kan kottskörden genomföras i en för SE-initiering optimal frömognadsfas (Helmersson¹). I Sydsverige har detta inneburit att skörd för SE-initiering utförs under sista veckan av juli (se t.ex. Högberg et al. 1998). På grund av att logistik och arbetskraft skulle matcha för insamlandet av projektets försöksmaterial så kunde kottarna från klonarkiven ej plockas vid den optimala temperatursumman, utan samlades in vecka 27 till 28.

1.4 Syfte

Syftet med studien var att genomföra en pilotstudie med försöksmaterial från två klonarkiv med *Picea abies* och där undersöka skillnader mellan trädindividens potential för initiering av somatisk embryogenes. Potentialen kommer att uttryckas som initieringsprocent hos ett bestämt antal provfröer. Tanken är att detta ska bidra till kunskapen om SE-initieringsförmågans genetiska variation.

Resultaten från denna pilotstudie kommer kunna nyttjas i arbetet med att identifiera molekylära markörer kopplade till hur fröer från ett visst träd fungerar i SE-processen. Utöver det så kan även denna pilotstudie ge värdefulla erfarenheter gällande den laborativa arbetsprocessen för SE-arbetet då ett liknande projekt med samma mängd försöksmaterial ej har genomförts tidigare. Övergripande är målsättningen med detta att möjliggöra en mer effektiv resursanvändning där huvudsakligen fröer från träd som har identifierats som lämpliga för SE-initiering selekteras.

¹ Andreas Helmersson, forskare skogsträdsförädling, Skogforsk, pers. komm. 2023-01-03

2. Material och metod

2.1 Material

2.1.1 Växtmaterial för övning respektive initieringsexperiment

För de inledande testomgångarna användes dels blandat frömaterial insamlat från en mellansvensk granfröplantage som lagrats i frys under lång tid (testomgång 1) samt även ett material bestående av frysta fröer från fem friavblommade föräldraträd (testomgång 2, se Tabell 1) tillhandahållna av Skogforsk i Sävar och transporterade via UPSC (Umeå Plant Science Centre) i Umeå till SLU Skogsmästarskolan.

För huvudstudien samlades grankottar in under vecka 27 och vecka 28 2022 från 10 moderträd som fanns belägna i klonarkiv i Ekebo, Svalöv (SWEREF99 TM, N 6202206, E 382125) samt 86 moderträd i Maltesholm, Tollarp (SWEREF99 TM, N 6196556, E 437015). Kottarna förvarades i en kyl med en temperatur strax över 5 °C innan de transporterades (sorterade per träd i plastpåsar) i kylboxar till Skogsmästarskolans laboratorium i Skinnskatteberg. Vid Skogsmästarskolan förvarades kottarna i slutna papperspåsar i öppna plastlådor i ett kylrum med temperatur +3 °C (+/- 2 °C).

Tabell 1. Information om de fem föräldraträd vars frö utgjorde testomgång 2. Frömaterialen hade lagrats i frys hos Skogforsk i Sävar. Den fetmarkerade texten visar syskonnumret vilket användes som identifikation för att särskilja fröpåsarna. Antal fröer som skickades med från varje enskilt föräldraträd skiljde sig men i testomgång 2 användes 20 fröer från varje träd (n=20).

<i>Picea abies</i>	1.	2.	3.	4.	5.
Arkivnr:	S23KA922056	S23KA922056	S23KA922056	S23KA922056	S23KA922056
Korsningsår:	2015	2015	2015	2015	2015
Sysknr:	S23X1520777	S23X1520386	S23X1520479	S23X1520300	S23X1520637
Mor:	S23K8320777	S23K8320386	S23K8320479	S23K8320300	S23K8320637
Far:	OKÄND	OKÄND	OKÄND	OKÄND	OKÄND
Ringfärg:					
Gpop:	G6	G6	G5	G7	G6
Antal fröer:	25	24	25	26	25

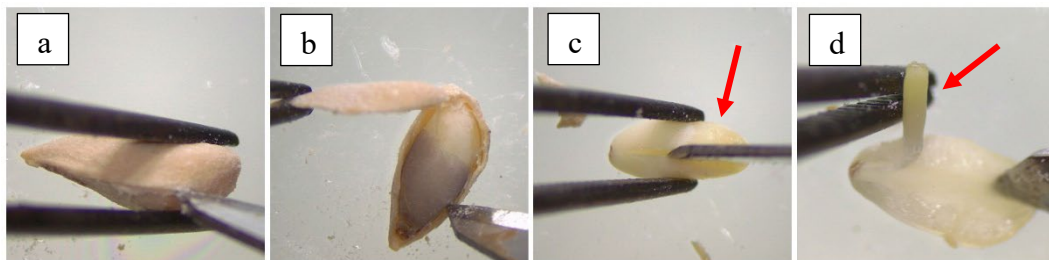
2.1.2 Protokoll

Datainsamlingen genomfördes i SLU Skogsmästarskolans laboratorium. Arbetssättet för att ta fram fröembryon följde SLU/UPSC:s protokoll (se Bilaga 1) som godkänts av forskningsprojektets ledare Ulrika Egertsdotter. Tillväxtmediet som fröembryona lades på för att kunna massföroka sig/bilda somatiska embryon framställdes enligt SLU/UPSC:s protokoll (Bilaga 2). Från vecka 31 användes sterilfiltrerat färskt glutamin i tillverkningen av mediet (Bilaga 2), veckorna innan tillverkades mediet med fryst glutamin.

2.2 Testomgångar

2.2.1 Testomgång 1 - Äldre fröer

Eftersom frömaterialet per familj i projektet var limiterat så lades stor vikt på övning gällande processen med att extrahera ett fröembryo ur ett granfrö (Figur 1). Utifrån protokollet (Bilaga 1) övades metoden för *Isolering av fröembryo för start av somatisk embryo-kultur* in på äldre torkade granfröer som varit blötlagda i ca 12 h. Övningsronden genomfördes ej i en steril miljö.



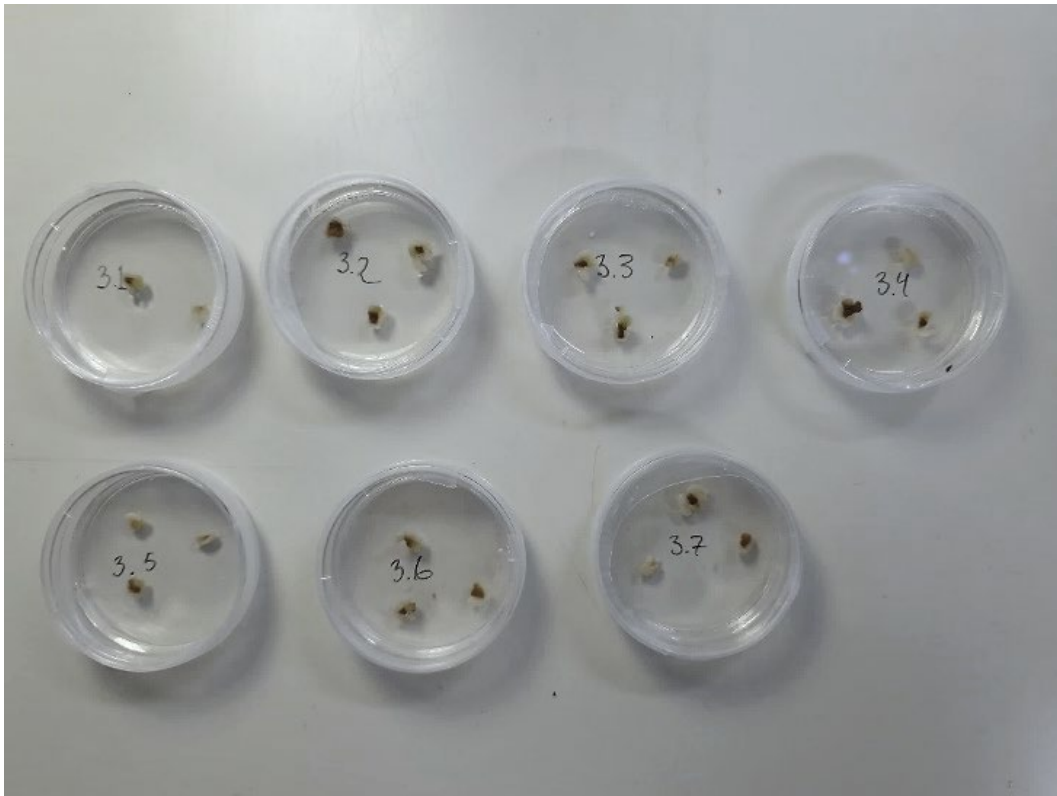
Figur 1. Processen för att extrahera ett fröembryo ur ett granfrö. Fröets ytterskal öppnas försiktigt längs sidorna (a), sedan skalas det tunna innerskalet av (b). Megagametofyten (se pil) skärs upp längsgående med försiktighet för att ej skada fröembryot (c). Embryot (se pil) ska sitta kvar i basen på megagametofyten med sina suspensorceller (d) och placeras försiktigt på odlingsmediet.

2.2.2 Testomgång 2 - Frysta fröer

När en tillräckligt hög grad (cirka 90 procent) av lyckade fröembryoisoleringar hade uppnåtts genomfördes sterilisering av fryst frö (Tabell 1) enligt Bilaga 1. Dagen innan steriliseringsprocessen påbörjades ställdes sterilborden i ordning.

De frysta fröerna steriliserades med 30 procent väteperoxid (Bilaga 1). Totalt 20 fröer från varje enskilt träd delades upp i märkta s.k. 50 ml falconrör med nummer 1 – 5. Fröerna lades i en lösning med 30 procent väteperoxid och en droppe tween-20 och skakades i 40 minuter i falconrören på ett skakbord. När steriliseringsprocessen var genomförd ställdes fröerna blötlagda i sterilt vatten i ett kylskåp till nästkommande dag. Då fröerna varit frysta och bildat ett kraftigare ytterskal så skakades de 40 min i väteperoxiden samt blötlades under natten. Innan *Isolering av fröembryo för start av somatisk embryo-kultur* (Bilaga 1) startades nästkommande dag så torkades sterilborden av med 75 procentig ytdesinfektion. Labbrock, handskar, samt munskydd användes vid hanteringen av fröerna för att undvika kontaminering. Ett falconrör med fröer användes i taget, fröembryona delades upp i sju 6 cm petriskålar fyllda med $\frac{1}{2}$ LP medium. Max tre embryon fördelades jämnt per petriskål. Petriskålarna förslöts med två varv parafilm och märktes upp enligt systemet 1.1, 1.2, 1.3... 5.1, 5.2 (Figur 2).

De förseglade petriskålarna lades (sorterade per träd) i fem icke genomskinliga plastlådor med tätförslutande lock. Lådorna märktes upp med trädnummer 1 – 5 (Tabell 1), datum och vilken person som utfört processen. Lådorna ställdes i rumstemperatur och kontrollerades veckovis för att upptäcka eventuella mögel- och bakteriekontaminationer.



Figur 2. 20 fröembryon från testomgång 2 uppdelade på sju stycken 6 cm petriskålar. Petriskålarna är uppmärkta med nr 3.1, 3.2...3.7.

2.3 Initieringsexperiment

2.3.1 Förvaring av kottarna

Grankottarna från klonarkiven i Ekebo och Maltesholm förvarades i ett kylrum med en stadig temperatur på $+3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$). De levererades i kylboxar där kottarna från varje träd låg i uppmärkta plastpåsar. För att förhindra att miljön blev för fuktig och riskera mögel/svampangrepp (se Wennström 2009) så flyttades kottarna över till papperspåsar. Var trädets kottar lades i varsin uppmärkt papperspåse med information om trädets ID-nummer och bedömd mognadsgrad. Därefter placerades påsarna i öppna stora plastlådor.

Ungefär hälften av kottarna hade inte uppnått en hög anatomisk mognad och dessa träd märktes upp med "omogen". Skillnaden mellan mogen och omogen bestämdes okulärt utifrån hur mycket kottfjällen hade öppnat sig (Figur 3). Kottens färg gav inte en bra indikation gällande den anatomiska mognaden, gröna kottar kunde ha betydligt större embryon och uppvecklade kottfjäll än bruna kottar. Embryoutvecklingsstadiet kontrollerades på fröembryon från kottar som bedömts vara omogna. Fem olika träd kontrollerades genom att fröer från en kotte per träd studerades. Resultatet visade att omogna kottar i majoritet hade embryon i stadie 2 – 3 (Figur 4), vilket ej var önskvärda stadier i denna studie. Därefter fastställdes att enbart fröembryon från mogna kottar skulle användas.



Figur 3. Övre kotten (a) bedömdes att vara ”omogen” och den undre (b) ”mogen”.

2.3.2 Isolering av fröembryo

Två kottar användes som standard per träd. Kottarna skrubbadades först av med diskmedel och diskborste under rinnande kallt vatten. De placerades sedan i en bägare och sköljdes under kallt rinnande vatten i 20 minuter (Bilaga 1). Varje träds kottar hölls alltid separerade under arbetets gång för att inte riskera att blandas ihop. Efter sköljningen plockades cirka 25 fröer per kotte ut enligt metoden i Bilaga 1 *Rengöring av kottar*, och lades i en petriskål som stängdes med två varv parafilm. På petriskålen skrevs det givna petriskålnumret samt datum. Petriskålen förvarades sedan i kylskåp. Information från varje träd skrevs ner för hand i ett formulär under arbetets gång (Tabell 2).

Tabell 2. Exempel på information som samlades in för varje träd under första stadiet av embryoarbetet. Informationen fördes därefter in i UPSC:s Excelfil. Under anteckningar kunde även kottarnas status beskrivas vid behov, om de drabbats av mögel/bakterier/jästsvampar eller var fulla med insekter som kunde ha inverkan på embryot.

<u>ID</u>	<u>Petriskålnr</u>	<u>Hanteringsvecka</u>	<u>Kotte/sterilisering</u>	<u>Fröer/sterilisering</u>
S21K8322202	37	31	2-aug	3-aug

<u>Fröembryoisolering</u>	<u>Antal sparade fröer</u>	<u>Embryostadium</u>	<u>Mediumbatch</u>	<u>Anteckningar</u>
3-aug	37	4-5	29-jul	Embryotest - 1 st 5 & 3 st 4 & 1 st tom.

Innan steriliseringsprocessen av fröerna påbörjades så utfördes ett embryotest för varje träd. Detta implementerades för att effektivisera processen då det visat sig att vissa av träden haft för små embryon för att de skulle kunna hanteras i SE-processen. Embryotestet utfördes genom att ta fem fröer ur varje trädets petriskål och öppna upp dessa under en stereolupp för att se vilket stadium de var i, samt om det fanns helt tomma fröer. Visade det sig att majoriteten av de fem testade fröerna var i stadium 2, 3 eller tomma så kasserades resten av fröerna och trädet testades om igen senare med dess resterande kottar (Figur 4).



Figur 4. Längst till vänster syns embryostadium 2 – 3. I mitten stadium 4 där kotyledonerna ej framträder och embryot är betydligt mindre än dess suspensorcell. Längst ut till höger syns stadium 5 där embryot är av betydande storlek och suspensorcellen är mindre.

Efter embryotestet utfördes steriliseringen av fröerna. Steriliseringen skedde enligt *Sterilisering av fröer* i Bilaga 1. Då omogna fröer ej ska ligga i blöt efter steriliseringen så kunde de användas omgående. Om tid ej fanns för direkt fortsatt arbete så överfördes de från falconröret till en steril petriskål märkt med givet petriskålnummer samt datum för utförd sterilisering och förvarades därefter i kylskåp.

Isolering av fröembryo utfördes enligt instruktioner i Bilaga 1. Totalt 10 embryon per träd plockades ut och lades med fem embryon i varje 9 cm petriskål. Petriskålen märktes upp enligt systemet petriskålnummer.1 eller .2, till exempel 6.1 och 6.2. Datum för utförd fröembryoisolering skrevs bredvid. Om embryot var i stadium 4 så ritades ett kryss på undersidan av petriskålen, rakt under embryot. Skålarna förslöts med två varv parafilm och förvarades i icke genomskinliga plastlådor, en plastlåda per hanteringsvecka. Processen för fröembryoisolering skedde uteslutande i sterilbänk. Verktygen doppades i etanol och brändes av mellan varje frö och under arbetet bars munskydd, handskar och labbrock.

De fröer som blev kvar efter den utförda fröembryoisoleringen sparades i en 5 ml eppendorfrör med skruvlock. Röret märktes med petriskålnumret och förvarades därefter i en låda i kylrummet.

2.3.3 Kontroller

Varje vecka kontrollerades alla lådor med petriskålar för att se om de angripits av mögel, jästsvamp eller bakterier. Vid mögelangrepp slängdes hela petriskålen. Om en petriskål drabbats av jästsvamp eller bakterieangrepp kunde icke angripna embryon förflyttas till en ny petriskål, om inte ett embryo i sig var angripet eller för nära det infekterade mediet. Vid förflyttning till en ny petriskål märktes skålen

om med ett nytt nummer, skål x.1 blev x.3 och x.2 blev x.4 samt förflyttningsdatum.

Efter tre veckor på odlingsmediet utfördes en initieringskontroll. Vid observerad initiering ritades en röd ring runt embryot. Om ett embryo påvisade en start av initiering men ej var fullbordad så ritades ett rött frågetecken bredvid embryot. Vid 6-veckorskontrollen ritades en grön ring runt nya observerade initieringar. Initieringarna funna vid tre och sex veckor skrevs in i olika kolumner i protokollet för att ej blandas ihop. Det totala antalet initieringar per träd sammanställdes sedan och gav ett poängresultat utifrån initieringar/antal embryon.

2.4 Datahantering

2.4.1 Datainsamling

Under vecka 24 – 25 (2022) genomfördes testomgång 2 med frysta fröer. Experimentet med de färska kottarna skedde vecka 29 – 34 (2022). Resultatet från de frysta fröer från Sävar (Tabell 1) observerades efter tre samt sex veckor från det att fröembryona lagts på odlingsmedium. Initieringsresultatet från de färska kottarna kontrollerades efter tre samt sex veckor, kontroll av en kulturetablering s.k. ”capture” skedde fyra veckor efter att en initiering hittats. All data som samlades in under arbetet i laboratoriet skrevs kontinuerligt ner i två Excelfiler, vilka var underlaget för det fortsatta arbetet i UPSC:s forskningsprojekt. En Excelfil var grunden för rapporten och innehöll tabeller samt en sammanfattning av det dagligt pågående arbetet. Den andra Excelfilen innehöll all information från tabellerna men i formatet kolumner för smidigare datahantering och denna skickades sedan till UPSC för vidare analyser.

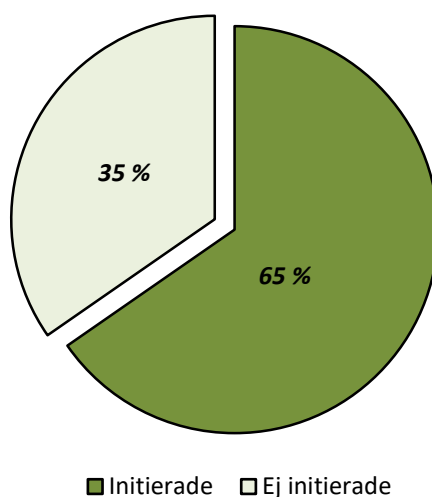
Anteckningar om arbetet i laboratoriet samt uppkomna anomalier som kunde ha en inverkan på resultatet fördes dagligen i ett Worddokument. Information gällande embryotestning, hur länge fröer låg i kylan under arbetet, samt andra möjligtvis påverkande faktorer noterades i Excelfilerna kopplat till varje enskilt träd.

3. Resultat

3.1 Initieringar

3.1.1 Initieringsresultat

I huvudförsöket testades 101 trädindivider för att undersöka deras enskilda initieringsförmåga och skillnader i initieringsfrekvens. Resultatet för 86 träd från Maltesholm, 10 träd från Ekebo och de fem träden från Sävar med frysta fröer redovisas i tabellform i Bilaga 3. Träden i huvudförsöket valdes slumpmässigt ut från de utsorterade träden med ”mogna kottar”. Tidsmässigt tog försöket cirka 8 veckor av laborationstid med efterföljande kontroller av initieringsfrekvensen var tredje och sjätte vecka. Resultaten som redovisas i Bilaga 3 är uppdelade per vecka då de enskilda träden testades, för att enklare få en överblick av resultatet. Totalt initierades 66 träd av de 101 som ingick i försöket. Uttryckt i procent motsvarade detta 65 procent, se Figur 5.



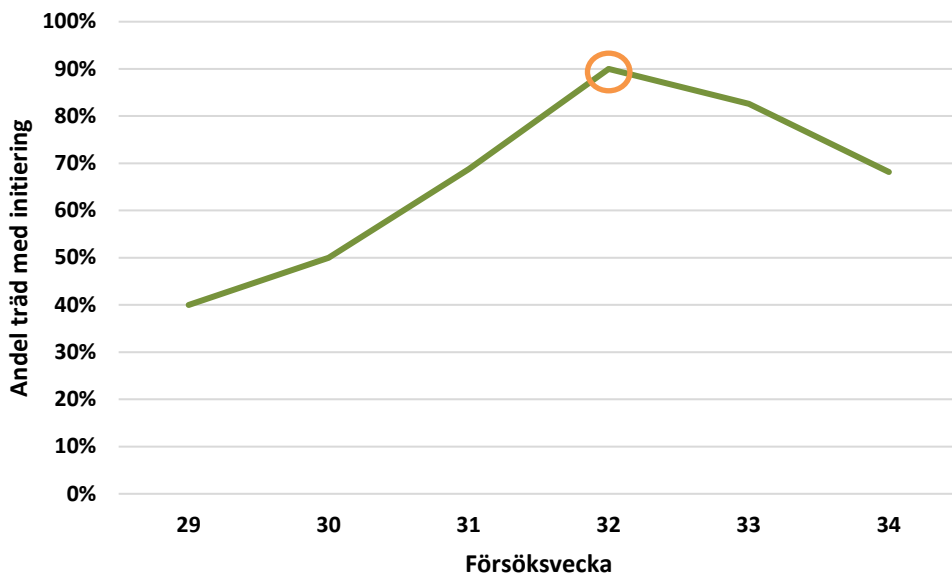
Figur 5. Andel (%) av 101 testade träd som påvisade initiering (initierade) samt inte påvisade initiering (ej initierade). Sammanlagt 86 träd från Maltesholm, 10 träd från Ekebo samt fem träd med frysta fröer (Tabell 1) är inkluderade. n=101.

Vecka 29 startades huvudförsöket. Hanteringen samt processen med isolering av fröembryo gick långsammare första veckan jämfört med de andra veckorna. Totalt hanterades 10 träd under huvudförsökets första vecka (Bilaga 3, Tabell 6). Av dessa påvisade fyra träd initieringar. Under vecka 29 påbörjades arbetet med att sortera in kottarna i kategorierna ”mogna” samt ”omogna” (Figur 3). Samtidigt påbörjades arbetet med isolering av fröembryo och därför hamnade vissa träd som inkluderades i projektet under kategorin ”omogna kottar”. Fyra träd av de första 10 som gick igenom processen hade omogna kottar, ett träd hade okänd mognadsgrad då systemet med att märka upp mognadsgraden ej var implementerat vid denna tidpunkt. Av de fyra träden med omogna kottar uppvisade tre träd initiering. Embryostadiet noterades inte för dessa träd då den informationen började samlas in senare under projektet. Vecka 29 kan betraktas

som ett experiment i att få fram det optimala arbetssättet samt fastställa vilken information som måste samlas in från varje träd.

Under vecka 30 hanterades 16 träd (Bilaga 3, Tabell 7) och information gällande mognadsstadiet på embryot antecknades. Steget med att utföra embryokontroll innan steriliseringsprocessen implementerades. Träd med för små embryon för att kunna hanteras i processen lades undan för att kunna testas om senare. Detta gjordes med förhoppningen om att de skulle fortsätta sin fysiologiska mognad (Wennström 2009). Av de 16 träd som hanterades under vecka 30 påvisade 8 initiering. Två träd hade för små embryon och fick läggas undan för omtestning vid ett senare tillfälle.

Totalt 16 träd hanterades under vecka 31 med lyckade initieringsresultat från 11 träd (Bilaga 3, Tabell 8). Träd nummer 12 testades både vecka 29 och 31. Då bara fem embryon plockades första gången togs fem nya embryon ut vecka 31 för att ha 10 embryon från träd 12. Detta var dock en engångsföreteelse då det skulle ta för lång tid att gå igenom alla träd igen där målet med 10 embryon ej uppfylldes av olika anledningar.



Figur 6. Andel träd med initiering (%) per försöksvecka. Antalet träd med lyckade initieringar dividerat med antalet träd som totalt testades varje försöksvecka. Vecka 32 var den mest lyckade försöksveckan med 90 procent lyckade initieringar. Vecka 24 – 25 är inte medräknat i tabellen eftersom det ej var färskt försöksmaterial som testades dessa veckor. Mer utförliga tabeller med information kan ses i Bilaga 3. Vecka 29: n=10, vecka 30: n=16, vecka 31: n=16, vecka 32: n=10, vecka 33: n=23, vecka 34: n=22.

Vecka 32 hanterades 10 träd, 9 träd av dessa visade initiering (Bilaga 3, Tabell 9).

Vecka 32 var den mest lyckade veckan gällande initierade träd av de träd som testades, se Figur 6. Ett missöde med en batch odlingsmedium gjorde att alla embryon som hanterats vecka 31 fick flyttas till nya petriskålar vecka 32.

Odlingsmediumplattorna från vecka 31 hade drabbats av jästsvamp och bakterieangrepp. Därför blev det färre träd som genomgick processen med isolering av fröembryo vecka 32.

Under vecka 33 anställdes en person för att enbart sköta processen med att tvätta/sterilisera kottar samt att plocka ut fröerna. Detta snabbade upp arbetstempot och material från 23 träd hanterades denna vecka (Bilaga 3, Tabell 10). Av dessa påvisade 19 träd initieringar. Träd nummer 61 hade misstänkt grankotterost (*Thekopsora areolata*) (Figur 7) och fick kasseras helt (*Thekopsora areolata* (cherry spruce rust) 2022).

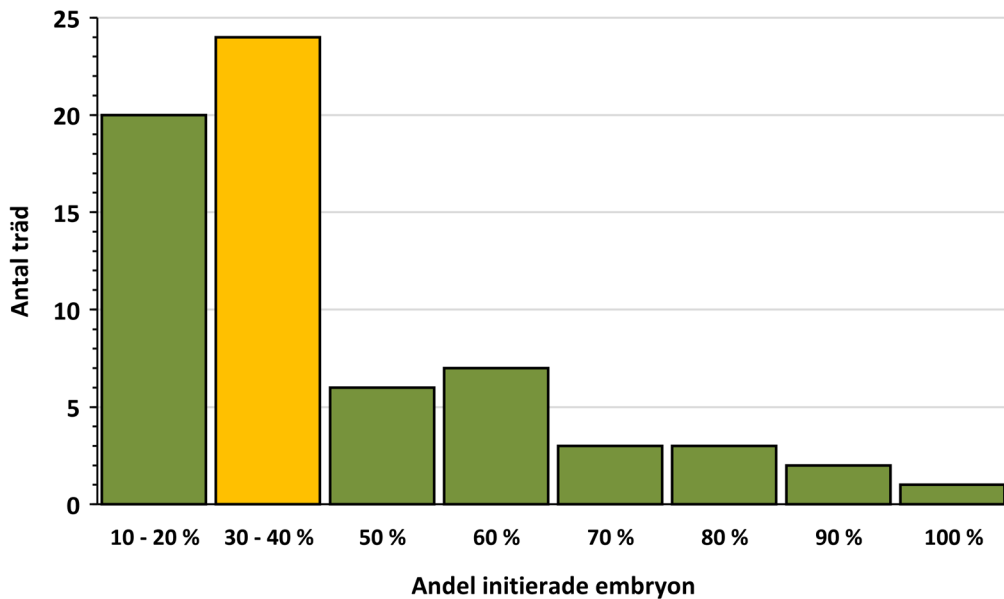


Figur 7. Kotte med misstänkt grankotterost (*Thekopsora areolata*). Träd med kottar liknande bilden kasserades.

Vecka 34 var den sista veckan gällande processen med isolering av fröembryo. Under denna vecka hanterades de kvarvarande 22 träden (Bilaga 3, Tabell 11). Av dessa påvisade 15 träd initieringar. Denna vecka hittades ytterligare två träd med misstänkt grankotterost (Figur 7) som fick kasseras. Träd 98:as fröer hade väldigt varierande embryostadier från stadium 2 till 4 (Figur 4), därför kunde endast tre embryon isoleras på en platta med odlingsmedium från det trädet.

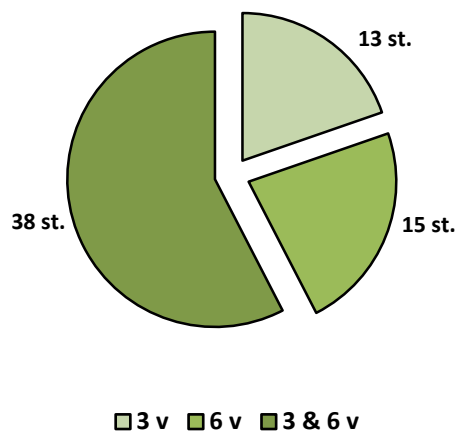
3.1.2 Initieringsfrekvens

Efter 6-veckorskontrollen antecknades den totala mängden initierade embryon per totala antalet embryon som lyckats extraherats från respektive träds kotte. Efter att alla de 101 träden genomgått sin 6-veckorskontroll kunde det konstateras att det totalt fanns åtta olika ”kategorier” av initieringsfrekvens (räknat på träd som påvisat initiering). Det vanligaste utslaget totalt blev en initieringsfrekvens på 30 – 40 procent. Totalt hamnade 24 träd här, se Figur 8. I kategorin 10 – 20 procent hamnade 20 träd. I gruppen med en initieringsfrekvens över 40 procent hamnade 22 träd. Träd nr 63 (Bilaga 3, Tabell 10) var det enda trädet i försöket som fick 10 av 10 embryon initierade, en hundra procentig initiering.



Figur 8. Initieringsfrekvens för de 66 träd av 101 testade som påvisade initiering. X-axeln visar de olika initieringsfrekvenskategorierna (%) som beräknats genom att dividera antalet embryon med initiering med totala antalet testade embryon och y-axeln visar totala antalet träd i varje initieringsfrekvens-kategori. Flest träd fanns i kategorin 30 – 40 procent initieringsandel (orangemarkerad).

Efter att kottarna från ett träd genomgått hela processen med embryotest och isolering av fröembryo kontrollerades varje embryo efter tre veckor och sedan efter sex veckor. Vid varje kontroll noterades antalet initierade embryon i en egen kolumn i Excel-filen så att initieringsfrekvensen kunde följas. Resultatet för de 66 träd som gav initiering visade att 13 träd visade initiering efter tre veckor, men ingen ny initiering vid 6-veckorskontrollen. Totalt 15 träd visade tvärtom bara initieringar vid 6-veckorskontrollen och ej några initieringar vid den första kontrollen. De resterande 38 träden visade både initieringar vid 3-veckors- samt 6-veckorskontrollen (Figur 9).



Figur 9. Antal träd som påvisade initiering endast efter 3 veckor, endast efter 6 veckor eller efter både 3 och 6 veckor. n=66.

Vid jämförelse av de träd som endast påvisade initieringar vid 3-veckorskontrollen (Tabell 3) och de träd som endast påvisade initieringar vid 6-veckorskontrollen (Tabell 4) fanns skillnader i initieringsfrekvensen. De träd som endast visade ett resultat efter tre veckor hade ofta en lägre initieringsfrekvens, 6 träd av 13 totalt fick endast ett initierat embryo. I kategorin träd som endast visade initieringar efter sex veckor var motsvarande siffra 5 träd av 15 totalt. I procent motsvarade det 46 procent i treveckorskategorin och 33 procent i sexveckorskategorin. Skillnad syns även gällande initieringsfrekvensen 6 av 10 embryon (60 procent) (Figur 8) där denna kategori ej återfanns bland de träd som endast påvisade initieringar vid 3-veckorskontrollen. I sexveckorskategorin hade tre träd en initieringsfrekvens på 6 av 10 embryon (60 procent).

Tabell 3. Träd som endast påvisade initieringar vid 3-veckorskontrollen.

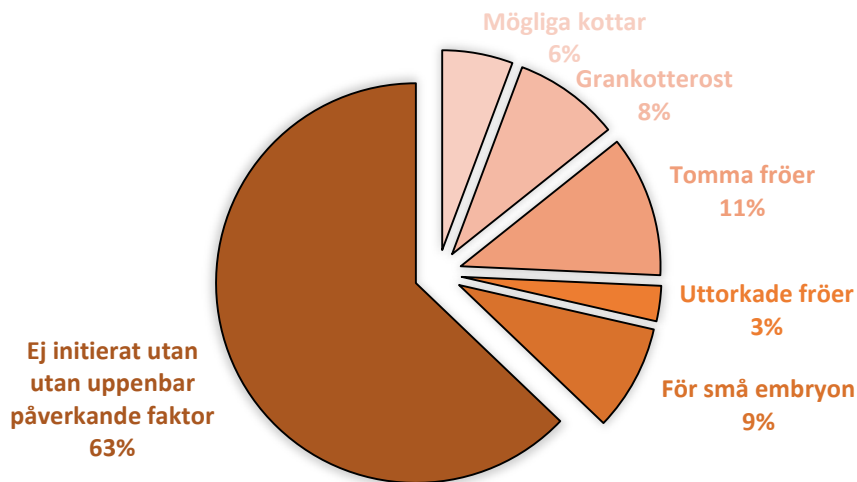
Träd	3 v	6 v	Totalt
11	3		3/10
13	1		1/10
18	1		1/5
29	2		2/5
31	1		1/5
50	1		1/10
57	1		1/5
59	1		1/10
68	4		4/10
69	2		2/10
71	2		2/5
76	2		2/10
95	3		3/10

Tabell 4. Träd som endast påvisade initieringar vid 6-veckorskontrollen.

Träd	3 v	6 v	Totalt
17		1	1/10
20		1	1/5
39		1	1/10
40		1	1/9
43		6	6/10
46		2	2/5
49		6	6/10
54		3	3/5
56		4	4/10
67		3	3/10
73		2	2/10
82		2	2/10
98		1	1/3
100		4	4/10
101		6	6/10

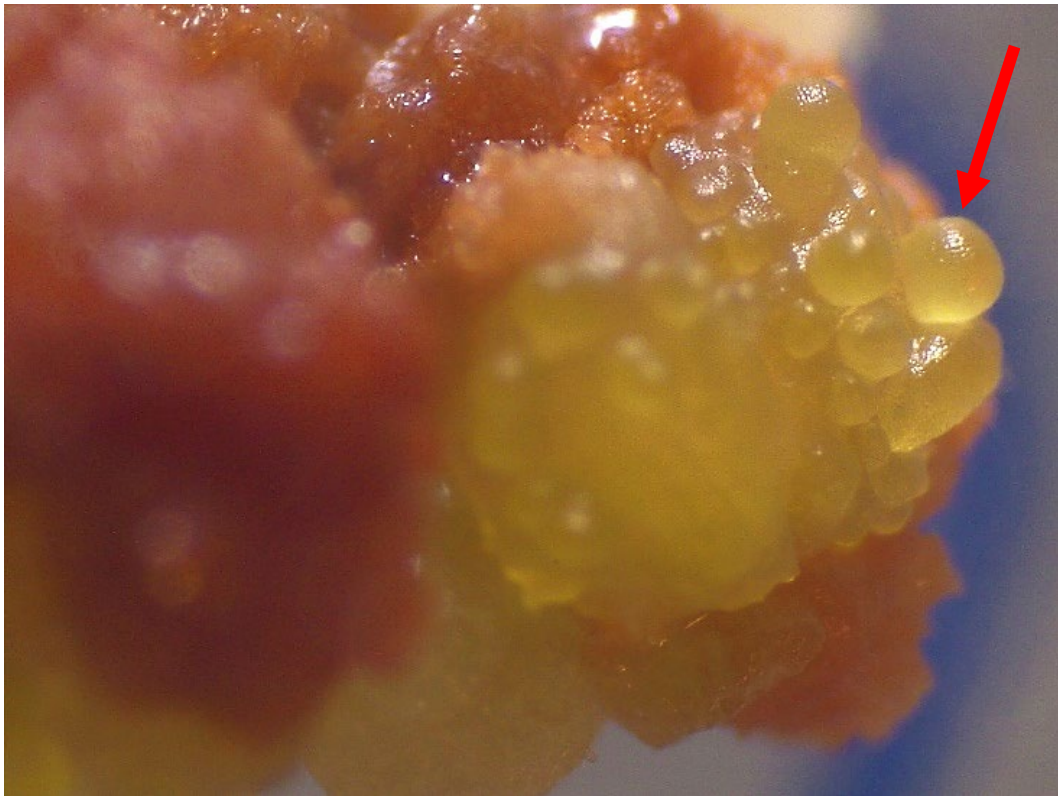
3.2 Ej initierade träd

Av de 101 träd som testades så uteblev initieringsresultat från 35 träd. För 13 av de 35 träden berodde detta på att de antingen måste testas om eller att träden var tvungna att kasseras. Anledningarna för omtestning och kassering åskådliggörs i Figur 10. Största kategorin för omtestning var tomma fröer på 11 procent, en annan orsak för omtestning var för små embryon och i denna kategori hamnade 9 procent av träden. 8 procent hade drabbats av grankotterost (*Thekopsora areolata*) och måste kasseras.



Figur 10. Träd som ej påvisat initieringar, 35 av 101 testade träd. 63 procent påvisade ej initiering utan påverkande faktor som stört processen. 13 träd har behövt kasseras eller testas om på grund av olika faktorer.

Av de 35 träd som ej visade initieringar var 22 träd (63 procent) sådana som inte hade lagts åt sidan för omtestning eller behövt kasseras. De fem träden med frysta fröer (Tabell 1) påvisade ej initiering. Omogna fröer har oftast en högre initieringsförmåga (Egertsdotter 2019), mognadsgraden på de frysta fröerna var okänd (Bilaga 3, Tabell 5). Värt att notera var också att dessa fröer varit lagrade under en längre tid (exakt tid okänd) medan resten av materialet i huvudförsöket bestod av fröer från kottar som samlades in i mitten av juli. Vissa embryon från träd 1 – 5 (Tabell 1) utvecklade globulära strukturer som liknar meristemoider (Figur 11). Meristemoider är odifferentierade celler som växer genom celldelning (Pillitteri et al. 2011)



Figur 11. Globulära strukturer som vid litteratursökningar liknar meristemoider (se pil) från träd 3, se Bilaga 3 (Tabell 5).

Träd 9 och 10 som hanterades vecka 29 (Bilaga 3, Tabell 6) påvisade ej initieringar. Träd 10 hade okänd mognadsgrad på kotten då den informationen ej var med i rutinen vid det stadiet. Träd 9 hade omogna kottar. Detta kan ställas i kontrast med träd 13, 14, och 15 från samma hanteringsvecka som också hade omogna kottar men påvisade initieringar.

Vecka 30 hanterades träd 25 (Bilaga 3, Tabell 7) som var det första trädet som visade tecken på grankotterost. Kottarna från trädet hade lagrats i cirka två veckor, en vecka i plastpåse och en vecka i papperspåse. Den uppmätta luftfuktigheten i kylrummet var 58 procent med en temperatur på + 3,9 °C. Luftfuktigheten i papperspåsarerna var på 63 procent. Fem embryon plockades från detta träd och lades på en odlingsmedieplatta för att se om det ändå kunde uppstå initiering. Resultatet från träd 25 var ej påvisad initiering. Resterande kottar från träd 25 kasserades.

Frö från träd 32, 33, och 34 (Bilaga 3, Tabell 8) förvarades i kylskåp två dagar innan sterilisering. Efter steriliseringen extraherades embryon från träd 32 inom 20 timmar. Träd 33 och 34:as fröer förvarades steriliserade i kylskåp två dagar innan extraktion. Inget av dessa tre träd påvisade någon initiering. För träd 70 (Bilaga 3, Tabell 10) var det också två dagars förvaring av de steriliserade fröerna i kylskåp innan extraktion. Träd 70:s kottar var även angripna av enstaka larver.

3.3 Larver, mögel, jästsvampar, och bakterier

I flera av kottarna hittades larver som hade ätit sig in i kottarna och försvårade arbetet med att få ut hela fröer att använda i initieringsförsöket. Den ena larvsorten förblev oidentifierad, se Figur 12. Den andra av larvsorterna (Figur 13) var troligtvis av arten *Mayetiola piceae*, som är en typ av Gallmygga (O'Donnell & Russel 2011).



Figur 12. Angripen kotte med okänd art av larv. Tydliga spår av var larven ätit sig in genom kottfjällen.



Figur 13. Larv troligen av arten *Mayetiola piceae* som angripit en kotte.

I arbetet med isolering av fröembryon var det av yttersta vikt att den sterila miljön bibehölls. Vid misslyckat sterilarbete kunde odlingsmediumplattorna drabbas av bakterieangrepp, jästsvampangrepp, eller mögelangrepp. Ett mögelangrepp (Figur 14) kunde oftast observeras 1 – 2 veckor efter att embryona lagts på odlingsmediumplattan. Hade ett mögelangrepp inträffat behövde hela petriskålen kasseras då petriskålen ej fick öppnas på grund av risken att mögelsporerna skulle spridas i den sterila miljön.

Jästsvamp- och bakterieangrepp orsakade jämfört med mögel ett något mildare angrepp på så sätt att det oftast inte krävdes att hela plattan kasserades. Om det var en liten bit av



Figur 14. Embryo på en odlingsmediumplatta som drabbats av ett kraftigt mögelangrepp.

mediet som hade drabbats kunde petriskålen öppnas och embryona flyttas till en ny odlingsmediumplatta.

Jästsvampar visade sig som röda fläckar, antingen på mediet eller direkt på ett embryo (Figur 15). Bakterier visade sig som gula fläckar som med tiden spred ut sig i plattan. Det kunde också uppstå direkt på ett embryo och bilda en tjock gulaktig hinna (Figur 16). Om jästsvampar eller bakterier direkt hade angripit ett embryo var det embryot förlorat. Resterande embryon i petriskålen kunde dock oftast räddas och förflyttas. En noggrann veckovis kontroll av petriskålarnas skick var därmed av största vikt för att kunna rädda embryon i petriskålar där dessa angrepp hade inträffat.



Figur 15. Jästsvampangrepp (röd ring) på ett frös megagametofyt, fröembryot syns bredvid.



Figur 16. Kraftigt bakterieangrepp på ett embryo.

4. Diskussion

Syftet med denna pilotstudie var att ta reda på om det fanns skillnader mellan olika trädindividuers förmåga till somatisk embryoinitiering hos gran (*Picea abies*). Arbetet resulterade i att frö från 101 träd undersöktes varav 66 träd uppvisade SE-initieringar. Av de 35 träden som inte hade initieringar var den vanligaste orsaken att fröerna var tomma eller att embryona var för små för att kunna hanteras optimalt. Detta stöder hypotesen att det finns skillnader gällande initieringsfrekvens hos olika trädindivider av *Picea abies*. I det fortsatta arbetet vid UPSC kommer det undersökas om dessa skillnader kan kopplas till vissa genmarkörer.

Andelen träd med påvisade initieringar jämfört med mängden testade träd/vecka (det frysta materialet från Sävar vecka 24 – 25 ej medräknat) ökade för varje laborationsvecka med en topp på 90 procent lyckade initieringar vecka 32 (Figur 6). Efter vecka 32 gick procenten för initierade träd marginellt neråt. Skillnaden på andelen initierade träd innan vecka 32 jämfört med efter vecka 32 är signifikant ($p < 0,05$), enligt beräkningar i Bilaga 4. Orsakerna för denna skillnad kan potentiellt bestå i att vårt arbetssätt med tiden blev mer precist och med detta så skadades färre embryon i hanteringsprocessen. Vecka 33 började en ny person som lärdes upp gällande arbetet för isolering av fröembryon, vilket kan indikera den marginella minskningen i initierade träd från vecka 33 och framåt. Fröernas kylförvaring kan även ha bidragit till mer lyckade initieringsförsök ju längre tiden gick. Enligt en studie av Nielsen et al. (2022) så kan kylbehandling leda till bättre gröningsresultat (ett senare stadium i SE-processen). Eftersom fröerna som hanterades de senare laborationsveckorna också följaktligen lagrats längre i kylrummet så kan detta möjligtvis ha spelat en roll i resultatet.

Embryonas initieringsfrekvens kontrollerades tre och sex veckor efter extrahering från granfröerna och placering på odlingsmediet i petriskålarna. Målsättningen var att 10 embryon skulle kontrolleras från varje trädindivid. Det uppstod dock variationer i antalet på grund av orsaker som mögelangrepp eller att embryon från vissa träd var i ett för tidigt utvecklingsstadium (Figur 4). Initieringsfrekvensen baserades på antalet embryon som påvisade initiering i relation till antalet extraherade embryon. Den vanligaste initieringsfrekvensen i denna undersökning var 30 – 40 procent och endast ett träd hade en initieringsfrekvens på 100 procent (Figur 8). Av de 66 träd som hade påvisad initiering hade 13 träd enbart initiering vid treveckorskontrollen medan 15 enbart hade initiering vid sexveckorskontrollen. Resterande 38 träd påvisade initieringar både vid tre- och sexveckorskontrollen. Vi noterade en överrepresentation av träd med generellt lägre initieringsfrekvens bland de träd som enbart påvisade initieringar vid treveckorskontrollen.

4.1 Associations-studie för förekomst av möjliga molekylära markörer för SE initiering

Denna studie av embryoinitieringsfrekvens hos utvalda plusträd av *Picea abies* är som nämnts en del av ett större projekt med syfte att undersöka om det går att koppla trädindividuers molekylära markörer till lyckad SE initiering genom en 'Genome-Wide Association Study'. Tidigare genomförda undersökningar på samma granmaterial som i denna studie har visat att molekylära markörer kopplade till bland annat vedegenskaper (Baison et al. 2019, 2020) och resistens mot rotröta (Elfstrand et al. 2020) kunnat identifieras. Det indikerar att det finns goda möjligheter till att även kunna koppla genmarkörer till SE-initiering. Detta även om en studie av Högberg et al. (1998) rapporterade en förhållandevis svag genetisk kontroll av SE-initiering i det undersökta granmaterialet jämfört med vad Park et al. (1993) rapporterat för vitgran.

SE-processen är en tids- och kostnadskrävande metod. För att öka initieringsförmågan vill man kunna välja ut träd som på förhand identifierats med molekylära markörer som lämpliga för denna metod. Arbetet inom projektet kommer att inkludera ytterligare trädindivider för att få ett tillräckligt stort underlag för att kunna leta efter markörer. Resultatet av detta arbete kan leda till ett mer tidseffektivt arbete. Det bör om möjligt undvikas att tid läggs på insamling av kottmaterial, sterilisering av fröer, undersökning av embryoutveckling samt embryoextraktion för träd som har låg sannolikhet för god initieringsfrekvens.

4.2 Metodutveckling under arbetets gång

Den första fasen av laboratoriet arbetet gick långsammare och dokumenterades inte lika utförligt som under de efterföljande veckorna. Detta på grund av att ett tydligt arbetssätt inte kunde implementeras direkt från start. Ny information framkom under arbetets gång som gjorde att arbetet fick pausas medan arbetsgången uppdaterades. En aspekt som tillkom i arbetet var att försöka undersöka om det baserat på kottens fysiologiska mognadsgrad gick att avgöra i vilket mognadsstadium embryot befann sig. Embryon i ett visst tidigt utvecklingsstadium ger en bättre initieringsfrekvens än vad mer utvecklade embryon gör vilket även en studie av Park et al. (1993) på vitgran (*Picea glauca*) påvisade. Där gav embryon i ett tidigare stadium tre gånger fler SE-initieringar än ett fullt utvecklat embryo. Embryostadierna 4 – 5 i vår studie (Figur 4) gav bäst initieringsfrekvens, något som även stöds av tidigare studier, se Pullman & Buchanan (2003).

En kontroll av embryostadiet hos trädindividuernas kottar innan arbetet med sterilisering och embryoextraktion påbörjades gjorde att arbetet blev mer effektivt. Detta på grund av att man på förhand inte visste status gällande embryots utvecklingsstadium och huruvida fröerna från vissa av träden kunde användas. En annan aspekt som fick undersökas under arbetets gång gällde lagringsmiljön för kottarna. Detta eftersom delar av kottmaterialet måste förvaras under flera månader i väntan på behandling, varför mögel- och torkrisken måste minimeras.

4.3 Felkällor

Arbetet med SE i labbmiljö var mer tidskrävande än vad vi och våra projektledare hade räknat med. Initialt var planen att vi skulle hinna undersöka initieringsfrekvensen på 200 träd. Detta ändrades under arbetets gång till 100 träd på grund av att det var ett stort och komplicerat projekt på ett för ändamålet obeprövat laboratorium. För att underlätta arbetet skulle vi ha ordnat med ett bättre och tydligare protokoll och arbetsmetod från start. Vissa felkällor som orsakat systematiska avvikelser i resultaten kan ha funnits gällande initieringsfrekvensen hos embryona. Resultaten kan ha påverkats av att vi var två personer som arbetade i labbet, trots att vi följde samma instruktioner kan vi ha hanterat fröer och embryon olika. Ett exempel på detta är hur det exponerade embryot placerades på odlingsmediet vilket kan påverka hur lyckad embryoinitieringen blir.

En annan möjlig felkälla skulle kunna vara hur kottarna förvarades under arbetet och hur de förvarades innan arbetet med embryoextraktionerna påbörjades. För att sprida ut riskerna gällande mögelangrepp och uttorkade kottar förvarades kottarna i två separata kylrum där vi kunde ha uppsikt på temperatur och luftfuktighet. Larver som lever i och av kottarna (Figur 12 och 13) försvårade arbetet att hitta fröer med intakta embryon, men om det påverkade initieringsfrekvens resultatet är oklart. Detsamma gäller förekomsten av svampangrepp så som grankotterost. Svampangreppen försvårade också arbetet genom att tidskrävande försiktighetsåtgärder fick vidtas för att förebygga spridningen av angreppet till närliggande kottar. Av träden som inte påvisade någon initiering testades 26 procent igen vid ett senare tillfälle. För att säkerställa att inte någon av ovanstående felkällor påverkat resultaten för dessa träd borde kanske alla träd där initiering misslyckats ha testats om. Detta kunde inte genomföras på grund av tidsbrist men kan vara en erfarenhet att ta med till framtida liknande projekt.

4.4 Erfarenheter gällande förvaring av kottar

Att plocka kottarna vid rätt antal dygnsgrader är viktigt för att embryona ska vara i rätt mognadsstadium och ha så goda förutsättningar som möjligt för att lyckas med SE-initieringen. Det är även viktigt att förvara kottmaterialet på ett lämpligt sätt för att inte materialet ska gå förlorat på grund av mögel eller uttorkning. Kottarna ska inte förvaras för varmt eller för fuktigt för att riskera mögelangrepp, men inte heller för torrt. Regelbundna kontroller av kottarna är därför att rekommendera då man tidigt kan upptäcka angrepp av mögel och förhindra spridning till övrigt material. Vårt material förvarades som litteraturen rekommenderar angående luftfuktighet (Wennström 2009), däremot förvarades de inte välventilerat utan låg kompakt packade i plastbackar med lock den första tiden. Detta borde ha förhindrat uttorkning men ökat risken för spridning av mögel då luftfuktigheten kan ha hållits för hög i lådorna. Dock så kunde vi konstatera efter tre månaders förvaring i kylrummen att kottarna ändå hade torkat ut (Figur 17), och de fick därefter kasseras.



Figur 17. Samma kotte fotograferad efter förvaring i kylrum med tre månaders mellanrum. Efter tre månader var frömaterial inte längre lämpligt att använda för SE.

Vissa kottar drabbades av mögelangrepp, detta kan ha varit en bidragande faktor till misslyckade initieringar. Kottmaterialet togs från två klonarkiv, Maltesholm samt Ekebo. En jämförelse mellan klonarkiven visade att Ekebo hade 40 procent lyckade initieringar medan Maltesholm visade 72 procent lyckade initieringar. Maltesholm hade även det största urvalet av kottmaterial med 86 träd, från Ekebo användes endast 10 träd. Skillnaden i lyckade initieringar mellan klonarkiven beror med stor sannolikhet på att kottarna plockades vid olika tidpunkter vilket gör att temperatursumman som påverkar mognadsgraden på embryona skiljde sig.

Utöver detta kan det geografiska läget för klonarkiven samt var på trädet kottarna togs ha påverkat mognadsgraden. Ekebokottarna drabbades i större utsträckning av mögel än vad kottarna från Maltesholm gjorde. En faktor som kan ha påverkat resultatet av långtidsförvaringen är omständigheterna vid insamlandet av materialet och hur det förvarades den första tiden innan materialet kom till laboratoriet. När kottarna från Maltesholm plockades var vädret soligt och torrt medan det regnade när kottarna från Ekebo samlades in. Detta kan ha bidragit till att det uppstod mer mögelangrepp på Ekebomaterialet. Samplet skiljer sig för mycket mellan de olika klonarkiven för att man ska kunna dra några säkra slutsatser om huruvida de skiljer sig åt.

4.5 Slutsatser

Vår hypotes om att det skulle finnas skillnader mellan trädindivider av gran gällande initieringsfrekvensen bevisades. Ett arbete av den här magnituden, med så många individuella träd att testa, har ej genomförts tidigare och de tidskrävande momenten i arbetet med SE blev tydliga. För att effektivisera det operationella arbetet är det av stor vikt att välja träd med garanterad initieringsförmåga. Vårt arbete kommer förhoppningsvis ligga till grund för identifiering av vissa genmarkörer kopplade till lyckad SE-initiering. Att arbeta med små outvecklade embryon försvårade avsevärt extraktionsprocessen, därför är det viktigt att plocka materialet vid det mest optimala antalet dygnsgrader samt undersöka en kottes embryoutveckling innan start av arbetet. En grundsten i arbetet var själva förvaringen av kottarna där brist på kunskap gällande optimala förvaringsmöjligheter gjorde att det uppkom problem med mögel och uttorkning. Detta har påverkat den totala mängden datamaterial då vissa kottar fick kasseras.

För att optimera framtida arbete med SE har även följande förslag utifrån gjorda erfarenheter tagits fram.

- Om möjligt, planera insamlingen av kottar till dagar med fint väder, undvik regn för att minska fukt vid långtidsförvaring.
- Förvara inte kottmaterialet i plastpåsar utan i papperspåsar.
- Flytta materialet skyndsamt från klonarkiv till kylförvaring.
- Kottarna bör förvaras välventilerat, ej för kompakt, så rena som möjligt (barr och grenar bör vara bortplockat), en luftfuktighet över 50 procent och en temperatur mellan + 5 °C till +15 °C.
- Skapa en noggrann struktur på arbetet och en tydlig uppmärkning av materialet och petriskålarna. Använd olika symboler för att märka upp embryostadiet samt för att indikera vid vilken kontroll (tre eller sex veckor efter start) initieringarna hittades.
- Om flera personer jobbar samtidigt så bör den insamlade informationen skrivas ner i olika pappersprotokoll och en person får ansvaret att föra över denna information i digital form.
- För dagliga laborationsanteckningar över arbetet, detta underlättar när den insamlade informationen ska sammanställas och om frågor uppstår gällande vissa resultat.
- Arbetet med embryoextraktion kan vara påfrestande för kroppen och huvudet på grund av den arbetsställning och koncentration som krävs. Inplanerade pauser och ett rotationsschema om flera arbetar är viktigt.
- Dokumentera och fotografera mycket och ofta.
- En planering gällande tillverkning av odlingsmediet är att rekommendera, arbetet avstannar och värdefull tid förloras om plattorna med odlingsmediet tar slut.

Referenser

- Baison, J., Vidalis, A., Zhou, L., Chen, Z., Li, Z., Sillanpää, M.J., Bernhardsson, C., Scofield, D., Forsberg, N., Grahn, T., Olsson, L., Karlsson, B., Wu, H., Ingvarsson, P.K., Lundqvist, S., Niittylä, T. & García-Gil, M.R. (2019). Genome-wide association study identified novel candidate loci affecting wood formation in Norway spruce. *The Plant Journal*, 100 (1), 83–100. <https://doi.org/10.1111/tpj.14429>
- Baison, J., Zhou, L., Forsberg, N., Mörling, T., Grahn, T., Olsson, L., Karlsson, B., Wu, H.X., Mellerowicz, E.J., Lundqvist, S.-O. & García-Gil, M.R. (2020). Genetic control of tracheid properties in Norway spruce wood. *Scientific Reports*, 10 (1), 18089. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72586-3>
- Cheliak, W.M. & Klimaszewska, K. (1991). Genetic variation in somatic embryogenic response in open-pollinated families of black spruce. *Theoretical and Applied Genetics*, 82 (2), 185–190. <https://doi.org/10.1007/BF00226211>
- Chen, Z.-Q., Hai, H.N.T., Helmersson, A., Liziniewicz, M., Hallingbäck, H.R., Fries, A., Berlin, M. & Wu, H.X. (2020). Advantage of clonal deployment in Norway spruce (*Picea abies* (L.) H. Karst). *Annals of Forest Science*, 77 (1), 14. <https://doi.org/10.1007/s13595-020-0920-1>
- Chen, Z.-Q., Lundén, K., Karlsson, B., Vos, I., Olson, Å., Lundqvist, S.-O., Stenlid, J., Wu, H.X., García Gil, M.R. & Elfstrand, M. (2018). Early selection for resistance to *Heterobasidion parviporum* in Norway spruce is not likely to adversely affect growth and wood quality traits in late-age performance. *European Journal of Forest Research*, 137 (4), 517–525. <https://doi.org/10.1007/s10342-018-1120-5>
- Du, Q., Lu, W., Quan, M., Xiao, L., Song, F., Li, P., Zhou, D., Xie, J., Wang, L. & Zhang, D. (2018). Genome-Wide Association Studies to Improve Wood Properties: Challenges and Prospects. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1912. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01912>
- Egertsdotter, U. (2019). Plant physiological and genetical aspects of the somatic embryogenesis process in conifers. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 34:5, 360–369. <https://doi.org/10.1080/02827581.2018.1441433>
- Elfstrand, M., Baison, J., Lundén, K., Zhou, L., Vos, I., Capador, H.D., Åslund, M.S., Chen, Z., Chaudhary, R., Olson, Å., Wu, H.X., Karlsson, B., Stenlid, J. & García-Gil, M.R. (2020). Association genetics identifies a specifically regulated Norway spruce laccase gene, *PALAC5*, linked to *Heterobasidion parviporum* resistance. *Plant, Cell & Environment*, 43 (7), 1779–1791. <https://doi.org/10.1111/pce.13768>
- Högberg, K.-A., Ekberg, I., Norell, L. & von Arnold, S. (1998). Integration of somatic embryogenesis in a tree breeding programme: a case study with *Picea abies*. *Canadian Journal of Forest Research*, 28 (10), 1536–1545. <https://doi.org/10.1139/x98-137>
- Isik, F. (2014). Genomic selection in forest tree breeding: the concept and an outlook to the future. *New Forests*, 45 (3), 379–401. <https://doi.org/10.1007/s11056-014-9422-z>

- MacKay, J.J., Becwar, M.R., Park, Y.-S., Corderro, J.P. & Pullman, G.S. (2006b). Genetic control of somatic embryogenesis initiation in loblolly pine and implications for breeding. *Tree Genetics & Genomes*, 2 (1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11295-005-0020-2>
- Nielsen, U.B., Hansen, C.B., Hansen, U., Johansen, V.K. & Egertsdotter, U. (2022). Accumulated effects of factors determining plant development from somatic embryos of *Abies nordmanniana* and *Abies bornmuelleriana*. *Frontiers in Plant Science*, 13, 989484. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.989484>
- O'Donnell, J. & Russel, H. (2011). Spruce Gall Midge. <https://www.yumpu.com/en/document/read/38796169/spruce-gall-midge-fact-sheet-2011> [2022-11-18]
- Park, Y.S., Pond, S.E. & Bonga, J.M. (1993). Initiation of somatic embryogenesis in white spruce (*Picea glauca*): genetic control, culture treatment effects, and implications for tree breeding. *Theoretical and Applied Genetics*, 86 (4), 427–436. <https://doi.org/10.1007/BF00838557>
- Pillitteri, L.J., Peterson, K.M., Horst, R.J. & Torii, K.U. (2011). Molecular Profiling of Stomatal Meristemoids Reveals New Component of Asymmetric Cell Division and Commonalities among Stem Cell Populations in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 23 (9), 3260–3275. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.088583>
- Pinto, G., Park, Y.-S., Neves, L., Araújo, C. & Santos, C. (2008). Genetic control of somatic embryogenesis induction in *Eucalyptus globulus* Labill. *Plant Cell Reports*, 27 (6), 1093–1101. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0532-y>
- Puentes, A., Högberg, K.-A., Björklund, N. & Nordlander, G. (2018). Novel Avenues for Plant Protection: Plant Propagation by Somatic Embryogenesis Enhances Resistance to Insect Feeding. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1553. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01553>
- Pullman, G.S. & Buchanan, M. (2003). Loblolly pine (*Pinus taeda* L.): stage-specific elemental analyses of zygotic embryo and female gametophyte tissue. *Plant Science*, 164 (6), 943–954. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00080-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00080-3)
- Rosvall, O. (2019). Using Norway spruce clones in Swedish forestry: Swedish forest conditions, tree breeding program and experiences with clones in field trials. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 34 (5), 342–351. <https://doi.org/10.1080/02827581.2018.1562566>
- Rosvall, O., Andersson Gull, B., Berlin, M., Högberg, K.-A., Stener, L.-G., Jansson, G., Almqvist, C. & Westin, J. (2016). Skogsskötselserien – Skogsträdsförädling. I: *Skogsträdsförädling*. (19). 2. uppl. Skogsstyrelsens förlag, www.skogsstyrelsen.se/skogsskotselserien. <https://www.skogsstyrelsen.se/globalassets/mer-om-skog/skogsskotselserien/skogsskotsel-serien-19-skogstradsforadling.pdf> [2022-12-15]
- Rosvall, O., Bradshaw, R., Egertsdotter, U., Ingvarsson, P. & Wu, H. (2019c). Grankloner i svenskt skogsbruk – förökning med somatisk embryogenes? *FAKTA SKOG – Rön från Sveriges lantbruksuniversitet*, 2019 (5). https://www.slu.se/globalassets/ew/ew-centrala/forsk/popvet-dok/faktaskog/faktaskog19/faktaskog_05_2019.pdf

- Rosvall, O., Bradshaw, R.H.W., Egertsdotter, U., Ingvarsson, P.K., Mullin, T.J. & Wu, H. (2019b). Using Norway spruce clones in Swedish forestry: implications of clones for management. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 34 (5), 390–404.
<https://doi.org/10.1080/02827581.2019.1590631>
- Rosvall, O., Bradshaw, R.H.W., Egertsdotter, U., Ingvarsson, P.K. & Wu, H. (2019a). Using Norway spruce clones in Swedish forestry: introduction. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 34 (5), 333–335.
<https://doi.org/10.1080/02827581.2018.1562565>
- Skogsstyrelsen (2022). Levererade skogsplantor 2021. Skogsstyrelsen.
<https://www.skogsstyrelsen.se/globalassets/statistik/statistikfaktablad/JO0313-statistikfaktablad-levererade-skogsplantor-2021.pdf> [2022-12-15]
- Södra Plantprislista 2022 (2021). Södra skogsägarna.
https://www.sodra.com/_download/sp/?fileRef=/sites/publicdocuments/De%20lade%20dokument/Plantprislista_A4.pdf&fileType=pdf&fileName=Plantprislista_A4.pdf [2022-12-15]
- Thekopsora areolata (cherry spruce rust) (2022). *PlantwisePlus Knowledge Bank*, Species Pages, 45892. <https://doi.org/10.1079/pwkb.species.45892>
- Tibbs Cortes, L., Zhang, Z. & Yu, J. (2021). Status and prospects of genome-wide association studies in plants. *The Plant Genome*, 14 (1).
<https://doi.org/10.1002/tpg2.20077>
- Uffelmann, E., Huang, Q.Q., Munung, N.S., de Vries, J., Okada, Y., Martin, A.R., Martin, H.C., Lappalainen, T. & Posthuma, D. (2021). Genome-wide association studies. *Nature Reviews Methods Primers*, 1 (1), 59.
<https://doi.org/10.1038/s43586-021-00056-9>
- Wennström, U. (2009). PLANTskolan – Plantodling från grunden. Lektion 8: Från kotte till frö. *PLANTaktuellt*, (1).
https://www.skogforsk.se/cd_20191110182614/contentassets/b16a647085974e08b92ac167aaa9b51d/plantaktuellt-2009-1.pdf [2022-11-06]

Bilagor

1. Beskrivning av laborativ metod (B) för initiering av somatiska embryon från granfrö som plockas ut från färska, omogna kottar



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Document name	Last updated
Applied description for SE initiations from Norway spruce adopted for School of Forest Management, SLU	2022-07-13; 2022-08-31
Approved by (date)	Print date
Ulrika Egertsdotter	2023-01-20
Issuer	Page (total)
Ulrika Egertsdotter	28 (1)
Josefine Björs 2022-08-31	

Nedan finns en beskrivning för hur man startar kulturer av somatiska embryon från granfrö-embryo. Metoden är något annorlunda beroende på om man startar med torkade fröer (metod A) eller färska fröer från omogna kottar (metod B). Här beskrivs metoden för omogna kottar (metod B).

Det är viktigt att noga dokumentera vilken frökälla som används i experimenten! Lämpligen görs en lista med frö-ursprung dvs korsningar där varje korsning får ett nummer som sedan kan skrivas på petriskålen med de isolerade embryona. Datum för start av initieringen skall också skrivas på petriskålen.

Metod B för fröer från omogna kottar

Utrustning och material:

- Färska omogna kottar plockade vid rekommenderad temperatursumma för optimal SE-initiering
- Sterilt vatten
- Falcon-rör **50 ml**
- 96% etanol
- Tween 20
- 30% väteperoxid – **OBS! Handskar och skyddsglasögon vid hantering!**

Förbered för sterilt arbete genom att sterilisera nödvändig utrustning och vatten. Autoklavera följande:

- 300 ml avjonat vatten helst i droppsäker glasflaska. Räkna med 100 ml vatten per frö-sort.
- Tesilar (en för varje frö-sort eller för varje 100 frö)
- Pincetter och skalpell för embryo-isoleringen

- Sätt på sterilbänken som skall användas dagen före. Ytsterilisera sterilbänken med 70% etanol eller motsvarande ytsteriliserings-vätska, sätt på och lämna på över natten.

Dag 1:

Förberedelser för isolering av frö-embryo för SE-isolering

1. Ytsterilisera sterilbänken.
2. Klipp till Parafilm-strimlor som räcker till att vira runt petriskålen två gånger. Lämnas inom räckhåll utanför sterilbänken.
3. Förbered dissekerings-arbetet i sterilbänken genom att ställa i ordning: 96% etanol, pincetter, skalpell-hållare, skalpell-blad, autoklaverade glaspetriskålar, Falconrör med steriliserade fröer och det antal odlingsmediumplattor som behövs för morgondagens arbete. Se till att det finns en bra arbetsplats där allt som behövs för dissekeringsarbetet är inne i sterilbänken och placerat i möjligaste mån så att inte luftflödet blockeras.
4. Ytsterilisera en lupp och ställ in i sterilbänken som lämnas på över natten.

Dag 2:

Rengöring av kottar

Arbeta vid diskho med tillgång till rinnande vatten. Ta bara fram det antal kottar som skall användas under den närmaste veckan, resten lämnas i papperspåsen.

5. Rengör kottarna med diskmedel och en mjuk borste eller trasa
6. Skölj under rinnande vatten i 20 min
7. Lägg kottarna som skall nyttjas för initiering inom några dagar i plastpåse i +4C. Kottar som skall sparas läggs i papperspåse.
8. Kottarna läggs i en stor petriskål (15 cm) och 'fjällen' med fröer avlägsnas från kotten med hjälp av en skalpell och pincett. Fröerna avfjällas och plockas sedan till ett 50 ml Falconrör (sterilbänk); lägg 50–60 fröer från varje moderträd per Falconrör

Sterilisering av fröer

9. Tillsätt 13 ml 96% etanol (**sterilbänk**) till Falconröret med fröer från kotten, skruva på locket, skaka för hand under 1 min (ej sterilt, när locket är på kan Falcon-röret flyttas utanför sterilbänken).
10. Avlägsna etanolen med hjälp av tesil, pipettera bort eller håll av i **sterilbänk**. Etanolen hålls sedan ut i avloppet.
11. **OBS! Handskar och skyddsglasögon!** Tillsätt 13 ml **30% väteperoxid** och 1 droppe Tween20 i **sterilbänk**. Skruva på locket och ställ Falcon-röret i provrörsstället på skakbordet (skall röra om bland fröerna) och lämna på skakning under **20 min**. Det kan behövas längre tid beroende på hur 'rent' fröet är. Om embryona på odlingsmedie-plattan inte har blivit infekterade med svamp eller bakterier efter några dagar så räcker det med 20 min sterilisering. Om det är mycket infektion kan man prova med 30 min istället.
12. **OBS! Handskar och skyddsglasögon** Avlägsna väteperoxiden med hjälp av tesil, pipettera bort eller håll av i **sterilbänk**. Använd väteperoxid samlas i flaska för destruktion.
13. Tillsätt 20–25 ml sterilt vatten (**sterilbänk**), skruva på locket, ställ på skakbordet under 7 min.
14. Avlägsna vattnet med hjälp av tesil, pipettera bort eller håll av i **sterilbänk**.
15. Upprepa steg 13 och 14 totalt tre gånger.
16. Håll fröer som skall dissekeras i en tom petriskål och separera fröerna, lägg tillbaka locket på petriskålen. Förslut petriskålen med parafilm och ställ in i kylskåp om isolering av fröembryo sker nästkommande dag.

Isolering av fröembryo för start av somatisk embryo-kultur (**sterilbänk**)

1. Torka av luppen som redan står i sterilbänken. Lägg en del av en glaspetriskål på dissektionsplattan.
2. Sätt i ett skalpellblad i skalpellen, dippa skalpellen och pincetterna i etanol och flamblera, lämna för avsvälning på hållaren.

3. Med hjälp av de flamberade pincetterna, flytta över några fröer till glaspetriskålen under luppen.
4. Med hjälp av pincetterna och skalpellen, avlägsna fröskalet och den underliggande hinnan.
5. Skär sedan ett längsgående snitt i det vita frö-ämnet som finns under hinnan. Tänk på att embryot finns i frö-ämnet så skär bara till knappt hälften av frö-ämnets tjocklek från olika håll för att inte skada embryot. *OBS- skada på embryot kan påverka SE-induktionen!* Öppna frö-embryot genom att vika ut det i två delar medan det fortsatt sitter ihop med embryos och den andra halvan. Lägg embryots tillsammans med de två delarna av frö-ämnet på odlingsmediet i petriskålen (se bild nedan).
6. Lägg max tre embryon per 6 cm petriskål och max 5 per 9 cm petriskål, lägg embryon på två rader.
7. Vira två varv av parafilm runt petriskålen med embryon och odlingsmedium.
8. Ställ skålen i rumstemperatur i mörker.



2. Beskrivning för tillagning och recept för odlingsmedium (½ LP) för initiering av somatiska embryon från gran

Beskrivning för tillagning och recept för odlingsmedium (½ LP) för initiering av somatiska embryon från gran

Issued: 17.06.2022; updated 01.08.2022; 31.08.2022
Ulrika Egertsdotter; Josefine Björs
3 sidor

- Nedan beskrivs tillverkning av 1 L ½ LP medium.
- Volymen kan anpassa proportionellt till andra volymer, se tabellen på s. 2.
- Den kemiska sammansättningen av mediet finns på s. 2 (stamlösningarna) och s. 3 (pulversammansättning).

Beskrivning för tillagning av 1 L ½ LP gran SE odlingsmedium för initiering och proliferering av somatiska embryo.

1. Tag ut från frysen för att tina ett provrör vardera av 2,4 D, BAP och glutamin (om inte färskt glutamin ska användas). Glutaminet ställs i sterilbänk och tillsätts sterilt efter autoklavering.
2. Tillsätt 500 ml avjonat vatten till en 1 L glasbägare. Sätt till en magnet och ställ på omrörning på magnetomröraren.
3. Väg upp 1,9 g färdigblandat pulver för 1/2LP (Duchefa) och tillsätt till bägaren på omrörning.
4. Väg upp 10 g sucrose och tillsätt.
5. Tillsätt ett tinat rör av 2,4D och ett av BAP (kan tinas i ljummet vatten). Se volym och koncentration i tabellen nedan.
6. När allt är löst, fyll på avjonat vatten till 980 ml.
7. ställ pH till 5.8 med 0.1 M NaOH.
8. Tag fram två stycken 1000 ml DURAN/SCHOTT flaskor eller motsvarande behållare som är lämplig för att autoklavera 500 ml vätska och sedan hälla upp mediet i petriskålar från.
9. Väg upp 1.75 g gelrite till vardera 1000 ml DURAN/SCHOTT flaska.
10. Häll över 490 ml av odlingsmediet från 1 L bägaren till vardera 1000 ml flaskan. Skruva på locken löst. Tryck fast en bit folie över korken och en bit ner på flaskan.
11. Autoklavera vid 121 °C under 20 min vid 1.1 bar.
12. Skruva till korken lätt efter autoklavering och viss avsvälning. Ta mediet till sterilbänken.
13. Vid användning av färskt glutamin så tillsätt 450 mg (för 1 L medium enligt tabell nedan) glutamin till 10 ml avjonat vatten i en bägare. Sätt till en magnet och ställ på omrörning på magnetomröraren.
14. När glutaminpulvret är löst ta med bägaren till sterilbänk.

15. Dra upp glutaminlösningen med en 10 ml spruta och sätt fast ett sterilt sprutfilter.
16. Tillsätt steril glutaminlösning (fryst steril lösning eller **sterilfiltrera nygjord**) efter autoklavering när mediet svalnat till ca 50–55 °C. Se volym och koncentration i tabellen nedan.
17. Blanda genom att rotera flaskan.
18. I sterilbänk: öppna en ny påse med sterila petriskålar (9 cm eller 6 cm) och ta ut skålarna i sterilbänken. Placera ut en rad av petriskål i bakre delen av sterilbänken. Häll ca 20 ml medium per 9 cm petriskål. Stäng locket på petriskålen direkt efter att mediet har hållts i.
19. Låt mediet svalna och stelna något innan det staplas och skjuts till ena sidan av sterilbänken. Upprepa till allt medium hållt upp. När alla plattor är avsvalnade och stelnade läggs de i staplar och petriskålarnas originalpåsar träs på staplarna.
20. Låt plattorna vila i rumstemp under minst 2–3 dagar i sterilbänk under originalpåsar. Om inget bakterieangrepp kan synas så delas staplarna upp i mindre staplar om 6 – 8 petriskålar och plastas in med plastfolie.
21. Ställ de inplastade staplarna upp och ner i kylskåp.

Tillverkning av olika volymer av ½ LP medium

Volume:	2 L	1 L	0.5 L	Stamlösning
½ LP*	3.8 g	1.9 g	0.95 g	----
2,4-D	4 ml	2 ml	1 ml	1.105 mg/ ml
BAP	20 ml	10 ml	5 ml	0.1 mg/ml
Sucrose	20 g	10 g	5 g	----
Gelrite	7 g	3.5 g (1.75 g in 500 ml)	1.75 g	----
L-Glutamine	900 mg	450 mg (10 ml av stamlösning)	250 mg (5 ml av stamlösning)	45 mg/ ml

* Duchefa DU 1420, UPSC Medium 3.

Stamlösningar för ½ LP medium

1. 2,4-D (Dichlorophenoxyacetic acid)

Stock preparation: 221 mg of 2,4-D dissolve in 1-2 ml 1 M NaOH and add 200 ml MQ H₂O and store at 4 °C.

2. BAP (6-Benzylaminopurine)

Stock preparation: 50 mg/500 ml. Dissolved in 1 ml 1 M NaOH and add MQ H₂O and store at 4 °C.

3. L-Glutamine

Stock preparation: 900 mg / 20 ml H₂O (microwave to dissolve) is filter-sterilized and added into 2 l of autoclaved medium, solid or liquid, after temperature has gone down some, approx. 1 h for 2 liters.

Mediumsammansättning i färdigblandat pulver:

Duchefa DU 1420, UPSC Medium 3

½ LP medium is used for Norway spruce somatic embryogenesis (SE) induction and proliferation of embryogenic cultures (½ LP medium modified from: von Arnold & Erikson, 1981, Can. J. Bot. 59: 870-874).

Composition of 3.5 g powder (Duchefa DU 1420, UPSC Medium 3) medium in 1 l	
	Concentration
Macro Elements	g/l
KNO ₃	0.95 g
NH ₄ NO ₃	0.3 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.185 g
KH ₂ PO ₄	0.17 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.22 g
Micro Elements	mg/l
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2.35 mg
KI	0.375 mg
H ₃ BO ₃	0.315 mg
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.845 mg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.0125 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.00125 mg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.00125 mg
Vitamins	mg/l
Pyridoxine (B6)	0.5 mg
Nicotinic acid (B9)	1 mg
Thiamine-HCl (B3)	2.5 mg
Myo-Inositol	225 mg
Fe-EDTA	mg/l

FeSO ₄ ·7H ₂ O	6.95 mg
Na ₂ EDTA	9.31 mg

3. Initieringsresultat

Tabell 5. Initieringsresultat för träd som hanterades v.24 – 25. Initieringarna är sorterade efter om de observerades vid 3-veckorskontrollen eller 6-veckorskontrollen. Den totala mängden initieringar/antal embryon syns i kolumnen ”totalt”.

ID	Träd	3 veckor	6 veckor	Totalt	Annat
S23X1520777	1				Frysta fröer
S23X1520386	2				Frysta fröer
S23X1520479	3				Frysta fröer
S23X1520300	4				Frysta fröer
S23X1520637	5				Frysta fröer

Tabell 6. Initieringsresultat för träd som hanterades v.29. Initieringarna är sorterade efter om de observerades vid 3-veckorskontrollen eller 6-veckorskontrollen. Den totala mängden initieringar/antal embryon syns i kolumnen ”totalt”.

ID	Träd	3 v	6 v	Totalt	Annat
S21K8320761	6				
S21K8320832	7				
S21K8420379	8				
S21K8320801	9				Omogna kottar
S21K8322230	10				Okänd mognadsgrad på kotten
S21K8320726	11	3		3/10	
S21K8322231	12.1				Bara 5 embryon plockade
S21K8322102	13	1		1/10	Omogna kottar
S21K8322233	14	1	1	2/10	Omogna kottar
S21K8322237	15	3	1	4/10	Omogna kottar

Tabell 7. Initieringsresultat för träd som hanterades v.30, ID markerat i lila visar träd från Ekebo. Initieringarna är sorterade efter om de observerades vid 3-veckorskontrollen eller 6-veckorskontrollen. Den totala mängden initieringar/antal embryon syns i kolumnen ”totalt”.

ID	Träd	3 v	6 v	Totalt	Annat
S21K8320991	16	1	1	2/10	
S21K8320911	17		1	1/10	
S21K8220143	18	1		1/5	Bara 5 embryon plockade
S21K8220121	19	1	2	3/9	1 embryo blev angripet av bakterier
S21K8322115	20		1	1/5	1 platta drabbades av mögel och kasserades
S21K8320732	21				Testas om, för små embryon
S21K8420347	22				
S21K8420143	23				Testas om, för små embryon
S21K8322344	24				
S21K8420216	25				Bara 5 embryon plockade från en kotte, grankotterost på resterande kottar.
S21K8420345	26				
S21K8320793	27	2	2	4/10	
S21K8420378	28				
S21K8420015	29	2		2/5	1 platta drabbades av mögel och kasserades
S21K8220813	30				
S21K8320992	31	1		1/5	1 platta drabbades av mögel och kasserades

Tabell 8. Initieringsresultat för träd som hanterades v.31. Initieringarna är sorterade efter om de observerades vid 3-veckorskontrollen eller 6-veckorskontrollen. Den totala mängden initieringar/antal embryon syns i kolumnen ”totalt”.

ID	Träd	3 v	6 v	Totalt	Annat
S21K8322231	12.2				5 embryon plockade
S21K8220693	32				
S21K8420213	33				
S21K8320924	34				
S21K8320939	35	1	2	3/10	
S21K8322326	36				Ska testas om, för små embryon
S21K8322202	37	1	2	3/10	
S21K8320821	38	1	5	6/10	
S21K8320972	39		1	1/10	
S21K8322323	40		1	1/9	
S21K8320696	41	2	3	5/10	
S21K8420342	42	1	5	6/10	
S21K8320830	43		6	6/10	
S21K8320954	44	1	3	4/10	
S21K8320695	45	1	2	3/10	
S21K8420325	46		2	2/5	

Tabell 9. Initieringsresultat för träd som hanterades v.32. Initieringarna är sorterade efter om de observerades vid 3-veckorskollen eller 6-veckorskollen. Den totala mängden initieringar/antal embryon syns i kolumnen "totalt".

ID	Träd	3 v	6 v	Totalt	Annat
S21K8320733	47	1	4	5/10	
S21K8320729	48	4	5	9/10	
S21K8322114	49		6	6/10	
S21K8420376	50	1		1/10	
S21K8320952	51	3	6	9/10	
S21K8322234	52	1	2	3/10	
S21K8320925	53	2	4	6/10	
S21K8320978	54		3	3/5	
S21K8220650	55				Uttorkade fröer, träd ska testas om
S21K8320823	56		4	4/10	

Tabell 10. Initieringsresultat för träd som hanterades v.33, ID markerat i lila visar träd från Ekebo. Initieringarna är sorterade efter om de observerades vid 3-veckorskollen eller 6-veckorskollen. Den totala mängden initieringar/antal embryon syns i kolumnen "totalt".

ID	Träd	3 v	6 v	Totalt	Annat
S21K8220346	57	1		1/5	
S21K8320947	58	3	4	7/10	
S21K8220700	59	1		1/10	
S21K8220127	60				Tomma fröer, träd ska testas om
S21K8420330	61				Grankotterost. Träd kasseras
S21K8320755	62	1	4	5/10	
S21K8320693	63	3	7	10/10	
S21K8322236	64	4	1	5/10	
S21K8320937	65	1	3	4/10	
S21K8320740	66	1	4	5/10	
S21K8320914	67		3	3/10	
S21K8322235	68	4		4/10	
S21K8320827	69	2		2/10	
S21K8322124	70				
S21K8420341	71	2		2/5	
S21K8420352	72				Tomma fröer, träd ska testas om
S21K8322250	73		2	2/10	
S21K8320969	74	2	1	3/10	
S21K8320880	75	1	1	2/10	
S21K8320818	76	2		2/10	
S21K8320970	77	1	4	5/10	
S21K8320908	78	6	1	7/10	
S21K8320814	79	1	1	2/10	

Tabell 11. Initieringsresultat för träd som hanterades v.34, ID markerat i lila visar träd från Ekebo. Initieringarna är sorterade efter om de observerades vid 3-veckorskontrollen eller 6-veckorskontrollen. Den totala mängden initieringar/antal embryon syns i kolumnen ”totalt”.

ID	Träd	3 v	6 v	Totalt	Annat
S21K8320774	80	1	3	4/10	
S21K8320874	81	4	3	7/10	
S21K8320776	82		2	2/10	
S21K8322243	83	5	3	8/10	
S21K8320877	84				Tomma fröer, träd ska testas om
S21K8320879	85	2	2	4/10	
S21K8220803	86				Grankotterost, träd kasserat
S21K8420263	87	6	2	8/10	
S21K8320813	88	2	2	4/10	
S21K8322364	89	5	3	8/10	
S21K8320945	90	1	1	2/10	
S21K8320730	91	1	1	2/10	
S21K8220191	92				Mögliga kottar, larver. Träd kasserat
S21K820118	93				Tomma fröer, träd ska testas om
S21K8220807	94				Grankotterost, träd kasserat
S21K8320940	95	3		3/10	Mycket larver i kottarna
S21K8322229	96				
S21K8420008	97	3	1	4/10	
S21K8220094	98		1	1/3	Mögel, larver, uttorkade kottar
S21K8220122	99				Mögliga kottar, tomma fröer. Träd kasserat
S21K8220427	100		4	4/10	Mycket larver i kottarna
S21K8220422	101		6	6/10	Mycket larver i kottarna

4. Hypotesprövning

Tabell 12. Antal träd (n) som testades varje vecka och hur många träd som påvisade initiering.

Vecka	n:	Antal träd med påvisade initieringar
29	10	4
30	16	8
31	16	11
32	10	9
33	23	19
34	22	15

Hypotes: Andel träd med påvisad initiering är samma innan vecka 32 som efter vecka 32.

Mothypotes: Andel träd med påvisad initiering är högre efter vecka 32 än innan vecka 32.

π_A = Antal träd med påvisade initieringar vecka 29 till 31

π_B = Antal träd med påvisade initieringar vecka 33 till 34

$$\begin{cases} H_0 : \pi_A = \pi_B \\ H_1 : \pi_A \neq \pi_B \end{cases}$$

$$P_A = 23/42$$

$$P_B = 34/45$$

Formel:

$$Z = \frac{P_1 - P_2 - (\pi_1 - \pi_2)}{\sqrt{P(1-P)\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}} \text{ där } P = \frac{n_1 P_1 + n_2 P_2}{n_1 + n_2}$$

$$Z = -2,039$$

Dubbelsidigt test:

P %	z
5 %	1,64
1 %	2,58
0,1 %	3,09

Slutsats: H_0 kan förkastas på 5 % signifikansnivå. Detta innebär att mothypotesen H_1 är sann med 95 % säkerhet. Det finns alltså en signifikant skillnad i initieringsgrad i datamaterialet, med en högre grad av initiering under den senare tidsperioden.

Publicering och arkivering

Godkända självständiga arbeten (examensarbeten) vid SLU publiceras elektroniskt. Som student äger du upphovsrätten till ditt arbete och behöver godkänna publiceringen. Om du kryssar i **JA**, så kommer fulltexten (pdf-filen) och metadata bli synliga och sökbara på internet. Om du kryssar i **NEJ**, kommer endast metadata och sammanfattning bli synliga och sökbara. Fulltexten kommer dock i samband med att dokumentet laddas upp arkiveras digitalt.

Om ni är fler än en person som skrivit arbetet så gäller krysset för alla författare, ni behöver alltså vara överens. Läs om SLU:s publiceringsavtal här:

<https://www.slu.se/site/bibliotek/publicera-och-analysera/registrera-och-publicera/avtal-for-publicering/>.

JA, jag/vi ger härmed min/vår tillåtelse till att föreliggande arbete publiceras enligt SLU:s avtal om överlåtelse av rätt att publicera verk.

NEJ, jag/vi ger inte min/vår tillåtelse att publicera fulltexten av föreliggande arbete. Arbetet laddas dock upp för arkivering och metadata och sammanfattning blir synliga och sökbara.