



Prosjektrapport:

«Genetiske undersøkelser av villeple på Jomfruland», 2017-2019

Sammendrag

I Norge vokser villeple (*Malus sylvestris*) spredt i små bestand eller som enkelttrær i et smalt belte langs kysten fra Østfold til Nord-Trøndelag. Habitatet er knyttet til åpent kulturlandskap. Tidligere kartlegging av villeple har vist at det er en høy andel hybridepler i Norge som resultat av hybridisering med hageeple. Villeple vurderes av den grunn som sårbar (VU) på rødlista. Øya Jomfruland i Kragerø kommune har ikke vært inkludert i tidligere studier av villeple. I dette prosjektet har vi gjort en morfologisk og genetisk kartlegging av villeple og villepleforyngelse på øyas nordre del som er en del av Jomfruland nasjonalpark. Dette for å vurdere både skjøtsel og bevaringstiltak, samt undersøke om bestandet på øya kan egne seg som bevaringsbestand for genressurser i villeple i tilknytning til nasjonalparken.

Gjennom to feltsesonger registrerte vi forekomster av villeple, gjorde morfologiske undersøkelser, samt samlet inn prøver for DNA-analyser på øyas nordlige del. Større trær ble merket. I tidligere undersøkelser har DNA-analyser avslørt en litt høyere andel hybrider enn morfologiske undersøkelser, dette pga at det er glidende overganger mellom taxaene både når det gjelder morfologi og DNA. På Jomfruland var det god overenstemmelse mellom den morfologiske kartleggingen og DNA-analysene, men vi fant også en mindre andel hybridepler basert på DNA enn basert på morfologi. Basert på DNA ble 23 av 287 trær, inklusive tre trær som vi visste var hageepler, identifisert som hage-/hybridepler. Foryngelse og småtrær var ikke mer påvirket av hybridisering enn store trær.

Både størrelsen på bestandet og at det ligger på ei øy er sannsynligvis viktige faktorer for å opprettholde genetisk rene villepler. Vi fant en romlig genetisk struktur opp til ca 100 meter. Det er derfor rimelig å anta at mye genflyt (pollinering og frøspredning) skjer innenfor en radius på 100 meter. Både STRUCTURE og DAPC analysen antyder at det kan være tre genetiske grupper på Jomfruland. Dette kan komme av forskjellige spredningshendelser av villeple til Jomfruland. Om det skyldes at folk har tatt med seg villeple, eller om det er forskjellige innvandringsveier, vet vi ikke.

Konklusjon: Undersøkelsen bekrefter at det er et stor villeplebestand på Jomfruland, sannsynligvis av nasjonal betydning. Dette er svært velegnet som bevaringsbestand for genetiske ressurser. Skjøtsel og forvaltning bør fokusere på å opprettholde kontinuiteten i populasjonen, sikre habitatene ved å sørge for at områdene ikke gror igjen, samt fjerne de få hage-/hybridepletrærne vi identifiserte.

1. Mål

Prosjektet «Genetiske undersøkelser av villeple på Jomfruland» er gjennomført i perioden 2017-2019, for å kartlegge villeple (*Malus sylvestris* (L.) Mill) i deler av Jomfruland nasjonalpark, samt legge grunnlaget for eventuelle bevaringstiltak for villeple på øya Jomfruland. Resultatene fra

kartleggingen er forventet å utgjøre et viktig kunnskapsgrunnlag for forvaltningen av villeplebestandet i nasjonalparken.

Hovedformålet med prosjektet var å kartlegge hybridisering i villeplebestandet på Jomfruland for å kunne utarbeide konkrete forvaltnings- og skjøtselsråd.

Revidert delmål for prosjektet i 2017:

- Feltkartlegging av villeplebestandet på Jomfruland
- Legge grunnlag for genetiske analyser, med særlig fokus på kartlegging av hybridiseringsgrad i foryngelsen i villeple på Jomfruland.

Delmål for 2018 var i tillegg å estimere bestandsdata basert på feltarbeid:

- Bestandsstørrelse
- Antall reproduserende individer
- Genetisk variasjon og hybridisering både i voksne og unge individer

Som et ledd i bevaring av villeple i Europa, ønsker Norsk genressursenter/NIBIO videre å vurdere et dedikert bevaringsbestand for genressurser i villeple i tilknytning til Jomfruland nasjonalpark.

2. Bakgrunn

Villeple er et lite tre som tilhører rosefamilien. Arten har sin hovedutbredelse i vestre og sentrale deler av Europa, men finnes spredt over hele Europa. I Norge vokser villeple svært spredt i et smalt belte langs kysten fra Østfold til Nord-Trøndelag. Villeple er en viktig genetisk ressurs for mat og landbruk. Villeple hybridiserer med hageeple og det er i flere studier rapporter om høy grad av hybridisering (Coart m.fl., 2003; Larsen m.fl., 2006; Cornille m.fl., 2012). I disse studiene har man brukt en kombinasjon av morfologiske og molekylærgenetiske markører for å bestemme hva som er rene arter og hva som er hybrider. På gruppenivå finner man et rimelig godt samsvar mellom morfologi og genetiske markører, men på individnivå er korrelasjonen varierende. I en undersøkelse vi gjorde av villeple i 2014 fant vi færre genetisk sett «reine» villepler basert på DNA-analyser enn basert på morfologi. Konklusjonene fra prosjektet var at hybridisering med hageeple er en trussel mot villeple i Norge (Tollefsrud m.fl., 2014). I tillegg er villeple knyttet til kulturlandskapet, og derfor også utsatt på grunn av gjengroing.

Studiene om villeplets status har ført til en oppgradering av villeplet på Norsk rødliste for arter 2015. Villeple vurderes nå som sårbar (VU) fordi den blir genetisk 'forurenset' i nokså stort omfang. Kategorien VU er en sterk oppgradering fra trygg i forrige rødliste (2010).

Øya Jomfruland i Kragerø kommune har ikke vært inkludert i tidligere genetiske studier av villeple i Norge. Det har imidlertid vært indikasjoner på at det finnes et stort bestand på øya. En befarings på øyas nordlige del, som i dag er nasjonalpark, ble gjennomført i september 2015. Befaringen bekrefter at det er et stort villeplebestand på øya, sannsynligvis av nasjonal betydning (pers. medd Åsen, 2015). Både med hensyn til naturverdi og med tanke på genressurser ble det derfor vurdert som viktig å gjøre en morfologisk og genetisk kartlegging av villeple på øya for å vurdere skjøtsel og

bevaringstiltak. Vi ønsket også å kartlegge hybridisering i foryngelse, dette er tidligere ikke gjort i Norge.

Jomfruland nasjonalpark ligger på den ytre delen av kysten i Kragerø. En stor del av arealet er sjø og sjøbunn. Deler av Jomfruland og Stråholmen, Stangnes på fastlandet og 160 holmer utgjør landarealet. Nasjonalparken skal sikre kystnaturen, landskapet og kulturarven og ble opprettet i 2016.

3. Gjennomføring (tiltak, organisering og samarbeid)

Prosjektet er gjennomført av medarbeidere ved NIBIO; Kjersti Bakkebø Fjellstad, Mari Mette Tollefsrud og Jørn Henrik Sønstebø, i samarbeid med Naturmuseum og botanisk hage/Universitetet i Agder ved Per Arvid Aasen. Prosjektet er finansiert av genressurstiltaksmidler fra Landbruksdirektoratet og nasjonalparkstyret i Jomfruland nasjonalpark.

Arbeidet har bestått av en feltdel med identifisering av epletrærne gjennom morfologiske undersøkelser, og en laboratedel med molekylærgenetisk identifisering. Siden hybridene kan ha morfologiske karaktertrekk som kan ligge helt opp til den ene av foreldrearten, og vi mangler diagnostiske molekylærgenetiske markører for de forskjellige artene, er en kombinasjon av morfologiske og genetiske data et godt verktøy.

Arbeidet i prosjektet har vært noe forsinket grunnet sykemeldinger i prosjektgruppa. Frist for gjennomføring av prosjektet ble pr mars i år utsatt til høsten 2019.

Feltarbeid

Feltarbeid ble gjennomført i to perioder; 25.-27. september 2017 og 3.-5. september 2018.

Feltdelen bestod av en generell kartlegging av villeplene på Jomfruland, i nasjonalparken nord på øya. Kartleggingen er basert på tidligere befarings på øya i 2015. Vi hadde mål om å samle så mye materiale som mulig fra ulike deler av området. Vi har registrert og samlet inn både voksne individer og foryngelse.

I felt registrerte vi morfologiske karakterer som bladhaar og greintorner. Vi gjorde også en foreløpig bestemmelse av taxon (villeple, hybrid eller hageeple). Vi målte høyde og diameter, tok gps-posisjoner, herbariebelegg og DNA-prøver. Trær med stammediameter under 6 cm ved brysthøyde (1,3 m), ble klassifisert som unge trær/foryngelse. Herbariebeleggene er registrert i Agder Naturmuseum og Botaniske Hage.

Alle større trær ble merket med en tag på stammen, og gps-koordinater ble registrert, slik at vi kan finne igjen trærne. Det var ikke praktisk mulig å merke foryngelsen, men vi har, i tillegg til bladprøver til DNA, målt høyde og diameter for så mange som mulig av disse. For foryngelsen har vi dessuten valgt å ta et felles gps midtpunkt for flere individer når disse stod tett.

De fleste herbariebeleggene har blitt sendt til Per Arvid Åsen (Naturmuseum og botanisk hage, Universitetet i Agder) som har gjort en uavhengig bestemmelse av taxon.

Til sammen basert på innsamlingen i 2017 og 2018 er det samlet inn 287 prøver fra villeple, hybrider og noen få hageepler fra Jomfruland. 179 trær har blitt merket i felt.

DNA-analyser

Vi gjorde DNA-analyser på til sammen 287 individer. Vi bestemte det genetiske fingerprintet til epleprøvene ved hjelp av mikrosatelitter. Vi brukte de samme 11 mikrosatelittmarkørene som i Tollefsrud et al. 2014. I tillegg testet vi ut flere andre markører og kjørte tilslutt 16 mikrosatelittmarkører for prøvene samlet inn fra Jomfruland.

4. Resultater

Morfologiske undersøkelser

Vi bestemte taxon basert på morfologiske undersøkelser (både feltundersøkelser fra 2017, samt feltundersøkelser og herbariebelegg i 2018) på til sammen 287 prøver. Vi identifiserte: tre hageeple, 31 hybrider, 133 villeple og 120 prøver der vi var usikre på taxon. Mange av disse ble samlet fra foryngelse og unge individer er vanskelig å bestemme fordi karakterene som skiller villeple fra hageeple ikke er så utpreget hos unge individer. Basert på de morfologiske undersøkelsene fant vi få sikre hybridepletrær på Jomfruland.

Basert på høyde og diameter klassifiserte vi individene vi hadde samlet i voksne trær og unge trær/foryngelse. 165 trær ble klassifisert i voksne trær, mens 122 trær ble klassifisert som unge trær/foryngelse.

DNA-undersøkelser

Identifisering av hybrider og genetisk struktur

For å undersøke strukturen i dataene og for å identifisere ev. hybrider brukte vi en modellbasert metode som heter STRUCTURE¹. I STRUCTURE blir individene plassert i X antall grupper som er i Hardy-Weinberg likevekt og som har distinkte allelfrekvenser. Den genetiske sammensetningen til et enkelt individ kan tilhøre flere forskjellige genetiske grupper, f.eks. i tilfellene hvor vi har hybridisering. Man tester så tilslutt hvor mange grupper som kan forklare dataene best.

Vi kjørte først en STRUCTURE analyse på materialene fra Jomfruland sammen med det gamle datasettet vårt fra resten av landet. Siden det gamle datasettet var kjørt med 11 markører, brukte vi også kun 11 markører for prøvene fra Jomfruland i denne analyser. Vi brukte prøver som var bestemt til å være hageeple som referanse for den genetiske gruppen hageeple/hybrideple.

To grupper forklarte dataene best, en gruppe med hage-/hybridepler og en gruppe med villeple. Grensene mellom hageeple/hybrid epler og villeple ble satt basert på «ancestry coefficients» i Structure for gruppen som inneholder prøver fra det vi vet er hageepler. For hage-/hybridepler er grensen satt på mer enn 80 % av den genetiske sammensetningen skal falle innenfor

¹ <https://web.stanford.edu/group/pritchardlab/structure.html>

hageeplegruppen. For å bli identifisert som villeple må mindre enn 40 % av den genetiske sammensetningen falle innenfor hage-/hybrideplegruppen. Hybridene ligger i midten.

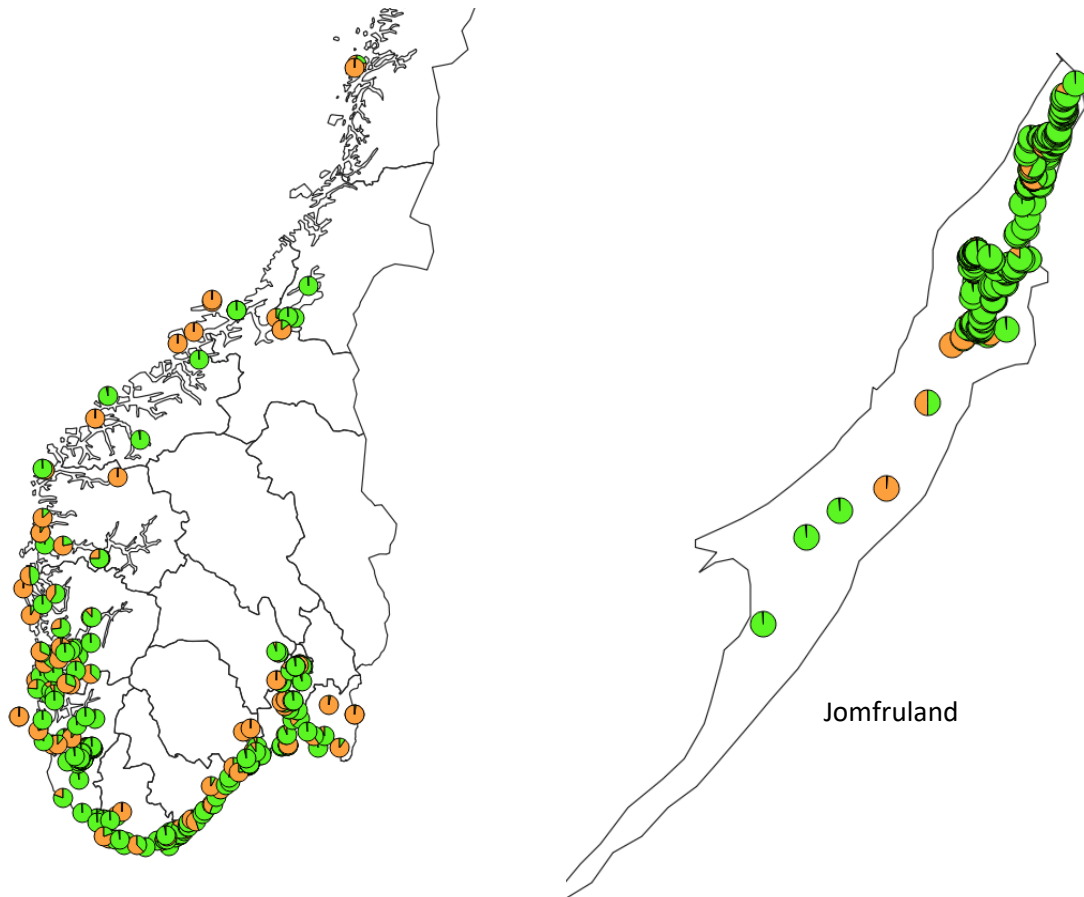
Samtidig forklarte også tre STRUCTURE grupper dataene veldig bra. Det betyr at det er genetiske forskjeller også innad i villeple, se også rapporten fra Tollefsrud et al. 2014.

Basert på analysen av de 11 markørene er det liten grad av hybridisering på Jomfruland. Vi finner faktisk færre hybrider basert på DNA-analyser enn morfologi. Samtidig er alle prøvene vi identifiserte som hybrider basert på DNA, også bestemt til hybrider basert på morfologi.

Fra 287 prøver, ble 23 trær, inklusive tre trær som vi visste var hageepler, identifisert som hage-/hybridepler. Foryngelse og småtrær var ikke mer påvirket av hybridisering enn store trær.

Tabell 1: Antall hage/hybridepler og villepler på Jomfruland identifisert basert på 11 mikrosatellitter. For å bli identifisert som villeple, må mindre enn 40 % av den genetiske sammensetningen falle innenfor hage-/hybrideplegruppen.

	Hage- hybridepler >40 %	Villeple <40 %
Basert på 11 mikrosatellitter		
Voksne (165)	13	152
Unge/foryngelse (122)	10	112

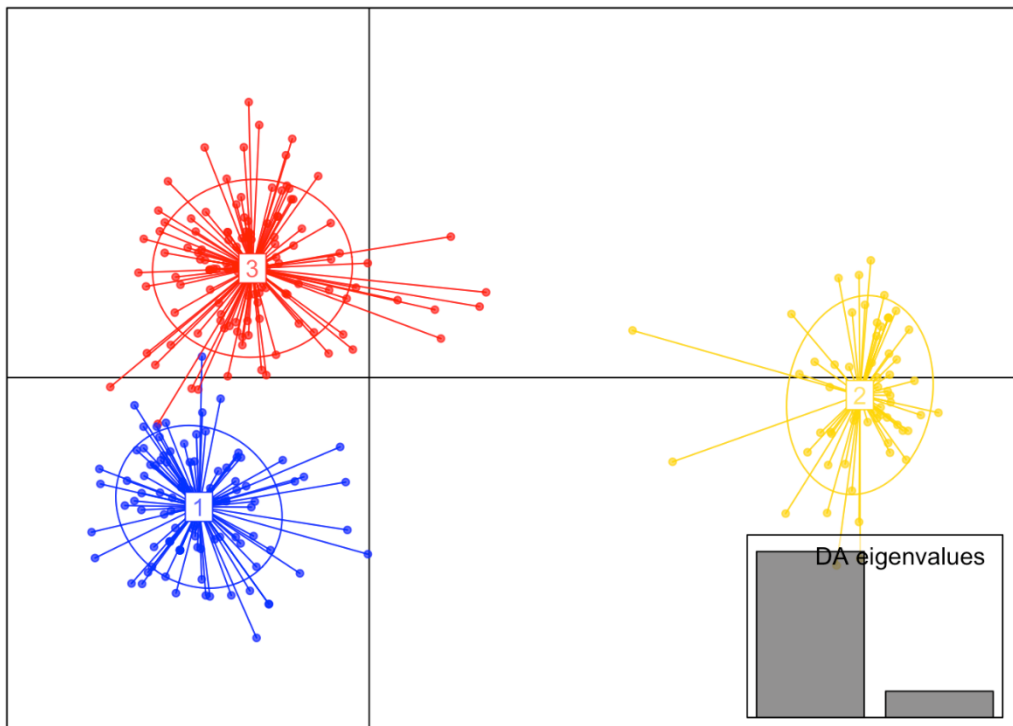


Figur 1 Kart som viser forekomster av epleprøver vi har undersøkt med genetiske markører i Norge og på Jomfruland. Den oransje fargen illustrerer den genetiske gruppen hage-/hybrideple og den grønne fargen illustrerer den genetiske gruppen villeple. Et individ kan ha tilhørighet i begge gruppene, hvis det er mindre enn 40 % av den genetiske gruppen hage-/hybridepler i et individ, blir det klassifisert som et villeple, mellom 40-80 % blir det klassifisert som hybrid, mer enn 80 % blir det klassifisert som reint hageeple.

Datsettet fra Jomfruland som vi kjørte med 16 markører inneholder kun tre individer av hageeple. Når vi analyserte dette datsettet for seg selv i STRUCTURE, er det vanskelig å identifisere hybrider. Trolig på grunn av at det er for få referanseprøver av hageepler i datsettet. Vi finner at tre genetiske grupper forklarer dataene godt, men det er ingen gruppe som klart skiller ut hage-/hybridepler slik vi finner i datsettet med 11 markører der vi har med tidligere prøver og et større referansemateriale for hageeple.

Vi undersøkte også den genetiske strukturen i datsettet ved hjelp av en annen analyse som ikke grupperer basert på Hardy Weinberg. Dette er en såkalt diskriminant analyse av prinsippal komponent analyse (DAPC) som implementert i Adegenet 2.0.0². Denne analysen identifiserer de genetiske gruppene i dataene som er maksimalt forskjellige og innad egenartet. Basert på 16 markører, identifiserte DAPC analysen tre genetiske grupper (Fig. 2). Gruppe 3 som inneholder de tre hageepleindividene og noen hybrider, er nært beslektet med gruppe 1. Denne analysen klarte heller ikke skille ut hage-/hybrideplene som tidligere forklart, fordi vi hadde et for lite referansemateriale av hageeple i dette datsettet. Det er imidlertid viktig å merke seg at det er tre forskjellige genetiske grupper av villeple på Jomfruland, noe vi også fant i STRUCTURE analysen.

² <https://zenodo.org/record/46188#.XajYhOgzYgw>



Figur 2. DAPC-analyse av Jomfruland datasettet, basert på 16 markører. I likhet med STRUCTURE-analysen, identifiserte også DAPC-analysen tre genetiske grupper. Gruppe 3, som inneholder de tre hagepleindividene og noen hybrider, er nært beslektet med gruppe 1.

Genetisk variasjon

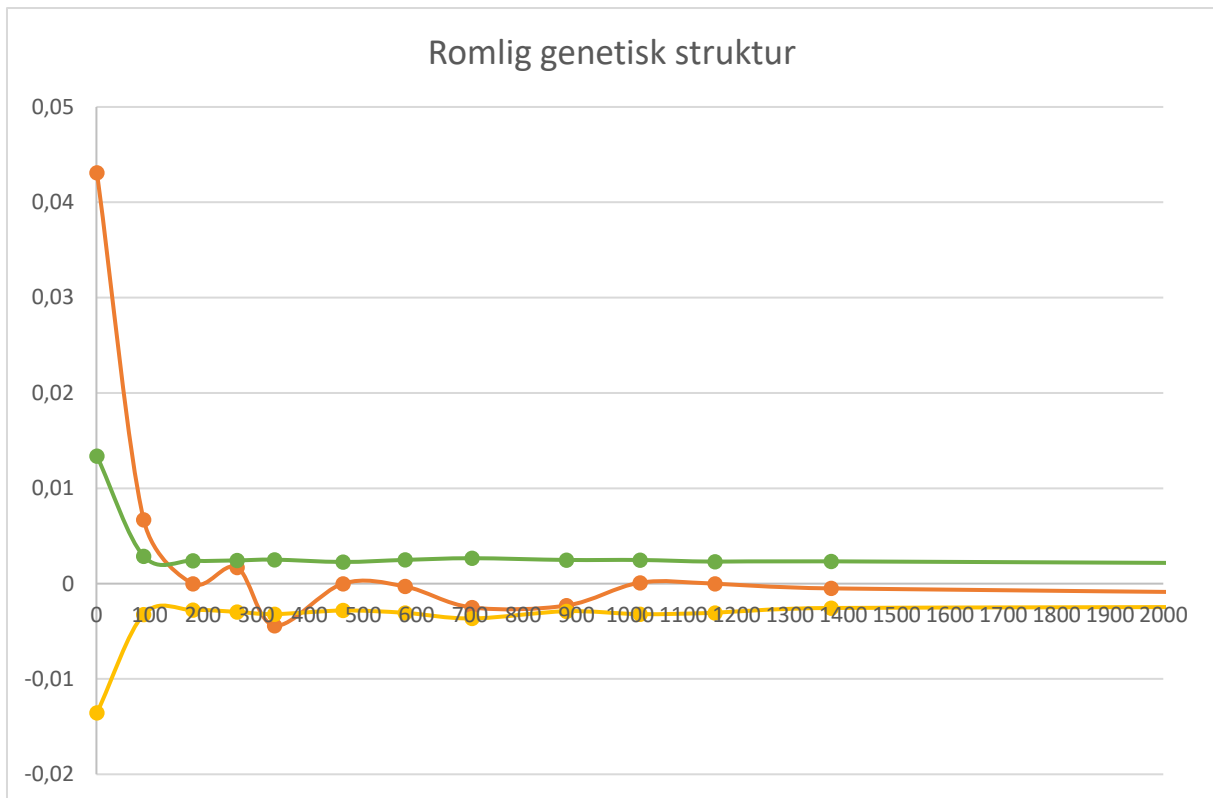
Det er en høy genetisk variasjon i villeple på Jomfruland, forventet heterozygositet (H_e) er på 0,6847.

Romlig genetisk struktur

Hvis pollen- eller frøspredning er begrenset, er det større sannsynlighet for at avkom etablerer seg nær sine foreldre og at nære slektninger krysser seg med hverandre. Estimering av en slik romlig genetisk struktur er en indirekte måte å kvantifisere spredningsdistanser på og undersøke lokale evolusjonære prosesser.

I villeple undersøkte vi romlig genetisk struktur basert på lineær regresjon av parvise kinship koeffisienter mellom individer og deres interindividuelle distanser ved å bruke programmet SPAGEDI³.

³ <http://ebe.ulb.ac.be/ebe/SPAGeDi.html>



Figur 3. Romlig genetisk struktur i villeple på Jomfruland, basert på 16 markører. Parvise kinship-koeffisienter mellom individer langs x-aksen (oransje kurve) og deres interindividuelle distanse langs y-aksen. Øvre og nedre 95 % konfidensintervall er vist med henholdsvis grønt og gult.

Vi fant en signifikant romlig genetisk struktur innen en distanse på ca 100 meter. Effektiv populasjonsstørrelse vil bli estimert ved publisering av dataene.

5. Diskusjon og konklusjon

Vi fant en høy andel av det vi kan kalle genetisk rene villepletrær på Jomfruland. Alle individene som vi identifiserte som hybrider basert på DNA-analyser var også hybrider basert på morfologi. Til forskjell fra den andre kartleggingen av villeple andre steder i Norge (Tollefsrud et al. 2014), der vi fant flere hybrider basert på DNA enn morfologi, fant vi på Jomfruland færre hybrider basert på DNA enn morfologi.

Trolig er den store populasjonen av villeple på Jomfruland med på å opprettholde den genetiske integriteten til bestandet ved at pollineringen skjer innad i villeplebestandet. Vi så heller ikke mye hageple på Jomfruland. Trolig er avstanden til andre øyer eller fastlandet også for stor til at det kommer pollen fra hagepler andre steder fra. Både størrelsen på bestandet og at det ligger på ei øy er sannsynligvis viktige faktorer for å opprettholde genetisk rene villepler. Sannsynligvis er enkelttre på fastlandet mer utsatt for pollinering fra hageple, særlig i områder der det er mye hageple.

Analysen basert på DAPC der hageple og hybrider er i gruppe 3, nært opp til gruppe 1, viser at det er vanskelig å skille ut hage-/hybrideplegruppen. Dette er trolig på grunn av lavt antall individer av

hageple i datasettet vårt (kun 3 individer). Før vi publiserer dataene ønsker vi derfor å kjøre noen flere prøver med hageepler for de 5 nye markørene for å få et større sammenligningsgrunnlag.

Både STRUCTURE og DAPC analysen antyder at det kan være tre genetiske grupper på Jomfruland. Dette kan komme av forskjellige spredningshendelser av villeple til Jomfruland. Om det skyldes at folk har tatt med seg villeple, eller om det er forskjellige innvandringsveier, vet vi ikke.

Vi fant en romlig genetisk struktur opp til ca 100 meter. Det vil si at individer som befinner seg nærmere hverandre enn 100 meter er mer i slekt med hverandre enn individer lengre unna. Det er derfor rimelig å anta at mye genflyt (pollinering og frøspredning) skjer innen en radius på 100 meter. Fra et forvaltningsperspektiv understreker dette betydningen av at man bør unngå fragmentering av populasjonen, for å opprettholde genflyt gjennom hele området hvor det vokser villeple. Videre, hvis man skal gjøre en innsamling av frø fra Jomfruland bør man, for å fange totalvariasjonen og for å redusere slektskapet i frøprøvene, gjøre innsamlinger med ca 100 meters mellomrom.

Konklusjon: Undersøkelsen bekrefter at det er et stort villeplebestand på Jomfruland, sannsynligvis av nasjonal betydning. Basert på vår analyse, er dette svært velegnet som bevaringsbestand for genetiske ressurser. Framtidig skjøtsel og forvaltning bør fokusere på å opprettholde kontinuiteten i populasjonen, sikre habitatene ved å sørge for at områdene ikke gror igjen, samt fjerne de få hage-/hybridepletrærne vi identifiserte.

6. Formidling av resultater

Nettartikkel på nibio.no: [Kartlegging av villepler på Jomfruland](#), 1.11.2017

Resultatene fra prosjektet vil bli publisert i en NIBIO-rapport. Denne vil danne grunnlaget for konkrete forvaltningsråd ovenfor forvaltningsmyndighetene i Jomfruland nasjonalpark.

Basert på tidlige indikasjoner i prosjektet, ga Norsk genressurssenter høringsinnspill til forvaltningsplanen for nasjonalparken allerede i september 2018.

7. Regnskap

	Budsjett 2017	Budsjett 2018/2019	Budsjett alle år	Regnskap, alle år
Lønnsutgifter, NIBIO (inkludert tilskudd fra FM Telemark)	70 000	180 000	250 000	262 126
Egeninnsats, Norsk genressurscenter (prosjektnr 792030-06)	40 000	60 000	100 000	169 449
Lønnsutgifter, Agder	10 000	10 000	20 000	20 000
Reiser og driftskostnader, inkl. DNA-analyser	40 000	55 000	95 000	72 962
Totalbudsjett:	170 000	305 000	475 000	524 537

8. Referanser

- Coart, E., Vekemans, X., Smulders, M.J.M., Wagner, I., Van Huylbroeck, J., Van Bockstaele, E. & Roldan-Ruiz, I. (2003) Genetic variation in the endangered wild apple (*Malus sylvestris* (L.) Mill.) in Belgium as revealed by amplified fragment length polymorphism and microsatellite markers. *Molecular Ecology*, **12**, 845-857.
- Cornille, A., Gladieux, P., Smulders, M.J.M., Roldan-Ruiz, I., Laurens, F., Le Cam, B., Nersesyan, A., Clavel, J., Olonova, M., Feugey, L., Gabrielyan, I., Zhang, X.G., Tenaillon, M.I. & Giraud, T. (2012) New Insight into the History of Domesticated Apple: Secondary Contribution of the European Wild Apple to the Genome of Cultivated Varieties. *Plos Genetics*, **8**
- Larsen, A.S., Asmussen, C.B., Coart, E., Olrik, D.C. & Kjaer, E.D. (2006) Hybridization and genetic variation in Danish populations of European crab apple (*Malus sylvestris*). *Tree Genetics & Genomes*, **2**, 86-97.
- Tollefsrud, M. M., Sønstebo, J. H., Aasen, P. A. 2014. Registrering og karakterisering av villeple i Norge. *Rapport fra Skog og landskap*, **18**, 2014.