

Projekttitel: **DNA-kartläggning av svenska mandatsorter av äpple**

Sammanfattning

Under år 2008 fortsatte vi påbörjat år 2007 arbete med DNA-kartläggning av äpplesortsamlingar i flera klonarkiv. Analyserna utfördes på Balsgård och på Malmö akademiska sjukhuset. Alla upptäckta alleler är avlästa och dokumenterade (se Bilaga, Tabell 1).

Äpple är ett vegetativt förökat växtslag och därför alla träd av samma sort ska ha identiska DNA-bandmönster. I de fall, där det fanns samma sort i flera olika klonarkiv, har vi tagit prov på alla ställen. Vi har även fortsatt att jämföra DNA-profiler av mandatsorter från Balsgårds samling (framtagna tidigare) med DNA-profiler av samma sorter från klonarkiven. Även om för många sorter stämde DNA-profiler väl överens i olika klonarkiv och på Balsgård, har vi genom dessa jämförelser hittat flera fall där träd med olika namn hade identiska DNA-profiler eller där träd med samma namn hade olika DNA-bandmönster. Alla dessa fall är beskrivna nedan och måste belysas och diskuteras under klonarkivsvårdsträffar.

Våra resultat pekar på att det behövs en djupare diskussion mellan forskare, POM, klonarkivsvårdare och pomologer för att korrekt fastställa sorternas identitet.

Motivering och mål

Forskare och genbankscuratorer, som är involverade i utvärdering och bevarande av genetiska resurser, har ofta påpekat vikten av noggrann och stabil identifiering av genotyper i en genbankskollektion, särskilt för sådana växtslag som äpple (Guilford, 1997; Hokansson et al., 1998; Goulao & Oliviera, 2001; Guarino & al., 2006). Eftersom äpple är ett vegetativt förökat växtslag, förväntar vi oss att alla individer av en och samma sort är genetiskt identiska, så när som på smärre mutationer vilka kan ge upphov till exempelvis olika fruktskalsfärger. Felbestämningar kan orsaka stora problem inom forskning och växtförädling. Felbestämda sorter och ej upptäckta dubletter belastar dessutom genbankerna med onödiga kostnader; äppleträd är stora, tar mycket plats och kostnaderna för underhåll är höga. Tyvärr råder det fortfarande oklarhet om många sorters ursprung, och dessutom innehåller många genbanker gamla träd, som förökats från okänt utgångsmaterial. Följdaktligen finns det en hel del tveksamma bestämningar av sortmaterialet i de olika äpplesamlingarna i Sverige.

I Sverige finns det ca 220 äpplesorter, som är definierade som mandatsorter och är avsedda för bevarande i olika klonarkiv runt om i landet. Vårt övergripande mål med projektet var att analysera alla dessa sorter med DNA-markörer för att förse dem med säkra DNA-profiler, fastställa deras identitet och sortäktighet, hitta synonymer och sålla ut dubletter och mutanter samt beräkna grad av genetisk diversitet och genetiskt släktskap.

Under **2007** har vi analyserat ca 100 träd av mandatsorterna som växer på Fredriksdal (FR), Munkagårdsgymnasiet (MU), Brunstorps gård (BR), sortsamlingen på Elitplantstationen (EPS) och på Julita (JU). DNA-profiler av dessa träd jämfördes även med framtagna tidigare DNA-profiler av träden från Balsgårds sortsamling. Under **2008** fortsatte vi att analysera träd från Julita samt har utfört analyser på mandatsorter från Bergianska trädgården (BE), Capellagården (CA), Ekebyhov (EBH), Genbanken Alntorps ö (ALT), von Echstedska gården (ECH). Under projektets lopp ämnade jag även att hjälpa klonarkivsvårdarna och pomologerna att belysa de problem med identifieringar, vilka man inte kan klara av med enbart morfologiska egenskaper. När projektet genomfördes under år 2007 upptäckte vi flera fall när träden i olika klonarkiv var märkta med samma namn, men hade olika DNA-

bandmönster och i några fall kunde vi peka ut det korrekta sortnamnet. I vissa av dessa fall hade klonarkivsvärdarna misstankar om felmärkningar, men många av våra upptäckter var helt oanade. Därför beslutade vi att det var värdefullt att samla in och analysera material från samma sorter från flera olika källor och även fortsätta att jämföra dessa med tidigare analyserade träden från Balsgård.

Metodik och arbetsätt

Klonarkivsvärdarna klippte kvistar (5-10 st per sort) med blad under maj - början på juni 2008 och skickade de till Balsgård, där bladen frystes in i - 80 C. På Balsgård utfördes DNA-extraktionerna och PCR-reaktioner. PCR-fragment analyserades och storlekbestämde under en kapillär-elektrofores på Swegene i Malmö. I projektet använde vi oss av 8 primer-par, som ingår i 'Standard set' rekommenderat av den europeiska arbetsgruppen för genetiska resurser hos äpple (Guarino et al., 2006). Vi använde oss även av ytterligare 3 primer-par, som tidigare visade sig vara användbara på vårt laboratorium. Dessa 11 primer-par amplifierade totalt 12 lokus.

Äpple är ett vegetativt förökat växtslag och alla träd av samma sort måste vara genetiskt identiska, vilket betyder att de ska ha identiska DNA-bandmönster. Man kan misstänka en mutation om DNA-profiler skiljer sig i t.ex. en allel. Om DNA-profiler av samma sort inte stämmer överens, tyder detta på en felmärkning.

Erhållet resultat

DNA-profiler av alla analyserade sorter är presenterade i Tabell 1 (se bilaga), som i sig är en utökad Tabell 1 från 2007. Årets resultat och även årets jämförelser med Balsgårds träd är markerade med '08' i kolumn 1. Elva SSR primer-par amplifierade alleler i 12 lokus. Varje analyserad mandatsort fick ett s.k. molekylärt passport, som kan vara ytterligare ett steg mot uppbyggnad av en databas, vilken i framtiden kan användas som 'facit' vid problematiska sortbestämningar. När alla återstående mandatsorter kommer att bli analyserade under 2009, ska DNA-profiler användas i vidare undersökningar för att få fram ett dendrogram, vilket illustrerar genetiskt släktskap mellan sorterna.

Vid jämförelser av DNA-bandmönster från träd av samma sort, som växer i olika klonarkiv och på Balsgård, har vi fått nedan beskrivna resultat.

Träden av sorterna Aspa, Josefiner, Hedenlunda, Norrstack, Stäringe Karin, Sparreholm på Julita hade, som väntat, identiska DNA-profiler med träden med motsvarande sortnamn på Balsgård. DNA-bandmönster av Stäringe Karin stämde överens även med bandmönster av Stäringe Karin på Alntorps ö. DNA-profiler av Fagerö från Julita, Alntorps ö och Balsgård var identiska sig emellan och det finns skillnad i en allel med Grågylling (det analyserade trädet växer på Balsgård). Sort Fagerö är, som bekant, en färgmutant av Grågylling.

Identiska DNA-profiler i olika sortsamlingar hade träden av sorterna: Arreskov (Brunstorps gård och Bergianska trädgården); Gyllenkroks Astrakan (Bergianska, Elitplantstationen, Balsgård); Stor Klar Astrakan (Ekebyhov, Julita, Balsgård); Vit Astrakan (Bergianska trädgården, Fredriksdal, Julita, men inte Finland); Röd Astrakan (Bergianska trädgården, Balsgård); Bergianaäpple (Bergianska trädgården, Ekebyhov); Birgit Bonnier (Ekebyhov, Balsgård, Elitplantstationen); Brita Horn (Alntorps ö, Ekebyhov); Charlamovsky (Bergianska trädgården, Balsgård); Eldrött duväpple (Bergianska trädgården, Elitplantstationen); Filippa (Capellagården, Balsgård, Elitplantstationen); Frösåker (Alntorps ö, Balsgård); Fullerö

(Alntorps ö, Balsgård); Gravensteiner och Röd Gravensteiner (Capellagården, Balsgård, Elitplantstationen); Hampus (Bergianska trädgården, Brunstorps gård); Holmserud (Alntorps ö, von Echstedeska gården); Katja (Capellagården, Elitplantstationen, Balsgård); Kavlás (Bergianska trädgården, Balsgård); Kim (Capellagården, Balsgård); Melon och Röd Melon (Bergianska trädgården, Alntorps ö, Brunstorps gård, Balsgård); Maglemer (Capellagården, Balsgård); Rossvik (Julita, Ekebyhov); Signe Tillisch (Capellagården, Elitplantstationen, Balsgård); Sköldinge (Julita, Alntorps ö); Snövit (Bergianska trädgården, Balsgård); Stenbock (von Echstedeska gården, Brunstorps gård, Fredriksdal); Sylvia Capellagården, Balsgård); Sävstaholm och P.J. Bergius (Ekebyhov, Bergianska trädgården, Elitplantstationen, Balsgård); Särsö (Ekebyhov, Balsgård); Tegnersäpple (Bergianska trädgården, Fredriksdal); Transparente blanche (Alntorps ö, Elitplantstationen, Balsgård); Trogsta (Alntorps ö, Balsgård); Värmlands sötäpple (von Echstedeska gården, Balsgård); Åkerö (Alntorps ö, Julita, Elitplantstationen, Balsgård); Ökna lökäpple (Bergianska trädgården, Balsgård); Ölands kungsäpple (Capellagården, Fredriksdal). Vi förväntar oss att alla dessa träd är korrekt bestämda och DNA-profiler för dessa sorter kan redan nu registreras i en databas, som kommer att användas vid problematiska sortbestämningar i framtiden.

Vi har upptäckt några fall, där **träden med samma sortnamn** hade **olika** DNA-profiler i olika samlingar: på Julita och Balsgård – Drakenberg, Gul höstkalvill, Menigasker, Mälsåker; på Julita och Alntorps ö: Klockhammaräpple, Sickelsjö vinäpple; på Alntorps ö och Ekebyhov: Viksäpple. DNA-bandmönster av Grönsö från Julita stämde överens med bandmönstret av Grönsö från Alntorps ö, men inte med bandmönstret av trädet, märkt som Grönsö på Ekebyhov. DNA-analyser avslöjade även att träden av Värmlands paradisäpple är identiska på Alntorps ö och Ekebyhov, men är olika det, som växer i klonarkiv på Munkagårdsgymnasiet. Träden av Silva är korrekta på von Echstedeska och Elitplantstationen, men trädet på Balsgård är, troligtvis, felmärkt.

Antonovka på Ekebyhov var identisk med Antonovka Kamenichka på Balsgård och med Antonovka, som vi har fått från Ukraina, men inte med Antonovka på Bergianska trädgården och Julita, vilka stämde överens sig emellan och med Antonovka Pamtorutka på Balsgård.

Trädet av Leckö Astrakan på Munkagårdsgymnasiet ansågs vara felmärkt och skulle vara Iglabo stött i stället. I undersökningen år 2007 har vi hittat skillnaden i en allel, som skulle följas upp i projektets nästa steg för att vi skulle kunna dra en korrekt slutsats. Skillnaden visade sig vara ett experimentfel och därmed anses träden märkta som Leckö Astrakan och Iglabo stött på Munkagårdsgymnasiet vara identiska. Vidare, var DNA-bandmönster av Leckö Astrakan från Munkagårdsgymnasiet identiskt med bandmönstret av Leckö Astrakan från Alntorps ö, men inte med Leckö Astrakan från Julita. I sin tur stämde DNA-profil av Leckö Astrakan från Julita med DNA-profil av Arnmans gula höstkalvill från Brunstorps gård. Även DNA-profiler av Iglabo stött var olika hos träden på Munkagårdsgymnasiet och Julita.

Förslaget till nästa steg är att diskutera dessa fall under nästa klonarkivsvårdsträff, där man har möjlighet att även jämföra frukt från alla berörda träd och jämföra de med pomologiska beskrivningar.

Vi har även upptäckt några fall, där **träd med olika sortnamn** hade **identiska** DNA-bandmönster, t.ex. trädet, märkt som Gimmersta på Julita är identisk med Vit Astrakan på Julita och Fredriksdal och dessutom är identisk med Arvidsäpple på Balsgård. Tistads vaxgylling på Julita är identisk med Transparente Blanche på Elitplantstationen. Hörningsholm på Julita är identisk med Norrviken från Fredriksdal och Balsgård.

Frösvidalsäpple på Julita är identisk med Frösvidals rödsöta på Alntorps ö. Kristinaäpple och Nådig frun på Brunstorp är också identiska. Identiska DNA-bandmönster hade även Gislaved på Brunstorp och Hagbyberga på Julita, Sjöholmsäpple och Stor klar Astrakan på Julita, A2 och Björnegårdsäpple på Munkagård.

Här krävs det också en djupare diskussion med klonarkivsvårdarna och pomologerna.

Vi har hittat två tydliga fall av felmärkning: trädet, märkt som Hornsberg på Fredriksdal är ett träd av Hanaskog och trädet, märkt som Eva-Lotta på Capellagården är ett träd av Alice.

Vi har fått indikation på poliploidi (tre alleler i ett lokus) hos flera av analyserade sorter: Borgherre (Balsgård), Ullströmsäpple (von Echstedeska gården), Sköldinge (Alntorps ö). Triploider är dåliga pollinatörer, och därför kan informationen om sorternas ploidalitet vara av värde för intressenterna. Alla sorter, som visade indikation på triploidi, men inte är hittills kända som triploider, måste undersökas vidare. Blad av fyra tänkbara triploida sorter, som upptäcktes under tidigare undersökningar (2007) analyserades med flödes-cytometri på ett laboratorium i Holland och triploidin blev på så vis bekräftad för Sköldinge, Rossvik, Södermanlands kalvill från Julita och Urshults kungsäpple från Fredriksdal.

Litteratur

Garkava-Gustavsson L, Nybom H (2004) DNA-analyser avslöjar våra äpplesorter. *Frukt & bär* 46 (1): 12-14.

Garkava-Gustavsson L (2006) Forskning på Balsgård - sortbestämning med hjälp av DNA-teknik. *Pomologen* 6 (1): 8-11.

Garkava-Gustavsson L, Nybom H. (2007) Genetic diversity in a collection of apple (*Malus x domestica* Borkh.) cultivars as revealed by RAPD markers. *International Journal of Horticultural Sciences*, 13: 1-11.

Garkava-Gustavsson L., Kolodinska Brantestam A., Sehic J., Nybom H. (2008) Molecular characterisation of Swedish apple cultivars using SSR and S-allele analysis. *Hereditas* 145: 99-112.

Goulao L. & Oliviera C.M. (2001) Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus X domestica* Borkh) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. *Euphytica* 122: 81-89.

Guarino C., Santoro S., De Simone L., Lain O., Cipriani G., Testolin R. (2006) Genetic diversity in a collection of ancient cultivars of apple (*Malus x domestica* Borkh.) as revealed by SSR-based fingerprinting. *J Hortic Sci Biotech* 8:39-44.

Guilford P., Prakash S., Zhu J.M., Rikkerink E., Gardiner S., Bassett H., Forster R. (1997) Microsatellites in *Malus X domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification. *Theor Appl Genet* 94: 249-254.

Hokansson S.C., Szewz-McFadden A.K., Lamboy W.F. McFerson J.R. (1998)
Microsatellite(SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a
Malus X domestica Borkh. core subset collection. *Theor Appl Genet* 97: 671-683.

Nybom H., Rumpunen K., Persson-Hovmalm H., Garkava-Gustavsson L., Olsson M.E.
Towards a healthier apple – chemical characterisation of an apple gene bank. ISHSXXVIIth
International Horticultural Congress & Exhibition, Seoul, Korea, 13-19 August, 2006. *Acta
Horticult*(in press).

Yamamoto T., Kimura T., Sawamura Y, Kotobuki K., Ban Y, Hayashi T., Matsuta N. (2001)
SSRs isolated from apple can identify polymorphism and ganetic diversity in pear.*Theor
Appl Genet* 102: 865-870.