

Identifiering av päronsorter med hjälp av DNA-markörer

Bakgrund

Förutsättningar för framgångsrik forskning och sortframställning, både i dag och i framtiden, är tillgång på ett genetiskt variabelt växtmaterial. Ett stort antal länder har därför inrättat program för att samla in, bevara och karaktärisera genetiska resurser av viktiga nyttoväxter. I Sverige ligger detta ansvar på POM, som i samarbete med Nordiska genbanken bevarar 'mandatsorter' av exempelvis frukt och bär, dvs sorter som uppkommit i Sverige eller haft en lång och viktig odlingshistoria här. Hittills har 57 olika päronsorter fått status av mandatsort. Flertalet av dessa bevaras i något av de 11 klonarkiven runt om i landet. Desutom finns det en större samling av päronsorter, nämligen på Balsgård-SLU, med totalt ca 140 namngivna sorter varav 29 mandatsorter.

Inom ECPGR (European Community for Plant Genetic Resources) har man tillsatt en kommitté speciellt för utarbetande av ett gemensamt system för DNA-markörer. Ett ökande antal pärongenbanker har också redan börjat utnyttja DNA-markörernas fördelar; sålunda har alla 500 päronsorterna i National Fruit Collection på Brogdale Farm i England analyserats med 12 mikrosatellit DNA-markörer, liksom flertalet av päronsorterna i USDA genbanken i Corvallis, Oregon, USA.

Medel erhöles 2008 (210000:-) från POM/SJV för att påbörja DNA-baserad identifiering av mandatsorterna av päron i Sverige.

Material

Bladprover samlades in från 29 sorter på Balsgård: Rödköttigt päron (= Blodpäron?), Bonne Louise, Carola, Cecilia, Clapps favorit röd (trol. somatisk mutation av vanlig Clapps favorit), Clara Frijs, Comice, Conference, Esperens Herre, Filip, Fritjof, Furstligt grönt taffelpäron, Gansels bergamott, Gråpäron, Gränna rödpäron (= Grännapäron?, två olika träd analyserades), Göteborgs diamant, Herzogin Elsa, Holländskt fikonpäron, Hovrådspäron, Hovsta, Höstbergamott, Ingeborg, Johantorp, Kejsarinnepäron, Lybeckerbergamott, Moltke, Pierre Corneille, Tysk nationalbergamott (två olika träd analyserades) och Windsor (två olika träd analyserades).

Från klonarkiven har vi fått kvistar under tidig vår. Dessa kvistar har vi sedan drivit fram i växthus tills de producerat tillräckligt med blad för DNA-extraktioner; Aspa hushållspäron och Kanelpäron från Alntorps Ö, Bergamott från Skälby kungsgård, Blodpäron, Clapps favorit, Grännapäron och Leabo långpäron från Brunstorp, Gernandtpäron, Påskpäron och Skånskt sockerpäron från Fredriksdal, Fulleröpäron, Lundströms bonchretien och Wennströms päron från Linnés Hammarby, Augustipäron från Bergianska, Klockhammar, Södermanlandspäron, Teda, Trogsta, Vingåkers kanel och Äleby från Julita och Lindhultspäron från Munkagårdsgymnasiet, dvs 21 sorter varav tre troligen är identiska med sorter som togs med även från Balsgård. Sammanlagt bör vi således ha fått tag i material från 48 olika sorter. Vi har försökt få tag på bladprover även från de resterande 10 sorterna men hittills har inget av de tillfrågade klonarkiven kunnat bidra med material.

Vi har även rekviderat bladprover från 8 speciella referensträd, som finns i samlingarna på Brogdale i England. Dessa referenser har valts ut av ECPGR under ledning av Kate Evans (East Malling, England) så att man ska erhålla internationellt jämförbara resultat och därmed kunna framställa en gemensam internationell databas för päronsorter från olika länder.

Metoder

DNA isolering

Bladproverna förvarades i -80°C tills användning. DNA isolerades från alla bladproverna (51 prover från mandatsorter och 8 prover från referenssorter). För extraktion av DNA användes DNeasy[®] Plant Mini Kit (Qiagen) och tillverkarens eget laborationsprotokoll.

DNA amplifiering

Vi köpte in specialbeställda primerpar för 12 olika mikrosatellit DNA loci, som hade valts ut inom ECPGR, och som redan använts för att bl a screena pärongenbankerna på Brogdale i England samt på Corvallis i USA. För DNA amplifieringen användes fyra olika recept (Tabell 1).

Gemensamt för alla recepten är 1X buffert, 0.2 mM dNTP och 0.25 U Taq Polymeras (Thermo Fisher Scientific, Surrey, UK). Total volym är 12.5 μl med ca 6.25 ng DNA per prov. För primerpar GD96 användes recept 4, för primerpar4 EMPc11 recept 3, för primerpar CH05c06, CH01d08 och CH04e03 recept 2, och för resterande primerpar användes recept 1.

PCR programmen kördes på en PX2 Thermal Cycler. För verifiering av att korrekt amplifiering hade skett, testades ca 10 slumpmässigt utvalda prover, för varje primer, på en agaros gel. Då erhöles ett band (eller ibland två) men dessa är inte tillräckligt skarpa och kan därför inte användas för en korrekt storleksidentifiering av de enskilda DNA-banden.

Tabell 1. Fyra olika PCR recept användes för de 12 utvalda primerparen.

Mastermix	MgCl ₂ (mM)	Primer forward (μM)	Primer reverse (μM)
1.	1.0	0.5	0.5
2.	1.0	1.0	1.0
3.	1.0	1.5	1.5
4.	1.5	1.0	1.0

DNA fingeravtryck

För att erhålla skarpa DNA-band, som kan storleksbestämmas ner på enskilda baspar, måste PCR produkterna separeras med en sekvenseringsutrustning. Vi sände våra prover till DNA-analysavdelningen på Malmö Allmänna Sjukhus, där de analyserades på en 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems). Bandens storlek fastställdes sedan baserat på en intern standard (500ROXTM Size Standard (Applied Biosystems)) med datorprogrammet GeneMarker[®] Software v 1.75 (Softgenetics). För varje primerpar har åtta referensprover, med kända bandstorlekar, analyserats tillsammans med mandatsorterna. Dessutom har 3 av proverna dubblerats som en kontroll av reproducerbarhet.

Tabell 2. Analyserade päronprover, lokal där bladproverna vuxit, samt data (bandstorlek uttryckt i antal baspar) för 6 mikrosatellit DNA loci. Bandstorlek inom parentes för referenssorterna anger värden rapporterade av ECPGR

Nr.	Namn	Lokal	CH05c06	EMPc11	EMPc117	GD147	CH01d08	CH04e03
01.	Ref 1, 1951-105 AbbeFetel	UK	88:92 (87:91)	144:151 (142:149)	115:117 (113:115)	Z	Y	Y
02.	Ref 2, 1996-106 Chantecler	UK	98:108 (97:107)	146:172 (144:171)	90:107 (88:105)	Z	Y	Y
03.	Ref 3, 1973-200 Comice	UK	88 (87)	151:155 (149:153)	115 (113)	Z	Y	Y
04.	Ref 4, 1973-199 Conference	UK	88:98 (87:97)	140:151 (138:149)	X (115:117)	Z	Y	Y
05.	Ref 5, 1985-003 Hosui	UK	83:104 (83:103)	X (140:143)	92:105 (91:103)	Z	Y	Y
06.	Ref 6, 1975-195 PasseCrassane	UK	88:108 (87:107)	151 (149)	99:115 (97:113)	Z	Y	Y
07.	Ref 7, 1996-105 Pendula	UK	X (114:117)	124 (123)	91:101 (91:99)	Z	Y	Y
08.	Ref 8, 2001-099 Williams	UK	88:92 (87:91)	151 (149)	115 (88:113)	Z	Y	Y
1.	Skånskt sockerpäron	Fred.	(81):92:96?	151:155	115:119	Z	Y	Y
2.	Påskpäron	Fred.	88:94	144:151	99:113	Z	Y	Y
3.	Tedapäron	Jul.	92:100	138:142	111:115	Z	Y	Y
4.	Trogsta augustipäron	Jul.	98:110	142:144	111:115	Z	Y	Y
5.	Äleby päron	Jul.	92:100	144:155	113:115	Z	Y	Y
6.	Leabo långpäron	Brun.	88:100	138:144	113:115	Z	Y	Y
7.	Gränna rödpäron	Bals.	88:92	138:144	99?:(136)	Z	Y	Y
8.	Blodpäron	Brun.	88:92	140:142	113:115	Z	Y	Y
9.	Clapp's favorit	Brun.	90:92	151	115:119	Z	Y	Y
10	Bergamott	Skäl.	90:92	155	117:119	Z	Y	Y
11	Furstligt taffelpäron	Bals.	88:92	138:144	87:127	Z	Y	Y
12	Fritiof	Bals.	88:92	151	117:119	Z	Y	Y
13	Lindhults päron	Mun.	94:100	144:151	111:113	Z	Y	Y
14	Augustipäron	Berg.	102:110	146:151	105:107:(136)	Z	Y	Y
15	Aspa hushållspäron	Alnt.	92:96	151	109:111	Z	Y	Y
16	Gernandtspäron	Fred.	94:100	144:151	111:113:(136: 138)	Z	Y	Y
17	Klockhammars- päron	Jul.	85:92	138:155	113:115	Z	Y	Y
18	Vingåkers kanel	Jul.	83:92	138:155	113:115	Z	Y	Y
19	Kanelpäron	Alnt.	83:88:110?	X	115:117:119?	Z	Y	Y
20	Windsor träd 1	Bals.	94:112	140:155	99:113	Z	Y	Y
21	Ingeborg	Bals.	88:98	140:151	115:117	Z	Y	Y

22	Windsor träd 2	Bals.	92:96	144:151	113:115	Z	Y	Y
23	Tysk national- bergamott träd 1	Bals.	92:94	155:157	109:119	Z	Y	Y
24	Tysk national- bergamott träd 2	Bals.	92:94	155:157	109:119	Z	Y	Y
25	Rödköttigt päron	Bals.	88:92:96?	140:142	113:115	Z	Y	Y
26	Bonne Louise	Bals.	88:104	140:151	115:119	Z	Y	Y
27	Sörmlands päron	Jul.	92:108	151:155	87:113:115	Z	Y	Y
28	Carola	Bals.	88:94	151	115:117	Z	Y	Y
29	Cecilia	Bals.	(106):108:110	144:155	109:119	Z	Y	Y
30	Röd Clapp's favorit	Bals.	90:92	151	115:119	Z	Y	Y
31	Filip	Bals.	88:92	151:155	111:113	Z	Y	Y
32	Esperens herre	Bals.	88	151	111:113:117?	Z	Y	Y
33	Doyenne de Comice	Bals.	88	151:155	113:115	Z	Y	Y
34	Conference	Bals.	88:98	140:151	X	Z	Y	Y
35	Clara Frijs	Bals.	88	151	113:115	Z	Y	Y
36	Gansels bergamott	Bals.	88:92	151:155	115:117:119	Z	Y	Y
37	Gråpäron	Bals.	88:96:108	144:146:151	111:117:119	Z	Y	Y
38	Holländskt fikonpäron	Bals.	90:92	151:155	87:117:119	Z	Y	Y
39	Herzogin Elsa	Bals.	88:92	140:151	99:119	Z	Y	Y
40	Göteborgs diamant	Bals.	88:92	151:155	97	Z	Y	Y
41	Gränna rödpäron	Bals.	88:92	138:144	99	Z	Y	Y
42	Hofstapäron	Bals.	88:92	151:155	113:119	Z	Y	Y
43	Höstbergamott	Bals.	92	155	87:117:119	Z	Y	Y
44	Hovrådspäron	Bals.	88:92	151:157	115:119	Z	Y	Y
45	Epargne (Kejsarinnepäron)	Bals.	88:104	140:146:157?	113:119	Z	Y	Y
46	Greve Moltke	Bals.	88	151:155	113:115	Z	Y	Y
47	Pierre Corneille	Bals.	88:98	140	115:117:119	Z	Y	Y
48	Johantorp	Bals.	88:94	144:151	109:117	Z	Y	Y
49	Lübecker bergamott	Bals.	92:94	155:157	109:119	Z	Y	Y
50	Lundströms Bonchrétien	Linn.	92	144:155	111:115	Z	Y	Y
51	Wennströmspäron	Linn.	100:110	142	109:111	Z	Y	Y
52	Fulleröpäron	Linn.	92:108	146:151	97:107	Z	Y	Y

X=ej avläsbart, prov körs om

Y=prov skickat för sekvensering, data ej erhållen än

Z=prov måste spådas ytterligare

Text i rött anger att utvärderingen ej är klar

Resultat och Diskussion

Såväl isolering av DNA som optimering av PCR-amplifieringarna visade sig vara mera komplicerat än vi hade förutsett. Pären är betydligt svårare att arbeta med än exempelvis äpple. Efter att ha testat några olika DNA-isoleringsmetoder, visade det sig att den dyrbaraste metoden (Qiagen) också var den bästa.

Hittills har proverna analyserats med 6 primerpar men utvärderingarna av dessa bandmönster pågår fortfarande (Tabell 2). Ännu finns det bara data för tre loci. Trots detta kan man redan göra en del intressanta iakttagelser.

Referensmaterial

Jämförelser mellan referensmaterial av Comice respektive Conference samt prov från Balsgårds träd av samma sorter, tyder på att dessa träd är identiska med de träd som växer i referenssamlingen på Brogdale i England. Uppenbarligen är dock våra DNA band 1-2 baspar större än banden som angivits av ECPGR men detta kommer att kompenseras för inför den slutgiltiga redovisningen och databasinläggningen. Dyliga skillnader i bandstorlek uppkommer mycket ofta när resultat från olika laboratorier jämförs, sannolikt beroende av skillnader både i kemikalier och i den tekniska utrustningen som använts.

I de fall där två träd av förment samma sort i de svenska samlingarna analyserades, blev bandmönsterna identiska utom för Windsor där ytterligare bladprover från träd i andra klonsamlingar måste kontrolleras.

Synonymer

Clapps favorit från Brunstorp tycks vara identisk med röd Clapps favorit från Balsgård vilket var väntat eftersom den senare troligen bara är en röd mutant av den förra. Likaså visar det sig att Blodpäron från Brunstorp troligen är identiskt med Rödköttigt päron från Balsgård. Dessa två sorter skiljer sig däremot tydligt från de två (sinsemellan identiska) träden av Grännapären från Balsgård. Även Lindhults päron från Munkagårdsskolan och Gernandtpäron från Fredriksdal har identiska bandmönster i de tre loci som hittills utvärderats. Resultatet från de fortsatta analyserna kommer säkert att visa om dessa träd är identiska eller ej.

Kromosomtalsnivå

I teorin förväntar man sig att varje primerpar ska producera två band eftersom flertalet päronsorter är diploida, med kromosomtalet $2n = 34$. I liket med äpple, torde emellertid päron vara en s.k. 'ancient polyploid' vilket innebär att arten ursprungligen uppstått genom hybridisering mellan två arter på lägre kromosomtalsnivå; t ex en art på $2n = 14$ och en på $2n = 20$, samt en åtföljande kromosomtalsfördubbling. Detta innebär att vissa primerpar amplifierar inte band för bara ett locus utan för två, och man får alltså totalt upp till fyra band per sort och primerpar.

Vissa sorter, som har tre band i flera loci, exempelvis Gråpäron, är däremot nästan säkert triploida. Dyliga sorter bör i framtiden analyseras med flödescytometri (mäter DNA-innehållet i cellkärnor) för att fastställa kromosomtalsnivån eftersom denna har stor betydelse vid framtida forskning och eventuell användning inom praktisk växtförädling. Dessutom är triploider dåliga pollenproducenter och speciell hänsyn måste tas vid samplantering.

Fortsatta analyser

Under 2009 kommer vi att fortsätta dels utvärderingarna av övriga loci i Tabell 2, och dels både laborativt arbete och utvärderingar av följande loci: CH03g07, CH01f07a, CH02b10, CH01d09, GD96 och CH03d12. När sedan dessa data också erhållits, kommer vi att lägga in basdata (exakt storleksangivelse för varje band erhållet med de 12 primerpar som analyserats, samt korrigerat så att samma skala används som för övriga ECPGR databaser) i SESTO, och dels göra en del beräkningar rörande synonymik, släktskapsgrad etc. Såväl vetenskaplig som populärvetenskaplig publicering kommer också att ske.

Vi kommer även att komplettera växtmaterialet under 2009 med ytterligare en del mandatsortsträd, som finns ute i de olika klonarkiven. Härigenom kan vi sedan säkerställa att alla mandatsorter, oberoende av i vilken sortsamling de står, är korrekt bestämda.

Balsgård 2009-02-26

Hilde Nybom och Jasna Sehic