

Skattning av brukbar diversitet hos Svenska mandatsorter av äpple

Backgrund och mål

I Sverige har ca 220 äpplesorter fått mandatstatus och är avsedda för framtida långsiktigt bevarande. Dessa sorter har under 2007-2009 har blivit kartlagda med SSR-markörer och numera har vi tillgång till väl identifierat växtmaterial. Detta är särskilt viktigt nu, när vi fortsätter med nästa steg, dvs screeningar av detta värdefulla växtmaterial för sådana viktiga egenskaper som självsterilitet, fruktkonsistens och lagringsduglighet. Kunskaper om sorternas egenskaper är en viktig förutsättning för att de ska kunna användas för framgångsrik forskning och växtförädling.

Svenska odlare efterfrågar högavkastande sorter. Avkastningen hos äpple beror i stor utsträckning på att det finns lämpliga pollinatörer på nära avstånd eftersom äpplesorterna är självsterila. Vilka sorter som kan pollinera varandra (dvs är korskompatibla) bestäms av en uppsättning alleler i ett s.k. S-lokus. Varje diploid äpplesort har två olika S-alleler. Om två samplanterade sorter har exakt samma S-alleler, är de inkompatibla och träden kommer bara att sätta några enstaka frukter. Samplanterade äpplesorter, som bara har en gemensam S-allel, har bättre fruktsättning men når ändå inte upp till sin fulla produktionsförmåga (Schneider et al., 2005).

Traditionellt har korskompatibilitet respektive inkompatibilitet undersökts genom pollineringsförsök, som är mycket tidskrävande och dessutom kan det vara svårt att skilja fullt kompatibla sorter från delvis kompatibla. Utveckling av molekylära markörer ger möjlighet till snabbare och noggrannare undersökningar av inkompatibilitet. Under de senaste 10–15 åren har flera allel-specifika DNA-markörer utvecklats och använts (Janssens et al., 1995; Matsumoto et al., 1999; van Nerum et al., 2001; Kitahara and Matsumoto, 2002; Broothaerts, 2003). På Balsgård har vi tidigare analyserat S-alleler hos 103 äpplesorter, varav 76 är mandatsorter (Nybom et al., 2007a; Nybom et al., 2007b; Nybom et al., 2008a). Information om olika sorters S-alleler har stor betydelse inte bara vid praktisk odling utan också för val av föräldrasorter när man planerar att göra korsningar i ett växtförädlingsprogram.

Även om avkastningen är en av de viktigaste parametrarna ur odlarens synpunkt, måste man också ta hänsyn till handelns och konsumenternas önskemål. Dagens konsumenter efterfrågar krispiga och lagringsdugliga äpplen, som fortfarande har bra konsistens när de kommer ut till konsumenten. Fasta och krispiga äpplen har blivit ett av de viktigaste förädlingsmålen i många länder. För att kvantifiera dessa parametrar används i regel mekaniska tester, t.ex. trycktest med penetrometer, eller avsmakningstester (Jönsson och Nybom 2007). Höga poäng för 'fast fruktkött' och 'krispig konsistens' innebär oftast att konsumenterna tycker om en äpplesort (Hampson et al., 2000; King et al., 2001).

Fruktmognaden är en komplex biokemisk och fysiologisk process där flera gener är inblandade. Molekylära markörer har öppnat nya möjligheter för att identifiera 'quantitative trait loci' (QTL), dvs kvantitativt nedärvda gener som ansvarar för komplexa egenskaper som fruktens fasthet vid skördetidpunkt och efter lagring (King et al., 2000; 2001).

De mest undersökta generna med dokumenterade effekter på fruktens konsistens och lagringsbarhet är *Md-ACSI*, *Md-ACO1*, *Md-Exp7* och *PG1* (Sunako et al., 1999; Harada et al., 2000; Zhu and Barritt, 2008; Costa et al., 2005; Costa et al., 2008; Costa et al., 2010). Gen *Md-ACSI* kodar för enzymet 1-aminocyclopropan-1-karboxylsyntas och styr ethylenhalten i frukten, vilket i sin tur påverkar fruktens lagringsduglighet. *Md-ACO1* kodar för enzymet 1-aminocyclopropan-1-carboxylat-oxydas som också styr ethylenhalten i frukten. *Md-Exp7* kodar för ett enzym ur gruppen expansiner som anses vara mycket viktiga för mognadsprocessen och lagringsduglighet av äpple. *Md-Exp7* anses vara viktigare än *Md-ACSI* vad gäller förlust av fruktfasthet. *Md-PG1* är en av gener, som kodar för enzymet

polygalakturonas. Enzymet är involverad i nedbrytning av pektin. Genen styr förlust av fruktfasthet under mognaden och dess uttryck är etylen-beroende.

Generna *Md-ACSI*, *Md-ACO1*, *Md-Exp7* har undersökts i tre stora sortsamlingar: äppelförädlingsprogrammet i Washington State University (USA), 'National Fruit Collection i Brogdale' i Kent, UK och 'USDA-ARS National Plant Germplasm System *Malus* collection' i Geneva, NY, USA (Peace, 2008). På Balsgård har vi också tidigare undersökt allelsammansättningen i etylenproduktionsgenen *Md-ACSI* hos 137 äpplesorter, av vilka 94 är mandatsorter. Vi upptäckte att den önskvärda allelen som är kopplad till låg etylenproduktion och krispigt fruktkött, endast återfinns hos ett fåtal av de äldre mandatsorterna (Nybom et al., 2008b). Vi har också tidigare undersökt allelerna i *Md-Exp7* locus (Nybom et al., under tryckning). En SSR allel på 198 bp har tidigare angivits som markör för bra fruktfasthet och bra lagringsduglighet och allel på 202 bp skulle vara kopplad till sämre fruktfasthet och lagringsduglighet. Men i våra undersökningar blev det tvärtom, allel 202 visade sig vara kopplad till högre fruktfasthet och mindre förlust av fruktfasthet under lagring.

Projekt

Medel från SJV/POM har erhållits under 2011 för att för att fastställa allelsammansättningen i S-lokus i de mandatsorter av äpple (totalt 97) som inte har tidigare analyserats med hjälp av allelspecifika DNA-markörer. På samma sätt använde vi oss av DNA-markörer för mognadsgenerna *Md-ACO1*, *Md-ACSI* för att analysera 63 mandatsorter. Pga av att i nuläge råder det en viss oklarhet kring markörerna i lokuset *Md-Exp7* och att projektmedlen blev kraftigt neddragna, beslutade vi att i stället analysera allelsammansättningen i lokuset *PGI*.

Projektansvarig har varit Larisa Gustavsson och DNA-analyserna har utförts av Jasna Sehic och Anna Zborowska.

Material och metoder

DNA analyser

Vi använde oss av materialet och DNA som användes också i flera andra projekt på Balsgård (synnergi effekt).

För att få fram DNA-band för varje S-allel, använde vi oss av 10 allelspecifika primer par, publicerade av Broothaerts (2003), Matsumoto et al. (1999), Matsumoto (2002) och som redan användes i undersökningar på Balsgård (Nybom et al., 2008a). DNA-band för varje allel amplifierades med hjälp av PCR-teknik. För att särskilja S-allelerna S₄, S₁₆ och S₂₂ krävdes det också klyvning av ett DNA-band som vi fick fram under PCR med ett s.k. klyvningsenzym, taq1. Vi använde oss av primersekvenserna, beskrivna i Broothaerts (2003), förutom primers för S₅, publicerad i Matsumoto et al. (1999). PCR-reaktionerna utfördes som i Nybom et al. (2008a). DNA-band storlekbestämdes på en agarosgel och varje sort fick sin egen S-allel profil. PCR-reaktionerna utfördes som i Nybom et al. (2008a).

För att kunna särskilja de två allelerna i *Md-ACSI*-genen använde vi samma metodik som tidigare användes på Balsgård (Nybom et al., 2008b). Som kontroll använde vi sorterna 'Wealthy Red' och 'Elstar', som har den önskade allelen 2. Förekomsten av olika alleler för genen *Md-ACO1* analyserades enligt Costa et al. (2005). Som kontroll användes sorterna 'Wealthy Red' och 'Rosen crab'. Allelerna för lokus *PGI* bestämdes enligt V. Keulemans (pers. komm.). Även för denna lokus användes 'Elstar' som kontrol.

Allelfrekvenserna för varje S-allel beräknades som procent av alla identifierade alleler.

Resultat och diskussion

Undersökning av självsterilitetsgener

I vår undersökning av de olika mandatsorterna kunde vi identifiera tolv olika S-alleler: S1, S2, S3, S4, S5, S7, S9, S10, S16, S22, S24, S28 (Tabell 1). Under förutsättningen att alla sorter är heterozygota i S-lokus, förväntar vi oss 2 olika S-alleler hos de diploida sorterna, 3 alleler hos de triploida och fyra alleler hos de tetraploida. Totalt förväntade vi oss att fastställa 205 alleler. Generellt sätt, kunde vi hitta två eller färre alleler hos diploida sorter och tre eller färre hos tri- och tetraploida, sammanlagt 121 alleler (59% av det totala antalet av alleler). För 28 diploida sorter och 1 triploid sort kunde vi fastställa komplett uppsättning av S-alleler, och för 44 diploida och 3 triploida sorter - bara en av genvarianterna per sort. Hos 6 triploida sorter kunde vi fastställa 2 alleler per sort och en tetraploid sort 'Alfa' uppvisade 3 alleler. Tyvärr, 14 sorter kunde vi inte fastställa någon S-allel alls. Detta kan bero på att de har S-alleler som är mycket ovanliga i de sorterna som användes vid framtagning av DNA-markörer och därför saknar de markörer för tillfället.

I denna undersökningen var de vanligaste S-allel varianten S₇, som är 31.4 % av alla detekterade alleler. Sammanlagt 38 sorter, 39.2% av alla analyserade, hade denna allel. Detta stämmer väl överens med vår tidigare undersökning, där S₇ allelen var också den vanligaste, även om allelfrekvensen var lägre (18.0 %) (Nybom et al., 2008a). Denna allel var den näst vanligaste (14%) också i en studie om S-genotypning av gamla äpplesorter från Karpaterna (Halász et al., 2011). Den näst vanligaste allel var S₁, (16.5% av alla detekterade alleler) hittades hos 20 sorter (21%). Denna allel var ganska vanlig även i de tidigare undersökningar: 11% (Nybom et al, 2008a) och 10% (Halász et al., 2011). De mest ovanliga varianterna var S₄ (3.3%), återfanns hos 4 sorter, S₂₄ (2.24%), återfanns hos 3 sorter och S₉ (1.6 %) återfanns hos 2 sorter. Till skillnad från denna studie, var S₂₄ rätt så vanlig i undersökningen av Halász et al. (2011). Vad gäller S₄, så hade bara en av sorterna denna allel i Halász et al. (2011). S-allelfrekvenserna och antal sorter som hade specifika S-alleler presenteras i Fig. 1 och 2.

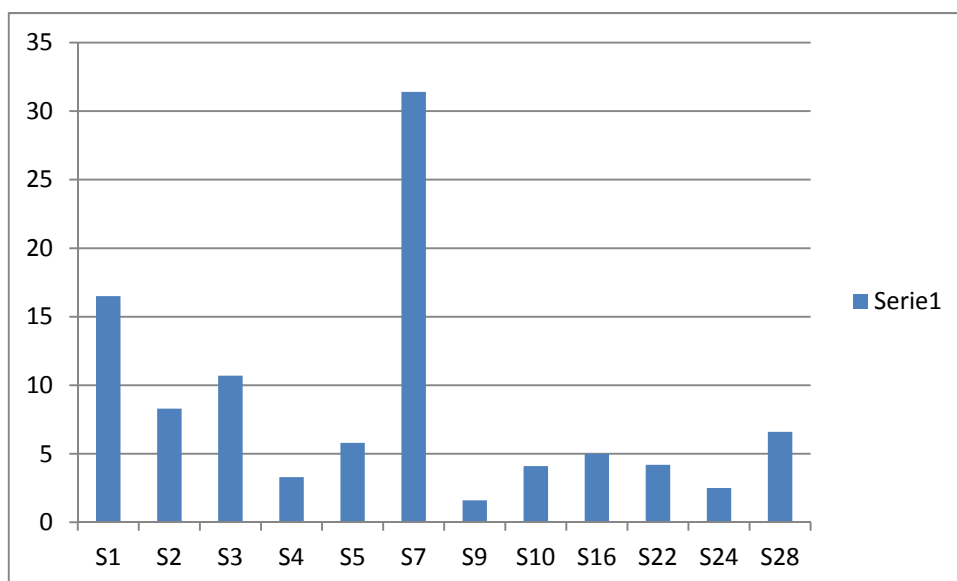


Fig. 1 Frekvenser för var och en av 12 identifierade S-alleler.

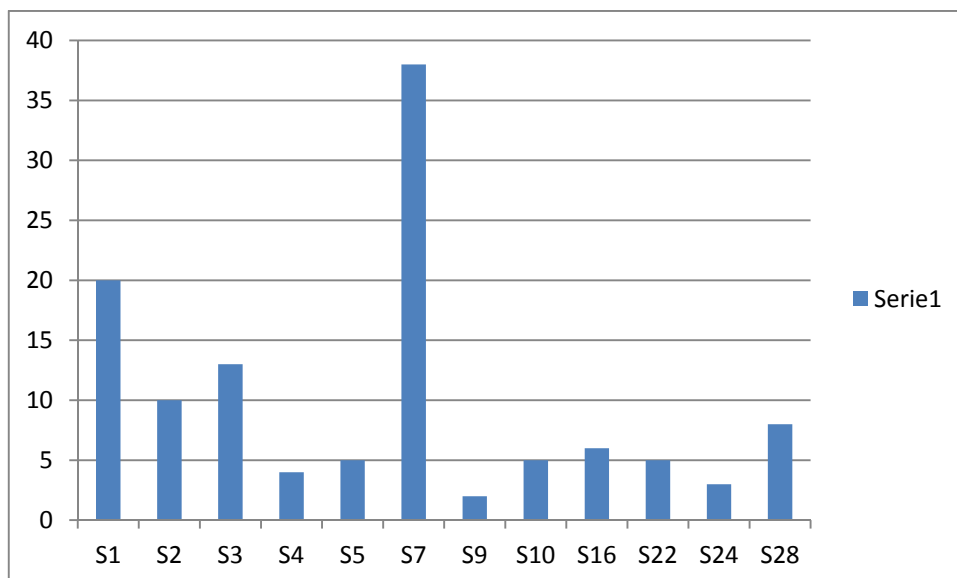


Fig. 2. Antal sorter, som hade var och en av S-allelerna.

Undersökning av mognadsgener

Det finns två olika varianter av *Md-ACS1*-genen, som styr etylenhalten i frukten. Genvariant 1 resulterar i högre etylenhalt och snabbare eftermognad, medan genvariant 2 ger lägre etylenhalt. Därmed får frukten bättre förutsättningar att bibehålla sin fasta konsistens. Olika äpplesorter kan ha någon av tre olika genuppsättningar, 1-1, 1-2 eller 2-2. En av kontrollerna, 'Wealthy Red', hade båda allelvarianterna, 1 och 2 och den andra, 'Elstar', hade bara den efterfrågade varianten, 2. Våra analyserade sorter uppvisar två av dessa genuppsättningar, nämligen 1-1 och 1-2 och saknar därmed den mest eftertraktade varianten 2-2. Den sistnämnda återfinns bland de nyare utländska sorterna som 'Discovery', 'Gloster', 'Rubinola' och 'Elise', vilka alla har fast, krispigt fruktkött (Nybom et al., 2008b). Dessvärre, bara tre av våra sorter, 'Algott'(icke-mandat), 'Granatäpple, Kungsbacka' och 'Melonkalvill'(mandat) har den fördelaktiga alleluppsättningen, 1-2.

Genen *Md-ACO1* har också två olika genvarianter, där variant 1 ger lägre etylenhalt medan variant 2 ger högre halt. Kontrollerna, 'Wealthy Red' och 'Rosen Crab' hade alleluppsättningen 1-2. Alla, utom 2 analyserade sorter ('Guldparmän' och 'Silva'), hade den oönskade genuppsättningen 2-2 (Tabell 2). Den mest eftertraktade varianten, 1-1 kunde tyvärr inte hittas hos någon av mandatsorterna, men har tidigare noterats hos nyare utländska sorter som 'Elstar' och 'Rubin' (Costa et al., 2005).

Även genen *PGI* har två olika varianter, där den oönskade varianten, 1- sämre fruktfasthet, och den önskade varianten, 2 - bra fruktfasthet. Förutom kontrollen 'Elstar', bara två av de analyserade sorterna, 'Granatäpple, Kungsbacka' och 'John-Georg' hade den eftertraktade allelen, 2, även som heterozygot.

Fruktfasthet och lagringsduglighet är viktiga äppleförädlingsmål i hela världen. Även om det går framåt vad gäller kunskapen om mognadsgener, så är den genetiska bilden av denna egenskap långt ifrån fullständig. Tyvärr, är de önskvärda allelerna är mycket sällsynta bland gamla sorter. Detta kan bero på att sådana egenskaper som fruktkonsistens inte ansågs vara lika viktigt tidigare som den har blivit på senare år. Dock sorten 'Granatäpple, Kungsbacka', som är heterozygot för önskade alleler i två lokusar, *Md-ACS1* och *PGI*, kan vara intressant som förälder om man ämnar att förbättra fruktfasthet och lagringsduglighet.

Litteratur

- Broothaerts W. (2003) New findings in apple *S*-genotype analysis resolve previous confusion and request the re-numbering of some *S*-alleles. *Theor. Appl. Genet.* 106: 703-714.
- Costa F., Stella S., Van de Weg W.E., Guerra W., Cecchin M., Dallavia J., Koller B., Sansavini S. (2005) Role of the genes *Md-ACO1* and *Md-ACSI* in ethylene production and shelf life of apple (*Malus domestica* Borkh.). *Euphytica* 141: 181-190.
- Costa F., Van de Weg E., Stella S., Dondini L., Pratesi D., Musacchi S., Sansavini S. (2008) Map position and functional allelic diversity of *Md-Exp7*, a new putative expansin gene associated with fruit softening in apple (*Malus x domestica* Borkh.) and pear (*Pyrus communis*). *Tree Genetics and Genomes* 4: 575-586.
- Costa F., Peace C., Stella S., Serra S., Musacchi S., Bazzani M., Sansavini S., Van de Weg W.E. (2010) QTL dynamics for fruit firmness and softening around an ethylene-dependent polygalacturonase gene in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *J. Exp. Bot.* 61:3029-3039.
- Halász J., Hegedús A., Gyögy Z., Pállinger É., Toth M. (2011) *S*-genotyping of old apple cultivars from the Carpathian basin: methodological, breeding and evolutionary aspects. *Tree Genet. Genom.* 7: 1135-1145.
- Hampson C., Quamme H., Hall J., MacDonald R., King M., Cliff M. (2000) Sensory evaluation as a selection tool in apple breeding. *Euphytica* 111: 79-90.
- Harada T., Sunako T., Wakasa Y., Soejima J., Satoh T., Niizeki M. (2000) An allele of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene (*Md-ACSI*) accounts for the low level of ethylene production in climacteric fruits of some apple cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 101: 742-746.
- Janssens G.A., Goderis I.J., Brokaert W.F., Broothaerts W. (1995) A molecular method for *S*-allele identification in apple based on allele-specific PCR. *Theor. Appl. Genet.* 91: 691-698.
- Jönsson Å., Nybom H. (2007) Consumer evaluation of scab-resistant apple cultivars in Sweden. *Agr. Food Sci.* 15: 388-401.
- Kader, A.A. (1999) Fruit maturity, ripening, and quality relationships. *Acta Hort.* 485, 203 – 207.
- King G.J., Maliepaard C., Lynn J.R., Alston F.H., Durel C.E., Evans K.M., Griffon B., Laurens F., Manganaris A.G., Schrevens E., Tartarini S., Verhaegh J. (2000) Quantitative genetic analysis and comparison of physical and sensory descriptors relating to fruit flesh firmness in apple (*Malus pumila* Mill.). *Theor. Appl. Genet.* 100: 1074-1084.
- King G.J., Lynn J.R., Dover C., Evans K.M., Seymour G. (2001) Resolution of quantitative trait loci for mechanical measures accounting for genetic variation in fruit texture in apple (*Malus pumila* Mill.). *Theor. Appl. Genet.* 102: 1227-1235.
- Kitahara K., Matsumoto S. (2002) Cloning of *S*₂₅ cDNA from 'McIntosh' apple and an *S*₂₅-allele identification method. *J. Hortic. Sci. Biotech.* 77: 724-728.
- Matsumoto S., Komori S., Kitahara K., Imazu S., Soejima J. (1999) *S*-genotypes of 15 apple cultivars and self-compatibility of 'Megumi'. *J. Japanese Soc. Hortic. Sci.* 68: 236-241.
- Nybom H., Sehic J., Garkava-Gustavsson L. (2007a) Vem pollinerar vem? *Pomologen* nr 4: 22-27.
- Nybom H., Sehic J., Garkava-Gustavsson L. (2007b) Självsterilitetsgener hos äpple. *Frukt & bär*, nr 23:22-23.
- Nybom H., Sehic J., Garkava-Gustavsson L. (2008a) Self-incompatibility alleles of 104 apple cultivars grown in northern Europe. *J. Hortic. Sci. Biotech.* 83: 339-344.
- Nybom H., Sehic J., Garkava-Gustavsson L. (2008b) Modern apple breeding is associated

- with a significant change in the allelic ratio of the ethylene production gene *Md-ACS1*. *J. Hortic. Sci. Biotech* 83 (5): 673-677.
- Peace C. (2008) Texture genotyping of apple germplasm in 2008. Report for 2008 Apple Crop Germplasm committee meeting, Geneva, NY.
- Schneider D., Stern R. A., Goldway M. (2005) A comparison between semi- and fully compatible apple pollinators grown under suboptimal pollination conditions. *HortScience* 40: 1280-1282.
- Sunako T., Sakuraba W., Senda M., Akada S., Ishikawa R., Niizeki M., Harada T. (1999) An allele of the ripening-specific 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene (*ACS1*) in apple fruit with a long storage life. *Plant Physiol.* 119: 1297-1303.
- Van Nerum I., Geerts M., Van Haute A., Keulemans J., Broothaerts W. (2001). Re-examination of the self-incompatibility genotype of apple cultivars containing putative 'new' *S*-alleles. *Theor. Appl. Genet.* 103: 584-591.
- Zhu Y., Barritt B.H. (2008) *Md-ACS1* and *Md-ACO1* genotyping of apple (*Malus x domestica* Borkh.) breeding parents and suitability for marker-assisted selection. *Tree Genet. Genom.* 4: 555-562.