

Rätt namn på päronen med hjälp av DNA-markörer

HILDE NYBOM, JASNA SEHIC OCH LARISA GARKAVA-GUSTAVSSON

Många länder har numera inrättat program för att samla in, bevara och karaktärisera genetiska resurser av viktiga nyttoväxter. Har de intressanta egenskaper, kan de ju komma till användning i framtiden, antingen som de är eller som föräldrar i ett korsningsprogram inom växtförädlingen. I Sverige bevarar man därför 'mandatsorter' av exempelvis frukt och bär, dvs sorter som uppkommit i Sverige eller som har 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. Den största samlingen av päronsorter finns dock på Balsgård-SLU, med drygt ett 100-tal namngivna sorter varav 30 mandatsorter. För många av de äldre sorterna är ursprunget okänt, och man vet ibland inte ens vilket land de kommit från.

DNA-baserade fingeravtryck

Dessvärre är det inte bara ursprunget till päronsorterna som är dåligt känt – ibland kan även den pomologiskt baserade sortbestämningen vara osäker, särskilt när det gäller gamla träd av ovanliga sorter. Numera använder man alltmer ofta DNA-markörer för att förse olika sorter med en individ-baserad streckkod (se t.ex. Garkava-Gustavsson och Nybom, 2004; Gustavsson och Mattisson, 2005; Gar-



Fig. 1. Att skilja på päronsorter är inte så lätt... här har vi Conference till vänster och en dottersort, Concorde, till höger.

kava-Gustavsson, 2006; Nybom, 2009; Nybom m.fl., 2009). Medan vanliga, pomologiska karaktärer kanske kan påvisa 5% feletiketteringar i en sortsamling, så har de betydligt känsligare DNA-markörerna i typiska fall kunnat påvisa upp till 30% fel (Nybom och Weising, 2010).

För sortidentifiering används oftast mikrosatellit-DNA-markörer, som analyseras med hjälp av speciella primerpar; dvs korta, syntetiskt framställda DNA-sekvenser. Med dessas hjälp kan man skapa ett DNA-fingeravtryck för en viss sort. Detta DNA-fingeravtryck kan sedan användas för jämförelse med andra

sorter. DNA-fingeravtrycket säger däremot inget alls om vilka egenskaper sorten har, utan kan snarare jämföras med en streckkod på en varuhusartikel.

Ett antal päronbanken har redan börjat utnyttja DNA-markörernas fördelar. Sälunda har alla 500 päronsorterna i National Fruit Collection på Brogdale Farm i England analyserats (Fernández-Fernández, 2010) med 12 olika primerpar (amplifierar en viss bit av DNA-sekvensen). Dessa primerpar har utformats så att de amplifierar (förmerar) DNA i ett mikrosatellit-DNA locus, dvs en liten bit av DNA-molekylen som ofta muterar

Genetisk terminologi

De flesta päronsorter är diploida och har 34 kromosomer som bildar 17 par. På kromosomerna sitter ett stort antal gener. Den plats på en kromosom där gener för ett visst arvsanlag huserar kallas ett locus ('loci' i plural). Gener som 'bor' i samma locus hos ett visst kromosompar kallas ofta alleler, eftersom de egentligen bara utgör olika varianter av samma ursprungliga gen. En diploid päronsort kan ha en allel (de två kromosomerna i ett par har då samma allel) eller två olika alleler (de två kromosomerna i ett par har olika alleler) i ett visst locus. En triploid sort (sammanlagt 54 kromosomer som bildar 17 tripletter) kan på motsvarande sätt ha upp till tre olika alleler i samma locus.

I en mikrosatellit-DNA-analys amplifierar (förmerar) varje primerpar en bit av DNA-molekylen som då kallas för ett locus trots att vi egentligen inte vet om just denna bit av DNA-molekylen har betydelse för något arvsanlag. I varje sådant locus kan en vanlig, diploid päronsort alltså ha två alleler. Triploida sorter kan istället ha tre olika alleler i samma locus. Olika alleler skiljer sig ofta åt i antalet baspar som bygger upp DNA-molekylen, och det är dessa skillnader som vi mäter i våra analyser.



Fig. 2. För Balsgårdssorten Carola kunde vi med DNA-märkorens hjälp kontrollera att den uppgivna härstamningen stämmer, dvs Johantorp x Comice.



Fig. 3. För Fritjof, som förädlats fram i ett samarbete mellan Balsgård och Njøs (dåvarande Planteforsk numera Graminor, Norge) är härstamningen Clapps Favorit x Conference. Foto Stein-Harald Hjeltnes, Graminor Njøs, Norge.



Fig. 4. Den triploida sorten Ingeborg ur samma förädlingsprogram som Fritjof, har enligt DNA-märkorens uppkommit genom att en diploid äggcell av Conference blivit befruktad av en haploid pollencell av Bonne Louise. Foto Stein-Harald Hjeltnes, Graminor Njøs, Norge.

och som därför är lämplig för sortidentifiering. Primerpar för analys av just päron har valts ut inom ECPGR (European Community for Plant Genetic Resources; Evans m.fl., 2009), och målsättningen är att alla erhållna DNA-resultat ska matas in i en gemensam databas, som sedan kan utgöra referens för olika nationella sortsamlingar runt om i världen (EMR, 2012).

Det svenska päronprojektet

Forskarna på Balsgård fick anslag under 2008 och 2009 från Jordbruksverket för att utföra en DNA-baserad identifiering av mandatsorterna av päron i Sverige. Målsättningen var att alla dessa skulle föras med ett DNA-fingeravtryck.

Bladprover samlades in från träd av mandatsorter både på Balsgård och i de olika klonarkiven. För denna undersökning rekviderade vi även bladprover från åtta referensträd på Brogdale i England. Ytterligare en handfull sorter av speciellt intresse togs med, som exempelvis den synnerligen päronpest-resistenta sorten Hesse (Przybyla m.fl., 2012). Alla dessa sorter analyserades i DNA-laboratoriet på Balsgård. Vi använde 12 olika mikrosatellit-DNA primerpar men två av dem gav opålitliga resultat, och utslöts därför från följande beräkningar. Övriga 10 primerpar producerade tydliga bandmönster.

De flesta päronsorterna är diploida, och har då maximalt två alleler i varje mikrosatellit-DNA-locus, dvs två urskiljbara band. Sedan tidigare kända triploida sorter i vår undersökning är Filip, Gråpäron, Kejsarinnepäron och Moltke. Genom flödescytometri (mäter mängden DNA i cellkärnorna) kunde vi även fastställa att Hovrådspäron och Ingeborg är triploida. I DNA-undersökningen visade det sig, som väntat, att samtliga dessa sorter hade upp till tre alleler i vissa loci.

Släktskapsförhållanden

I tre fall kunde vi jämföra en sort med sina föräldrar; Carola (Johantorp x Comice; Fig. 2), Fritjof (Clapps Favorit x Conference; Fig. 3) och Ingeborg (Conference x Bonne Louise; Fig. 4). I varje locus har avkommesorten ärvt en allel från modern och en från fadern när det gäller de diploida sorterna Carola och Fritjof. Den triploida sorten Ingeborg har däremot uppstått genom att en diploid äggcell av Conference blivit befruktad av en haploid pollencell av Bonne Louise. Detta syns tydligt i exempelvis locus CH01f07a, där Ingeborg har tre olika alleler; allelerna 182 och 193 återfinns hos Conference medan allel 209 återfinns hos Bonne Louise.

Vi räknade även ut parvisa likheter

mellan 54 sorter som förefaller vara korrekt identifierade, och använde sedan dessa data för att göra ett dendrogram, som visar hur lika de olika sorterna är (Fig. 5). Tre av referenssorterna tillhör 'exotiska' arter (*P. calleryana*, *P. pyrifolia* och *P. salicifolia*) och skiljde sig tydligt från alla andra sorter, vilka istället representerar det vanliga europeiska päronet *P. communis*.

Sortidentifiering

Med hjälp av våra DNA-profiler och de jämförelser vi har gjort med profiler för motsvarande sorter i genbanken på Brogdale, har vi kunnat dra en hel del slutsatser rörande det undersökta sortmaterialet, se tabellen. På 'köpet' fick vi också klarlagt en del synonymer mellan namnen på våra undersökta sorter och de namn samma sorter har utomlands.

Av de päronsorter som representerades av ett enda DNA-prov, hade 19 en unik DNA-profil. På samma sätt hade 17 av de sorter, som representerades av minst två DNA-prov, en unik DNA-profil. Samtliga dessa 36 sorter kan alltså vara korrekt etiketterade men bör förstås även kontrolleras av pomologisk expertis. Två fall av förväntade synonymer hittades också; Blodpäron och Rödköttigt päron var identiska, liksom också vanlig Clapps favorit och den röda mutationen av samma sort.

Tabell. Analyserade päronsorser (S: troligen svenskt ursprung, U: utländskt ursprung, 3x: triploid) samt växtplats (ALT Alntorps Ö, B Balsgård, BE Bergianska trädgården, BR Brunstorps gård, BROG Brogdale, CA Capellagården, FR Fredriksdal, JU Julita, LH Linnés Hammarby, MU Munkagårdsgymnasiet, SK Skälby kungsgård, V Pomerium vadstenense). För två sorter (Tysk nationalbergamott och Windsor), togs material från två olika träd på Balsgård. Klass anger hur DNA-profilen stämmer med trädets etikett; 1: ett prov med en, unik DNA profil, 2: två eller fler prov med samma sortnamn och samma, unika DNA profil, 3: synonymer dvs två prov med olika namn men samma, unika DNA profil, 4: uppenbara fall av feletikettering (samma namn men olika DNA profiler, eller olika namn men samma DNA-profil); inom parentes anges vilken sortsamling som troligen har det korrekta trädet.

* anger att identifieringen styrks av jämförelser med DNA-data för träd i 'National Fruit Collection' på Brogdale, England (www.nationalfruitcollection.org.uk/).

Sort	Sortsamling	Klass
Aspa hushållspäron S	ALT	1
Augustipäron (Experimentalfältets augustipäron) S	BE	1
Bergamott U	SK	4
Blodpäron (Franskt blodpäron) U	BR	3
Bonne Louise (Louise Bonne of Jersey) U	B+V	4 (B+V)*
Carola S	B+BR	2
Cecilia S?	B+JU	4
Clapps Favorit U	BR	3*
Clapps Favorit, röd U	B	3
Clara Frijs U	B+CA	2*
Comice (Doyenné du Comice) U	B (+BROG)	2*
Conference U	B (+BROG)	2*
Esperens herre (Seigneur d'Esperen) U	B+V	2*
Filip (Doyenné Boussoch) U, 3x	B+BR	2*
Fritiof S	B+ALT	4 (B)*
Fulleröparon S	LH	1
Furstligt grönt taffelpäron (Fürstliche Tafelbirne) U	B+FR	2
Gansels bergamott U	B+FR	2*
Gernandtpäron S	FR	1
Gråpäron (Jut) U, 3x	B+SK	4 (B)*
Grånnäparon S	B+BR	2
Göteborgs diamant U	B+MU	2
Herzogin Elsa U	B+CA	2*
Hessle (Hasselpäron, Hazel pear) U	B	1*
Holländskt fikonpäron (Calbas musqué) U	B+BR	4
Hovrådspäron (Marechal de Cour) U, 3x	B+ALT	2*
Hovsta S	B+JU	2
Höstbergamott (Bergamotte ronde d'automne) U	B+BE	4 (B)*
Ingeborg S, 3x	B	1*
Johantorp U	B	1
Kanelpäron från Järnboås S	ALT	1
Kanelpäron från Vadstena S	ALT	1
Kejsarinneparon (Epargne, Jargonelle) U, 3x	B+LH+BR	2*
Klockhammarspäron S	JU+ALT	4 (ALT)
Leabo långpäron S	BR	1
Lindhults päron S	MU	1
Lundströms bonchrétien S	LH	1
Lybeckerbergamott (Lübecker Sommerbergamotte) U	B+LH	4 (B)
Moltke (Grev Moltke) U, 3x	B+FR	2
Munkpäron S?	ALT+JU+V	4 (ALT+V)
Nisse (selektion från Balsgård) S	B	1
Pierre Corneille U	B+CA	2*
Påskpäron (Doyenné d'hiver, Easter Beurré) U	FR	1*
Rödköttigt päron U	B	3
Skånskt sockerpäron (Sapin) U	FR	1
Solleröparon S	B	1
Svanhalsar U	ALT	1
Södermanlandspäron S	B+LH+JU	2
Tedapäron S	JU	1
Trogsta augustipäron S	JU	1
Tysk nationalbergamott (Deutscher Nationalbergamotte) U	B (2363 + 2364)	4
Unknown pear	BR	
Vingåkers kanel S	JU+ALT	4 (JU+ALT)
Wennströmspäron S	LH	1
Windsor U	B (2365 + 2666)	4
Ålebyparon S	JU	1
Referenser från Brogdale, England		
Abbé Fétel U	BROG 1951-105	
<i>P. calleryana</i> Chantecler U	BROG 1996-106	
Comice U	BROG 1973-200	
Conference U	BROG 1973-199	
<i>P. pyrifolia</i> Housui U	BROG 1985-003	
Passe crassane U	BROG 1975-195	
<i>P. salicifolia</i> Pendula U	BROG 1996-105	
Williams U	BROG 2001-099	

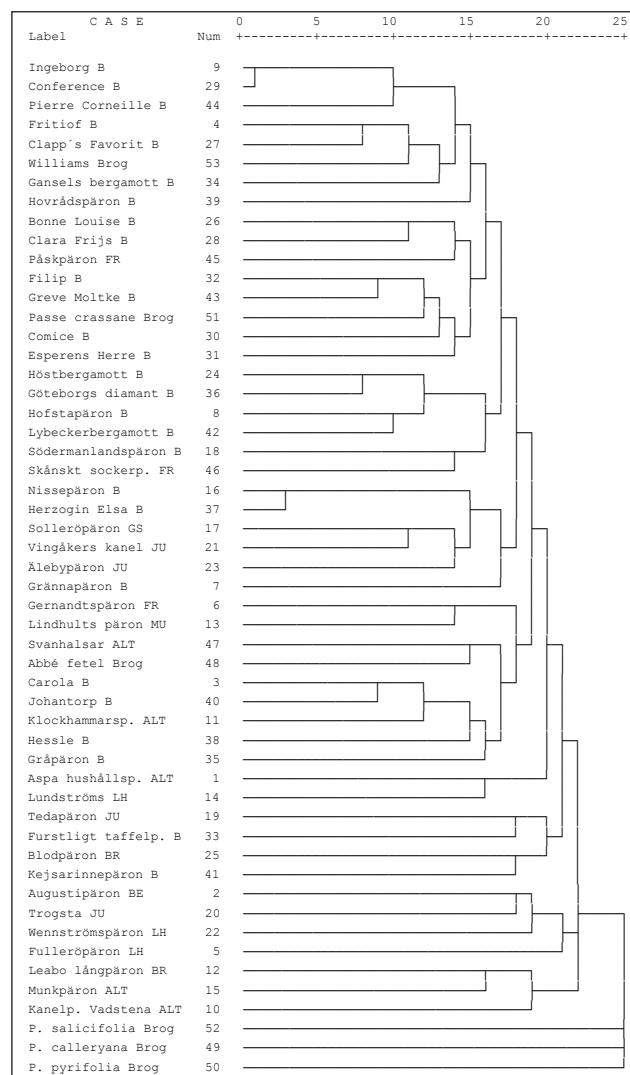


Fig. 5. Dendrogram som visar graden av genetisk likhet mellan olika päronsorser. Återgiven från *Sehic m.fl.*, manuskript insänt.

Problematiske bestämmningar involverade inte mindre än 14 av de undersökta sorterna som tagits upp på mandatsortlistan, dvs 28%. I vissa fall kan man enkelt fastställa en feletikettering; Fritiof från Alntorps Ö är istället Ingeborg. På liknande vis torde Klockhammarspäron från Julita egentligen vara Vingåkers kanel, medan Gråpäron från Skälby Kungsgård istället tycks vara Bonne Louise. Innan man skyltar om träden, bör man dock komplettera med en pomologisk kontroll eftersom man inte kan utesluta att felet uppstått senare i kedjan, dvs vid skörd och etikettering av växtmaterial eller på laboratoriet.

När samma sortnamn representeras av minst två DNA-profiler, som inte liknar profilerna från någon annan sort, är det förstås svårare att säga vilket träd som är det korrekta. Detta gäller Cecilia, Holändskt fikonpäron, Munkpäron och Windsor. Jämförelser med DNA-data från Brogdale visade dock att båda Windsor-träden på Balsgård är feletiketterade, och att det ena är identiskt med Liegel's Butterbirne/Virgoloso på Brogdale!

En ännu mer komplicerad situation involverar fyra av sorterna inom bergamott-gruppen. Höstbergamott från Bergianska samt Lybeckerbergamott och Tysk nationalbergamott från Balsgård hade identiska DNA-profiler; troligen ska Lybeckerbergamott vara korrekt enligt pomologisk expertis (L.-O. Rosenström). En annan DNA-profil påträffades hos både Höstbergamott (Balsgård) och Bergamott (Skälby Kungsgård), och denna stämmer med Autumnborgamott på Brogdale. Slutligen finns det ytterligare en DNA-profil för Lybeckerbergamott från Linnés Hammarby.

Spelar det någon roll?

Om dagens genbanker ska ha någon verklig betydelse för framtida forskning och växtförädling, måste vi kunna koppla all information om genbankssorterna till ett korrekt bestämt och väl karakteriserat sortmaterial. Eftersom det är speciellt dyrbart att bevara sorter av storvuxna, långlivade, och vegetativt förökade växtslag som äpple och päron, vill man dessutom förstås undvika att bevara onödigt material, som dubletter och/eller felbestämningar. Slutligen måste man även tänka

på att direkta brukare av materialet (dvs personer som vill använda de befintliga sorterna) måste kunna garanteras att det växtmaterial de rekviderar verkligen representerar den avsedda sorten.

Totalt 36 av de 50 analyserade mandatsorterna kan ha varit helt korrekt bestämda. Våra DNA-profiler bör dock helst jämföras med motsvarande data framtagna i andra genbanker (kan bli svårt för de genuint nordiska sorterna som knappast undersökts någon annanstans!) och sedan verifieras med en pomologisk kontroll. För övriga 14 sorter är det mera problematiskt. I vissa fall tycks det bara handla om felskyttade träd men man kan förstås inte utesluta att felet uppstått senare i kedjan, dvs vid skörd och etikettering av växtmaterial eller på laboratoriet.

Tack

Vi vill tacka alla klonarkivsvårdare som ställt växtmaterial till förfogande, Brogdale/East Malling i England som bidrog med både material av referenssorterna och med en datafil med alla sina DNA-resultat, samt Lars-Olov Rosenström och hans pomolog-kollegor som har undersökt materialet i Balsgårds samlingar samt i en del av klonarkiven.

Referenser

EMR hemsida (2012) NFC pear dataset; <http://www.emr.ac.uk/SPFeliFernandez.htm>, åtkomst 2012-03-23.
Evans KM, Fernández-Fernández F, Govan C (2009) Harmonising fingerprinting protocols to allow comparisons between germplasm collections – *Pyrus*. *Acta Hort.* 814:103–106.

Fernández-Fernández F (2010) Final report of Defra project GC0140 'Fingerprinting the National Apple and Pear Collections' (<http://randd.defra.gov.uk/>), åtkomst 2011-12-15.

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

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

Gustavsson L, Mattisson H (2005) DNA avslöjar fruktsorten. *Frukt & Bär* 47 (3): 4–5.

Nybom H (2009) En sort är en sort är en sort, eller...? *Pomologen* 9(3): 19–22.

Nybom H, Gustavsson L, Sehic J, Gunnarsson Å (2009) DNA kartläggs hos svenska frukt- och bärsamlingar. *Frukt & Bär* 2009 (10): 16–17.

Nybom H, Weising K (2010) DNA-based identification of clonally propagated cultivars. I: Janick J (Red.) *Plant Breed. Rev.* 34: 221–295.

Przybyla AA, Bokszczyński KL, Scholtenberger M, Gozdowski D, Madry W, Odziemkowski S (2012) Fire blight resistance of pear genotypes from different European countries. *Trees* 26: 191–197.

Sehic J, Garkava-Gustavsson L., Fernández-Fernández F, Nybom H. Genetic diversity in a collection of European pear (*Pyrus communis*) cultivars determined with SSR markers chosen by ECPGR. Manuskrift insänt.

Faktabladet är utarbetat inom
LTJ-fakultetens område för Växtförädling och bioteknik, Balsgård
www.slu.se/balsgard

Projektet är finansierat av Jordbruksverket (www.sjv.se)

Projektansvarig Hilde Nybom, hilde.nybom@slu.se

<http://epsilon.slu.se>