

Identifiering av päronsorter med hjälp av DNA-markörer

Bakgrund

En viktig förutsättning 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 (Program för Odlad Mångfald), som i samarbete med NordGen (f.d. 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 (Hjalmarsson 2007). Desutom finns det en större samling av päronsorter, nämligen på Balsgård-SLU, med drygt ett 100-tal namngivna sorter varav 30 mandatsorter.

Vanligen utnyttjar man pomologisk expertis vid insamling och upprättande av sortsamlingar. Men tyvärr är det ofta mycket svårt att bestämma päronsorter enbart på pomologiska karaktärer (Nilsson 1989), vilket innebär att en del av växtmaterialet i olika genbanker kan vara felbestämt. Dessutom kan vissa förment lokala eller nationella sorter egentligen vara identiska med utländska sorter som pomologerna inte varit bekanta med. Många fel kan också uppstå vid det fortsatta arbetet med förökning och plantering av växtmaterial.

DNA-baserad sortidentifiering

Numera finns det DNA-markörer som kan användas för att förse exempelvis päronträd med en individ-baserad streckkod (Ghosh m.fl. 2006; Bao m.fl. 2008; Bassil m.fl. 2008; Xuan 2008; Bassil och Postman 2009). Flera vetenskapliga böcker och artiklar har publicerats med detaljerade beskrivningar av olika DNA-markörer och deras användbarhet för sortbestämning (se t.ex. Weising m.fl. 2005; Nybom och Weising under tryckning). Kortare och mera lättillgängliga artiklar med fokus på kärnfrukt och skrivna på svenska finns också (se t.ex. Garkava-Gustavsson och Nybom 2004; Gustavsson och Mattisson 2005; Garkava-Gustavsson 2006; Nybom 2009; Nybom m.fl. 2009a, 2009b).

Vanligen baseras DNA-analyserna på blad av aktivt växande träd. I framtiden kommer man troligen att alltmer använda DNA-analyser för att även analysera olika produkter som framställts av det aktuella sortmaterialet. Detta är speciellt intressant för sådana produkter, som enligt etiketteringen, framställts av en viss, kanske både kulturellt och biologiskt speciellt värdefull sort. Sålunda har man kunnat påvisa att den lokalt odlade äpplesorten Annurca verkligen hade använts i vissa juice- och mosprodukter (Melchlade m.fl. 2007). Man har även lyckats framställa analyserbart DNA ur torkade päron, samt, med vissa svårigheter, ur konserverad frukt och juice (Yamamoto m.fl. 2006).

DNA-baserade analysresultat för sortbestämning i genbanker kan delas in i fem olika klasser (de Andres m.fl. 2007). Klass 1 omfattar sorter för vilka det bara finns ett DNA-prov och detta uppvisar en unik DNA-profil. Klass 2 omfattar sorter som representeras av flera DNA-prover (t. ex. från flera träd i olika sortsamlingar), och där dessa prover uppvisar en enda, unik DNA-profil. Om det analyserade växtmaterialet är korrekt bestämt, så är alltså både klass 1- och klass 2-sorterna korrekt skyltade i de undersökta sortsamlingarna. Klass 3 omfattar sorter med olika namn men med samma, unika DNA-profil. Om materialet är korrekt bestämt, måste alltså dessa sorter betraktas som synonymer eller möjligen som mutanter vilka inte kan skiljas åt med DNA-markörerna. Klass 4a omfattar sorter med flera DNA-prover som

i sin tur ger upphov till olika DNA-profiler. Om materialet är korrekt bestämt, måste en sådan sort betraktas som icke enhetlig vilket egentligen inte bör kunna hända inom vegetativt förökade växtslag som päron. Klass 4b är identisk med klass 4a förutom det faktum att minst en av de olika DNA-profilerna även förekommer hos en sort med ett annat namn, vilket tyder på att åtminstone delar av det undersökta växtmaterialet är felbestämt.

Mikrosatellit-DNA-markörer

Flera olika typer av DNA-markörer har använts, som RAPD, AFLP och transposon-baserade metoder för att särskilja exempelvis äpple- respektive päronsorter (Antonius-Klemola m. fl. 2006; Garkava-Gustavsson och Nybom 2007; Bao m.fl. 2008).

När syftet är att framställa DNA-baserad information för identifiering av material i större sortsamlingar, används emellertid nästan alltid mikrosatellit-DNA-markörer eftersom dessa oftast ger tydliga och reproducerbara resultat, vilka lämpar sig för upprättande av stora databaser som kan utnyttjas även i internationella sammanhang (Ghosh et al. 2006; Bassil et al. 2008; Garkava-Gustavsson m.fl. 2008; Xuan 2008; Bassil och Postman 2009). En mikrosatellit-DNA-markör består av en liten bit av DNA-molekylen där det ofta sker mutationer. Denna typ av DNA används därför för identifiering av enskilda människor, djur och växter. För framställning av mikrosatellit-DNA-markörer används speciella primerpar; dvs korta, syntetiskt framställda DNA-sekvenser. Med dessas hjälp kan man skapa ett 'DNA-fingeravtryck' för en viss sort vilket sedan kan användas för jämförelse med andra sorter eller individer av samma art. Dessa DNA-fingeravtryck säger däremot inget alls om vilka egenskaper sorten eller individen har, utan kan snarare jämföras med en streckkod på en varuhusartikel.

Inom ECPGR (European Community for Plant Genetic Resources) har man tillsatt en kommitté för utarbetande av ett gemensamt internationellt system för användningen av DNA-markörer som hjälpmedel för sortidentifikation. 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. Dessa har valts ut inom ECPGR (Evans m.fl. 2009), och målsättningen är att alla dessa DNA-data ska matas in i en gemensam databas, som sedan kan utgöra referens för olika nationella sortsamlingar runt om i världen.

Gener och alleler

Flertalet päronsorter är diploida (sammanlagt 34 kromosomer). Dessa 34 kromosomer 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.

Varje primerpar i en mikrosatellit-DNA-analys, amplifierar en bit av DNA-molekylen som då kallas för ett locus (trots att vi inte alls 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 storleksskillnader som vi mäter i våra analyser. Mikrosatellit-DNA-alleler har oftast en storlek på 100–200 baspar (bp). Med dagens känsliga analysmetoder, kan man särskilja även sådana alleler som bara skiljer sig åt med ett eller två baspar.

Projekt för identifiering av päronsorter

Medel erhöles 2008 (210.000:-) och 2009 (200.000:-) från Jordbruksverket för att utföra en DNA-baserad identifiering av mandatsorter av päron i Sverige. Målsättningen var att alla mandatsorterna skulle förses med ett DNA-fingeravtryck baserat på generna i 12 mikrosatellit DNA loci, utvalda inom ECPGR. Projektansvarig har varit Hilde Nybom, och utförare av DNA-analyserna Jasna Sehic.

Material

Bladprover samlades in 2008 och 2009 från 30 sorter på Balsgård: Rödköttigt päron (ej i mandatsortlistan men misstänkt synonym till Blodpäron), Bonne Louise (synonym: Bonne Louise d'Avreches), Carola, Cecilia, Röd Clapps favorit (ej i mandatsortlistan men troligen en mutation av vanlig Clapps favorit), Clara Frijs, Comice (synonym: Doyenné de Comice), Conference, Esperens herre, Filip (synonym: Dubbelfilip), Fritjof, Furstligt grönt taffelpäron (synonym: Fürstliche Tafelbirne), Gansels bergamott, Gråpäron (synonym: Jut), Grännapäron (synonym: Gränna rödpäron), Göteborgs diamant, Herzogin Elsa, Holländskt fikonpäron (synonym: Calbas musqué), Hovrådspäron (synonym: Maréchal de Cour), Hovsta, Höstbergamott (synonym: Bergamotte ronde d'automne), Ingeborg, Johantorp, Kejsarinnepäron (synonym: Epargne), Lybeckerbergamott (synonym: Lübecker Sommerbergamotte), Moltke (synonym: Grev Moltke), Pierre Corneille, Solleröpäron, Tysk nationalbergamott (synonym: Deutscher Nationalbergamotte; två olika träd analyserades) och Windsor (två olika träd analyserades).

Från klonarkiven fick vi material av 21 sorter år 2008. Merparten erhöles som kvistar insamlade under tidig vår. Dessa kvistar drev vi sedan fram i växthus tills de producerade tillräckligt med blad för DNA-extraktioner. Insamlade sorter var Hushållspäron (Aspa Hushållspäron) och Kanelpäron från Järnboås från Alntorps Ö, Bergamott från Skälby kungsgård, Blodpäron (kallat Franskt blodpäron), Clapps favorit, Grännapäron och Leabo långpäron från Brunstorp, Gernandtpäron, Påskpäron (synonym: Doyenné d'hiver) och Skånskt sockerpäron (synonym: Sapin) från Fredriksdal, Fulleröpäron, Lundströms bonchrétien och Wennströmspäron från Linnés Hammarby, Augustipäron (synonym: Experimentalfältets augustipäron) från Bergianska trädgården, Klockhammarspäron, Södermanlandspäron, Tedapäron, Trogsta augustipäron, Vingåkers kanelpäron och Ålebypäron från Julita, och Lindhultspäron från Munkagårdsgymnasiet. Tre av dessa sorter förmodades vara identiska med sorter som togs med även från Balsgård:

Blodpäron/Rödköttigt päron, Clapps favorit/Röd Clapps favorit och Grännapäron.

Under 2009 kompletterades materialet med Fritjof, Hovrådspäron, Kanelpäron från Vadstena (ej mandatsort men togs med som jämförelsematerial), Klockhammarspäron, Munkpäron, Svanhalsar och Vingåkers kanel från Alntorps Ö, Höstbergamott från Bergianska trädgården, Carola, Filip, Holländskt fikonpäron, Kejsarinnepäron samt en okänd sort från Brunstorp, Göteborgs diamant från Munkagårdsskolan, Furstligt grönt taffelpäron, Gansels bergamott och Moltke från Fredriksdal, Lybeckerbergamott från Linnés Hammarby, Cecilia, Hovsta, Klockhammar, Munkpäron, Södermanlandspäron och Vingåkers kanel från Julita, Gråpäron från Skälby Kungsgård, Bonne Louise, Esperens herre och Munkpäron från Pomerium Vadstenense, samt Clara Frijs, Herzogin Elsa och Pierre Corneille från Capellagården.

För denna undersökning rekvirerade vi även bladprover från åtta speciella referensträd, som finns i samlingarna på Brogdale i England. Dessa referenser representerar sorterna Abbé Fetel, Chantecler, Comice, Conference, Hosui, Passe crassane och Williams samt den vilda arten *Pyrus pendula*. Dessa 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. För extraktion av DNA användes DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen) och tillverkarens eget laborationsprotokoll.

DNA amplifiering

Vi använde specialbeställda primerpar för 12 olika mikrosatellit-DNA-loci, som hade valts ut inom ECPGR, och som redan hade använts för att bl a undersöka päronenbankerna på Brogdale i England samt i Corvallis i USA. Med hjälp av PCR-teknik, amplifierades DNA från varje mikrosatellit-DNA-locus för vart och ett av de olika DNA-proverna. För DNA-amplifieringen användes fyra olika recept (Tabell 1). Gemensamt för alla recepten var 1X buffert, 0.2 mM dNTP och 0.25 U Taq Polymeras (Thermo Fisher Scientific, Surrey, UK). Total volym var 12.5 µl med ca 6.25 ng DNA per prov. För primerpar GD96 användes recept 4, för primerpar EMPc11 recept 3, för primerpar CH05c06, CH01d08 och CH04e03 recept 2, och för resterande primerpar användes recept 1.

DNA-amplifieringen utfördes på en PX2 Thermal Cycler. För verifiering av att korrekt amplifiering hade skett, testades ca 10 slumpmässigt utvalda prover, för varje primer, på en agarosgel. Då erhålls 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. Detta utfördes på Swegene vid Malmö Akademiska Sjukhus, med hjälp av en 3730 DNA Analyzer (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 analyserades de åtta referensproverna tillsammans med mandatsorterna. Dessutom dubblerades tre av proverna som en kontroll av reproducerbarhet. Ett stort antal prover analyserades dessutom två eller tre gånger för att erhålla så säkra resultat om möjligt. Dylka kontrollkörningar utfördes dels när de första resultaten ej hållit tillräckligt hög teknisk kvalitet, och dels när resultaten indikerade att växtmaterialet kunde vara felbestämt.

Databearbetning

En klusteranalys utfördes med metoden UPGMA i statistikprogrampaketet SPSS, för att snabbt kunna identifiera duplicerade DNA-profiler samt nära släktskapsförhållanden.

Kromosomtalsbestämningar

Bladmaterial av flera sorter med okänt kromosomtall: Furstligt grönt taffelpäron, Gansels bergamott, Hovrädspäron, Ingeborg och Pierre Corneille samt den dokumenterat diploida sorten Conference (som standard) sändes till Holland för fastställande av kromosomtalsnivå med hjälp av flödescytometri (mäter innehållet av DNA i cellkärnorna) hos Plant Cytometry Services.

Resultat

Såväl isolering av DNA som optimering av PCR-amplifieringarna visade sig vara mera komplicerat än vi hade förutsett. Päron 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. Vi upptäckte också att två primerpar gav mycket varierande resultat, och vi beslöt att inte ta med dessa i den slutgiltiga utvärderingen. De 10 loci, för vilka vi fick experimentellt tillförlitliga resultat, är listade i Tabell 2. Några rutor i tabellen är tomma beroende på att vi väntar på kompletterade resultat från den sista omgången elektroforeser i Malmö. Dessa resultat lär dock inte påverka våra slutsatser rörande vad som är identiska respektive skilda DNA-profiler.

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. Våra DNA band är ibland 1–4 baspar större eller mindre än banden som angivits av ECPGR men dylika differenser i bandstorlek uppkommer mycket ofta när resultat från olika laboratorier jämförs. Sannolikt orsakas dessa differenser både av skillnader i de använda kemikalierna och av skillnader i den tekniska utrustningen.

Kromosomtalsbestämningar

Både Hovrädspäron och Ingeborg visade sig vara triploida enligt flödescytometriundersökningen. Andra, sedan tidigare kända triploida sorter i vår undersökning är Filip, Gråpäron, Kejsarinnepäron och Moltke. I DNA-undersökningen visade det sig, som väntat, att samtliga dessa sorter hade upp till tre alleler i vissa loci. Ytterligare fem sorter hade tre alleler vardera i ett enda locus, EMPC117. Troligen var detta en experimentell artefakt, orsakad av att dessa primerpar amplifierade även ett andra, svagare locus. Tre av dessa sorter hade nämligen visat sig vara diploida i den flödescytometriska undersökningen; Furstligt grönt taffelpäron, Gansels bergamott och Pierre Corneille. De andra två sorterna, Kanelpäron från Järnboås och Svanhalsar, undersöktes ej med flödescytometri.

Släktskapsförhållanden

I tre fall var det möjligt att jämföra en sort med sina två föräldrar; Carola (Johantorp x Comice), Fritjof (Conference x Clapps Favorit) och Ingeborg (Conference x Bonne Louise). I varje locus har avkommesorten ärvt en gen från modern och en från fadern när det gäller de diploida sorterna Carola och Fritjof. Den triploida sorten Ingeborg har däremot uppenbarligen 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.

Klass 1 sorter; ett prov - en DNA profil

Vi hade sammanlagt 18 fall av sorter som representerades av endast ett DNA-prov, vilka i sin tur producerade var sin unik DNA-profil. Om dessa sorter är korrekt bestämda i sina respektive sortsamlingar, så har vi alltså tagit fram korrekta och sorts specifika DNA-profiler till följande sorter: Aspa hushållspäron, Augustipäron, Fulleröpäron, Gernandtpäron, Johantorp, Kanelpäron från Järnboås, Kanelpäron från Vadstena, Leabo långpäron, Lindhultspäron, Lundströms bonchrétien, Påskpäron, Skånskt sockerpäron, Solleröpäron, Svanhalsar, Tedapäron, Trogsta augustipäron, Wennströmspäron och Ålebypäron. Alla utom två av dessa sorter hade DNA-profiler som skiljde sig mycket tydligt från övriga sorters profiler. Ett undantag utgjordes av Johantorp, vars profil hade vissa likheter med profilen för Carola, som är en avkomling till Johantorp. För övriga sorter kunde inga närmare släktskapsförhållanden urskiljas. DNA-profilen för Kanelpäron från Vadstena visade sig emellertid vara identisk med profilen för ett prov taget från ett okänt träd i Brunstorp sortsamling. Därmed kan det okända trädet troligen betraktas som bestämt nu.

Klass 2 sorter; flera prover - en DNA profil

Vi hade sammanlagt 18 fall av sorter som representerades av minst två prover tagna från olika sortsamlingar (här inkluderades även referensmaterialet för Conference och Comice från Brogdale), och för vilka vi fick en, unik DNA-profil, som var väl skiljd från övriga sorters DNA-profiler. För vissa av sorterna saknas fortfarande resultat för ett eller två loci. Nya DNA-amplifieringar är redan gjorda och vi väntar bara på resultaten från Malmö. Med största sannolikhet kommer dessa loci dock att ge resultat som helt och håller överensstämmer med dem vi fått på alla de andra loci som hittills utvärderats för de aktuella sorterna. Om dessa 18 sorter är korrekt bestämda i sina respektive sortsamlingar, så har vi alltså tagit fram korrekta och sorts specifika DNA-profiler till följande sorter: Carola, Clapps favorit (som väntat identisk med sin mutant Röd Clapps favorit), Clara Frijs, Comice, Conference, Esperens herre, Filip, Furstligt grönt taffelpäron, Gansels bergamott, Grännapäron, Göteborgs diamant, Herzogin Elsa, Hovrådspäron, Hovsta, Kejsarinnepäron, Moltke, Pierre Corneille och Södermanlandspäron.

Klass 3 sorter - synonymer

Ett enkelt fall av tydliga synonymer hittades: Franskt blodpäron från Brunstorp visade sig ha samma DNA-profil som Rödköttigt päron från Balsgård.

Klass 4 sorter - felbestämningar?

I mandatsortlistan upptas fem typer av bergamott; Bergamott, Höstbergamott, Gansels bergamott, Lybeckerbergamott och Tysk nationalbergamott. Av dessa är det bara Gansels bergamott (klass 2 sort) som tycks vara problemfri. Bergamott från Skälby Kungsgård var identisk med Höstbergamott från Balsgård. Dessa två skiljde sig sedan i flera band från DNA-provet av Höstbergamott från Bergianska trädgården. Den sistnämnda hade istället en DNA-profil som överensstämde med både Lybeckerbergamott från Balsgård och med Tysk nationalbergamott (två träd) från Balsgård. Ytterligare ett prov av Lybeckerbergamott analyserades. Detta var hämtat från Linnés Hammarby, och skiljde sig tydligt från alla andra bergamott-prover.

Två träd av Bonne Louise, från Balsgård och Vadstena, hade exakt samma DNA-profil. Men denna profil återfanns även hos det ena av de två analyserade träden av sorten Gråpäron, nämligen det träd som kommer från Skälby Kungsgård. Trots att Gråpäron sedan tidigare är känt som en triploid sort, är det bara trädet på Balsgård som uppvisar tre olika alleler i flera loci (EMPC11, EMPC117, CH01d09). Trädet från Skälby Kungsgård överensstämmer däremot helt med Bonne Louise, och det torde därför bara röra sig om en feletikettering.

Av sorten Cecilia analyserades DNA-prover av träd från både Balsgård och Julita. Två tydligt skilda DNA-profiler erhöles, vilket innebär att åtminstone ett av träden är felbestämt. Ingen av dess DNA-profiler har påfallande många band gemensamt med någon av de andra sorternas profiler, och man kan alltså inte se att något av Cecilia-proverna skulle vara 'misstänkt' likt någon annan sort.

Sorterna Fritjof och Ingeborg (framtagna i samarbete mellan Balsgård-SLU och Njøs-Norges Landbrugshögskole på 1980-talet), representerades av träd på Balsgård (båda sorterna) och Alntorps Ö (bara Fritjof). Två ganska olika DNA-profiler erhöles för Fritjof. Eftersom båda föräldrarna till Fritjof (se *Släktskapsförhållanden* ovan) också var med i analysen, kunde vi fastställa att båda träden på Balsgård är korrekt bestämda medan trädet på Alntorps Ö är felaktigt. Detta senare trädet är istället identiskt med Ingeborg, som för övrigt är halvyster till den 'äkta' Fritjof. Vi kan också se i dendrogrammet att DNA-profilen för Balsgårds Ingeborg samt den felbestämda 'Fritjof' från Alntorps Ö, hade stora likheter med profilen för Conference, som är 'mamma' till båda sorterna. Även den äkta Fritjof från Balsgård visar vissa likheter med sin mamma Conference men faktiskt ännu fler med sin pappa Clapp's Favorit. Eftersom Fritjof är en diploid sort, har den bara ärvt hälften av kromosomerna hos Conference, till skillnad från triploida Ingeborg som ärvt alla kromosomerna hos Conference.

Holländskt fikonpäron representerades av träd på Balsgård och i Bergianska. De erhållna DNA-proverna skiljer sig markant, vilket innebär att åtminstone ett av träden är felbestämt. Ingen av dess DNA-profiler är speciellt lik någon av de andra sorternas profiler.

Tre träd av Munkpäron analyserades; träden från Alntorps Ö och Vadstena hade identiska DNA-profiler medan trädet från Julita uppvisade en helt annan DNA-profil. Uppenbarligen är en del av materialet alltså felbestämt.

Tre prover av Vingåkers kanelpäron har analyserats, ett från Alntorps Ö och två från samma träd på Julita men hämtade 2008 och 2009 för att säkerställa att det inte blivit något misstag under hanteringen av växtmaterial och DNA-prover. Dessa tre prover hade alla exakt samma DNA-profil, som förmodligen alltså är den korrekta för denna sort. Samma profil påträffades emellertid även hos Klockhammarspäron från Julita, återigen med två prover insamlade och analyserade 2008 respektive 2009. Detta senare träd är alltså troligen felbestämt. En helt annorlunda DNA-profil återfanns hos Klockhammarspäron från Alntorps Ö, vilken då förhoppningsvis är den korrekta för denna sort.

Slutligen undersöktes två träd av Windsor på Balsgård. Dessa hade emellertid olika DNA-profiler. Material av den förmodat synonyma sorten Svanhalsar införskaffades då från Alntorps Ö, men denna visade sig ha ytterligare en annan DNA-profil. I dagsläget är det alltså omöjligt att veta om vi överhuvudtaget har något korrekt material av denna sort i Sverige.

Diskussion

Om dagens genbanker ska ha någon reell betydelse för framtida forskning och växtförädling, måste all information om genbankssorterna kunna kopplas till ett korrekt bestämt och väl karakteriserat sortmaterial. Eftersom det är särskilt dyrbart att bevara sorter av storvuxna, långlivade, och vegetativt förökade växtslag som äpple och päron, bör man dessutom koncentrera bevarandet till entydigt definierade sorter, och undvika exempelvis dubletter orsakade av synonyma sortnamn. Slutligen måste direkta brukare (dvs personer som vill använda de befintliga sorterna) garanteras att rekvirerat växtmaterial verkligen representerar den avsedda sorten.

I olika undersökningar av genbanker med vindruvssorter, har morfologiska karaktärer indikerat att 5–10% av sorterna är felskyttade (Dettweiler-Münch 1992) medan DNA-analyser

istället tyder på att inte mindre 25–30% av sorterna kan vara felaktigt skyltade (de Andres et al. 2007). Hur många felaktigheter man verkligen hittar varierar förstås med växtslaget samt med omfång och typ av de aktuella sortsamlingarna. Med hjälp av DNA-analys har man rapporterat ett betydande antal felaktigheter, inklusive dubletter, i stora sortsamlingar av t.ex. fikon (Giraldo m.fl. 2008), cherimoya (Escribano m.fl. 2007), oliv (Rao m.fl. 2009), äpple (Routson m.fl. 2009; Gustavsson 2010) och päron (Bassil m.fl. 2008; Xuan 2008). Problemen är oftast större i samlingar med hög procent lantraser, dvs gamla (och numera oftast otillräckligt kända) sorter som uppstått 'spontant' under långa tiders odling.

De svenska mandatsorterna

Flera av de päronsorter som står upptagna i mandatsortlistan, kunde inte återfinnas i något av klonarkiven eller på Balsgård. Därför har vi alltså inte kunnat analysera följande sorter: Dubbelbergamott Vollsjö, Hamraträdet, Knivsta Kvarngård, Muscatell, Närkes Äldsta, Rörstrandspäron, Sandaträdet och Årnästrädet. Sorterna Tysk nationalbergamott och Windsor återfanns heller inte i något klonarkiv men material från Balsgårds samlingar kunde analyseras av dessa. För Windsor har dessutom Svanhalsar angetts vara en synonym, och därför kompletterades undersökningen med material från Alntorps Ö av denna sort.

Av de sorter som representerades av ett enda DNA-prov, hade 18 en unik DNA-profil. På samma sätt hade 18 av de sorter, som representerades av minst två DNA-prov, en unik DNA-profil. Samtliga dessa 36 sorter kan alltså vara korrekt etiketterade. Man bör dock komplettera den befintliga informationen genom att jämföra våra DNA-profiler med motsvarande data framtagna i andra genbanker (vilket kan bli svårt för de genuint nordiska sorterna som knappast undersökts någon annanstans) samt utföra en pomologisk kontroll. Det senare har redan gjorts i Balsgårds sortsamling under ledning av Sven Plasgård, varvid potentiella problem påtalades endast gällande bergamott-gruppen (se nedan).

Problematiske bestämmingar involverade inte mindre än 14 av de sorter som tagits upp på mandatsortlistan, dvs 28%. I vissa fall kan man enkelt fastställa en feletikettering; Fritjof 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, Holländskt fikonpäron, Munkpäron och Windsor/Svanhalsar.

En ännu mer komplicerad situation involverar fyra av sorterna inom bergamott-gruppen. Höstbergamott från Bergianska, Lybeckerbergamott från Balsgård och Tysk nationalbergamott från Balsgård hade identiska DNA-profiler. Minst två av dessa sorter måste alltså vara felaktigt bestämda. En annan DNA-profil påträffades hos både Höstbergamott (Balsgård) och Bergamott (Skälby Kungsgård). När två sorter har så likalydande namn, finns alltid risken att det ena namnet råkat bli felskrivet på en eller flera etiketter. Slutligen finns det ytterligare en DNA-profil för Lybeckerbergamott från Linnés Hammarby. Vilka av alla dessa olika bergamott-träd som är korrekt bestämda, går inte att avgöra utan att man även företar en noggrann pomologisk utvärdering av de aktuella träden.

Mutationer

Träd av samma sort förväntas ha helt identiska genuuppsättningar, och alltså exakt samma gen(er) i vartenda locus. Växtslag med långlivade och vegetativt förökade plantor råkar emellertid ofta ur för somatiska mutationer (mutationer som uppstår exempelvis i ett knoppanslag som sedan växer ut till en gren med något avvikande utseende). Dessa mutanter

har ibland egenskaper som avviker ganska tydligt från resten av trädet och kan då tas tillvara och förökas upp. Dylåka mutanter får ofta egna namn och det kan vara svårt att med säkerhet avgöra om två liknande men ej identiska sorter härstammar från olika fröplantor (med endast delvis identiska arvsanlag) eller från samma fröplanta (identiska arvsanlag så när som på mutationen).

I vårt material visade sig, som väntat, Clapps favorit och Röd Clapps favorit ha samma DNA-profil. Flertalet DNA-markörer som RAPD, AFLP, mikrosatellit-DNA och transposonbaserade markörer kan endast i undantagsfall skilja på den ursprungliga sorten och dess mutanter (Antonius-Klemola m. fl. 2006; Garkava-Gustavsson och Nybom 2007; Garkava-Gustavsson m.fl. 2008). Hittar man endast ett eller två skiljande DNA-band när man jämför två prov, kan dessa visserligen härröra från samma område i kromosomen som den aktuella mutationen, men det kan också röra sig om slumpmässigt uppkomna experimentella felkällor. Den enda metod, som tycks ge någorlunda högt antal särskiljande markörband mellan originalsorter och mutanter är S-SAP som visat sig kunna skilja äppelsorterna Gala, Braeburn och Fuji från sina respektive mutanter (Venturi m.fl. 2006; Zhao m.fl. 2009) liksom även päronsorten Bartlett (synonym: Williams) från tre av sina mutanter (Venturi m.fl. 2009). Dessvärre lämpar sig denna metod inte alls för framställandet av databaser där olika sorter kan läggas till efter hand som de analyseras. Trots att mikrosatellit-DNA alltså är mindre känsligt, är det ändå den metoden man därför fortsätter att använda i de flesta analyser av större sortsamlingar.

Fortsatt arbete

Några kompletterade DNA-analyser utförs just nu (januari 2010) på Swegene i Malmö. Dessa resultat kommer att utvärderas så fort det går, och föras in i listan med allelstorlekar för varje sort och varje mikrosatellit-DNA-locus (Tabell 2). Det handlar emellertid bara om vissa smärre kontroller, som inte bör ändra någonting i sak.

Vi kommer att rapportera in basdata (exakt storleksangivelse för varje band erhållet med de 10 primerpar som analyserats, samt korrigerat så att samma skala används som för övriga ECPGR-databaser) till NordGen för inläggning i databasen SESTO. Exakt hur detta ska ske, kommer att diskuteras på ett möte initierat av NordGen i februari 2010.

Vi kommer att jämföra våra DNA-profiler med motsvarande data från andra länder för att kunna verifiera tidigare gjorda synonymiseringar, eventuellt upptäcka ytterligare fall där de svenska mandatsorterna är identiska med utländska sorter, och – slutligen – för att kunna korrigera eventuella felbestämningar. Den stora päronsamlingen på Brogdale i England är utvärderad med samma loci som vi har använt men resultaten är dessvärre ännu inte publicerade. Även i USA har man analyserat päronsorterna i den nationella (USDA) genbanken i Corvallis, Oregon med dessa markörer (Genbankskurator Kim Hummer, personligt meddelande). De enda resultat man hittills publicerat därifrån, har dock erhållits med andra, ej jämförbara markörer (Bassil m.fl. 2008, Bassil och Postman 2009). En kort rapport har även publicerats från DNA-mikrosatellit-baserad identifiering av päronsorter i en sortsamling i Tyskland (Xuan 2008) där man använde delvis samma loci som i vår undersökning.

Våra erhållna DNA-profiler kan nu även användas som jämförelsematerial för okända sortprover. Sålunda har vi redan visat att det okända trädet i Brunstorps päronsamling var identiskt med ett träd som återfinns på Alntorps Ö under namnet Kanelpäron från Vadstena.

En populärvetenskaplig artikel om ovan beskrivna resultat har nyligen sänts in till Pomologen. Ytterligare en artikel förbereds tillsammans med Larisa Gustavsson. Denna kommer att ta upp DNA-profilerna för både äpple och päron, och den kommer att sändas in till Viola. En vetenskaplig artikel (preliminärt för Journal of Horticultural Breeding and Biotechnology) har påbörjats, och kommer att sändas in för publicering under första halvåret

2010. Vi kommer även att medverka med andra resultatrapporteringar, såväl skriftliga som muntliga respektive IT-baserade.

Vi vill tacka alla de klonarkivsvårdare som ställt material till förfogande, samt Inger Hjalmarsson som hjälpt oss med att spåra adresser till ansvariga personer på de olika klonarkiven samt växtmaterial när sorterna ej funnits på de angivna klonarkiven.

Referenser

- Antonius-Klemola K., Kalendar R., Schulman A.H. 2006. TRIM retrotransposons occur in apple and are polymorphic between cultivars but not sports. *Theor. Appl. Genet.* 112: 999–1008.
- Bao L., Chen K.S., Zhang D., Li X.G., Teng Y.W. 2008. An assessment of genetic variability and relationships within Asian pears based on AFLP (amplified fragment length polymorphism) markers. *Scientia Hort.* 116: 374–380.
- Bassil N.V., Postman J., Hummer K., Dolan S., Lawliss L. 2008. Molecular fingerprints identify historic pear trees in two U.S. national parks. *Acta Hort.* 800: 417–422.
- Bassil N.V., Postman J. 2009. Identification of European and Asian pears using EST-SSRs from *Pyrus*. *Genet. Res. Crop Evol.*, doi: 10.1007/s10772-009-9474-7.
- de Andres M.T., Cabezas J.A., Cervera M.T., Borrego J., Martínez-Zapater J.M., Jouve N. 2007. Molecular characterization of grapevine rootstocks maintained in germplasm collections. *Amer. J. Enol. Viticult.* 58: 75–86.
- Dettweiler-Münch E. 1992. Germplasm repository for grapevine – first results. *Vitis* 31: 117–120.
- Escribano P., Viruel M.A., Hormaza J.L. 2007. Molecular analysis of genetic diversity and geographic origin within an ex situ germplasm collection of cherimoya by using SSRs. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 132:357–367.
- Evans K.M., Fernández-Fernández F., Govan C. 2009. Harmonising fingerprinting protocols to allow comparisons between germplasm collections – *Pyrus*. *Acta Hort.* 814:103–106.
- 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.
- Garkava-Gustavsson L., Nybom H. 2007. Genetic diversity in a collection of apple (*Malus x domestica* Borkh.) cultivars as revealed by RAPD markers. *Int. J. Hort. Sci.* 13 (3): 25–35.
- Garkava-Gustavsson L., Kolodinska Brantestam A., Sehic J., Nybom H. 2008. Molecular characterisation of indigenous Swedish apple cultivars based on SSR and S-allele analysis. *Hereditas* 145: 99–112.
- Ghosh A.K., Lukens L.N., Hunter D.M., Strommer J.N. 2006. European and Asian pears: simple sequence repeat-polyacrylamide gel electrophoresis-based analysis of commercially important North American cultivars. *HortScience* 41: 304–309.
- Giraldo E., Lopez-Corrales M., Hormaza J.I. 2008. Optimization of the management of an ex-situ germplasm bank in common fig with SSRs. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 133: 69–77.
- Gustavsson L., Mattisson H. 2005. DNA avslöjar fruktsorten. *Frukt & Bär* 47 (3): 4–5.
- Gustavsson L. 2010. DNA-kartläggning av svenska mandatsorter av äpple. Projektredovisning, SJV.

- Hjalmarsson I. 2007. Här bevaras våra svenska fruktsorter. Centrum för biologisk mångfald, Alnarp.
- Melchlade D., Foroni I., Corrado G., Santangelo I., Rao R. 2007. Authentication of the 'Annurca' apple in agro-food chain by amplification of microsatellite loci. *Food Biotechnol.* 21: 33–43.
- Nilsson A. 1989. Våra päron-, plommon- och äpplesorter. Nordiska Genbanken.
- Nybom H. 2009. En sort är en sort är en sort, eller...? *Pomologen* 9(3): 19–22.
- Nybom H., Garkava Gustavsson L. 2009. Gene banks: for breeding, research or public entertainment. *Acta Horticult.* 814: 71–75.
- Nybom H., Gustavsson L., Sehic J., Gunnarsson Å. 2009a. DNA kartläggs hos svenska frukt- och bärsamlingar. *Frukt & Bär* 2009 (10): 16–17.
- Nybom H., Sehic J., Ridelius O. 2009b. Risäter och Klaräpple. *Pomologen* 9(3): 22–24.
- Nybom H., Weising K. DNA-based identification of clonally propagated cultivars. In Janick J. (ed.) *Plant Breed. Rev.* 34, under tryckning.
- Rao R., La Mura M., Corrado G., Ambrosino O., Foroni I., Perri E., Pugliano G. 2009. Molecular diversity and genetic relationships of southern Italian olive cultivars as depicted by AFLP and morphological traits. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 84: 261–266.
- Routson K.J., Reilley A.A., Henk A.D., Volk G.M. 2009. Identification of historic apple trees in the southwestern United States and implications for conservation. *HortScience* 44: 589–594.
- Venturi S., Dondini L., Donini P., Sansavini S. 2006. Retrotransposon characterisation and fingerprinting of apple clones by S-SAP markers. *Theor. Appl. Genet.* 112: 440–444.
- Venturi S., De Franceschi P., Dondini L., Sansavini S. 2009. Retrotransposon based markers to discriminate sports in pear. *Acta Hort.* 814: 701–704.
- Xuan H. Identifying European pear (*Pyrus communis* L.) cultivars at the KOB by using apple SSRs. *Acta Horticult.* 800: 439–445.
- Yamamoto T., Kimura T., Hayashi T., Ban Y. 2006. DNA profiling of fresh and processed fruits in pear. *Breed. Sci.* 56: 165–171.
- Zhao G., Dai H., Chang L., Ma Y., Sun H., He P., Zhang Z. 2009. Isolation of two novel complete Ty1-*copia* retrotransposons from apple and demonstration of use of derived S-SAP markers for distinguishing bud sports of *Malus domestica* cv. Fuji. *Tree Genet. Genom.*, doi: 10.1007/211295-009-0236-7.