

Genetisk diversitet i historiskt växtmaterial

Slutrapport SJV anslag 25-10241/06

Matti Leino, Nordiska museet



Sammanfattning

Projektet har syftat till att undersöka om stora bevarade frösamlingar från 1800-talet kan användas som genetiskt referensmaterial för att besvara frågeställningar inom växtförädling, agrarhistoria och bevarandemetodik. Som modell har Kungliga skogs och lantbruksakademins (KSLA) frösamling bevarad vid Nordiska museet undersökts. Metodik har utvecklats för att storskaligt kunna extrahera DNA från gamla döda frön. DNAt i fröna visade sig vara degraderat i olika omfattning beroende på art. DNAkvaliteten visade sig ändå tillräcklig för att amplifiering med PCR (polymerase chain reaction) var möjlig. Som pilotstudie gjordes genetiska fingeravtryck med mikrosatellitmarkörer på ett antal ärtsorter ur frösamlingen, såväl som på sorter bevarade i genbanker och insamlade av POM. Genetisk släktskapsanalys visade på stor genetisk spridning i materialet, att flertalet sorter insamlade inom POM är skiljda från identifierade sorter samt i minst ett fall att POMmaterial kan identifieras som en historisk sort med hjälp av det döda frömaterialet.

Bakgrund

En viktig del av den biologiska mångfalden utgörs av de domesticerade, odlade, växterna. För endast hundra år sedan odlades många tusen sorter och varianter av jordbruks- och köksväxter i Sverige. Sorterna var ofta unika och genom primitivt urval anpassade till den plats där de växte, därav benämningen lantsort eller lokalsort. Sedan den moderna växtförädlingen tog fart runt sekelskiftet har nästan alla dessa sorter slagits ut och ersatts med ett enhetliga, högavkastande sorter. Vilka egenskaper hade de tusentals lantsorts sorter som utgjorde grunden till livsmedelsförsörjningen i Sverige under 1000-tals år? Hur förändrades sorterna när den moderna växtförädlingen började? Är det fåtal lantsorter som finns bevarade idag på Nordiska genbanken (NGB) eller insamlade av POM identiska med 1800-talets? Frågorna är svåra att besvara eftersom nästan inget autentiskt lantsortmaterial finns bevarat.

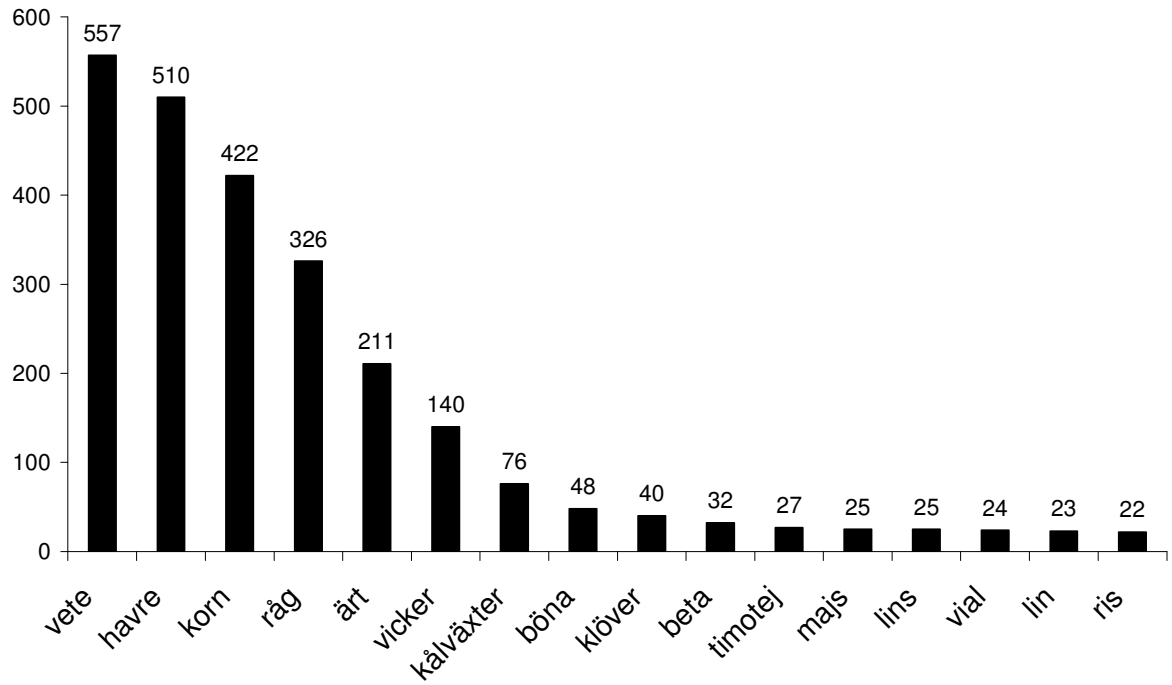
Ett intressant alternativ är att titta på stora samlingar av nu döda fröer som finns bevarade sedan 1800-talet. Kungliga Skogs- och Lantbruksakademien (KSLA) donerade 1964 sina stora frösamlingar till Nordiska museet. I samlingarna ingick ursprungligen ca 4800 fröprover från mitten av 1800-talet och fram till början av 1900-talet. Materialet består av olika insamlingar som genomfördes i Sverige men också inom och utom Europa. Frömaterialet är främst spannmål och ekonomiväxter, men också köksväxter, foder- och betesväxter, träd och buskar. Syftet med forskningsprojektet är att undersöka om dessa frön, trots att förlorat sin grobarhet, kan analyseras med molekylärgenetiska metoder. Inom projektet har genomförts en fullständig inventering av Nordiska museets frösamlingar. Vidare har metodik för att isolera och karaktärisa DNA från döda frön av olika arter utarbetats. Som en pilotstudie har genomförts en jämförande analys av ärtsorter från frösamlingen med sorter bevarade i genbanker samt material insamlat i POM's "Fröupprop".

Metodik

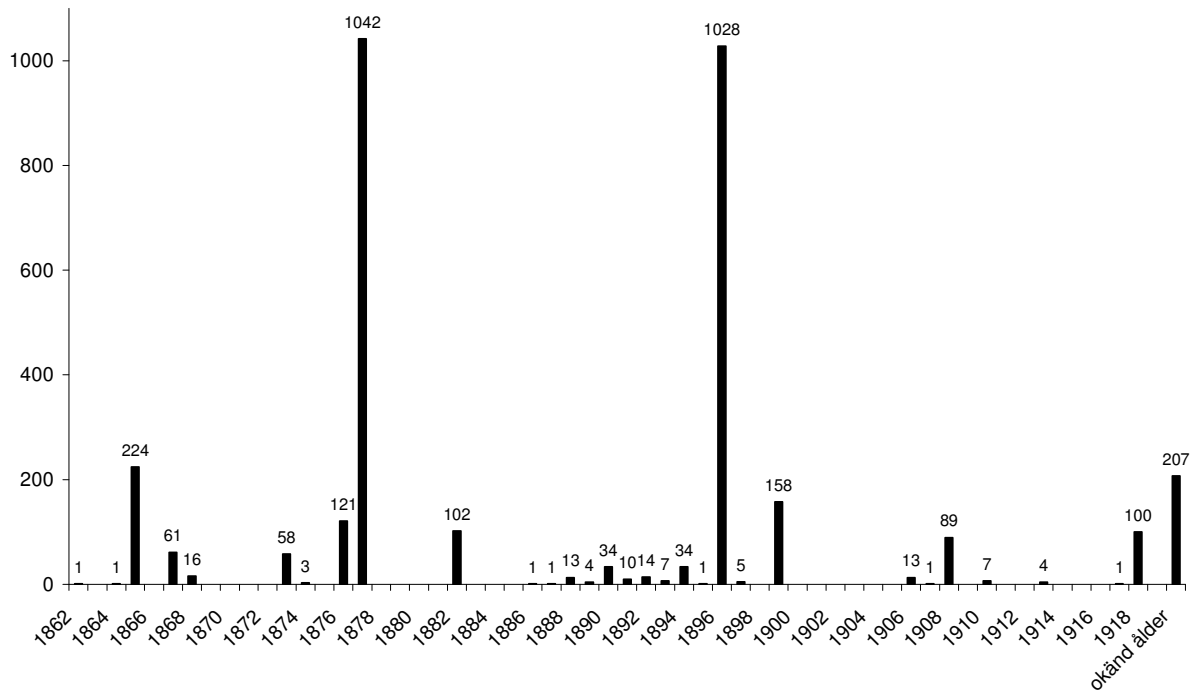
Frömaterial

En fullständig nyinventering av KSLA frösamling vid Nordiska museet har genomförts. Av de ursprungliga proven befanns mer än 70%, eller 3393 prov, vara bevarade och mestadels i gott skick. En grafisk sammanställning över samlingens innehåll återfinns i figur 1. Etthundra delprov togs ut ur samlingen för att analysera beträffande DNA kvalitet. Dessa prov representerar de tio vanligaste arterna – vete, korn, havre, råg, ärt, vicker, kålrot/rops, rödklöver, timotej och beta - samt ett span i ålder och ursprung . Som jämförelse har färskare prov av var art inkluderats i analysen. För en jämförande analys av ärtsorter har 16 sorter från frösamlingen jämförts med 21 sorter insamlade av POM och 11 gamla sorter bevarade vid Nordiska genbanken eller John Innes Institute (Tabell 1).

A



B



Figur 1. Antal bevarade prov i KSLA´s frösamling fördelat på A) art, B) ålder. I B) upptas endast de 16 vanligaste arterna. Ett mindre antal prov av ytterligare 566 arter ingår i samlingen.

DNAextraktion och analys

DNA extraherades med ett av två alternativa kommersiella kit: FastDNA Spin Kit från Qbiogene eller DNAeasy Plant Mini Kit från Qiagen. Inför extraktionen sönderdelades frömaterialet med en av fyra alternativa metoder: Mortling i flytande kväve, krossning mellan pappskivor, uppblötning en timme i extraktionsbuffer följt av manuell malning med 'Blue Tips' (SigmaAldrich) eller sönderdelning i provrör med Lysing Matrix A och ett FastPrep Instrument (Qbiogene). Från varje prov extraherades DNA från 30-70 mg frömateriale. Detta motsvarade material från ett frö av spannmålslagen, en frögyttring av beta, en kvarts till ett halvt frö av ärt och vicker, tio frön av raps/kålrot, 20 frön av rödklöver samt 50 frön av timotej.

För att uppskatta storleken på de extraherade DNAfragmenten utfördes gelelektrofores av extrakten tillsammans med storleksmarkörer på 1% agaros /TBE geler. DNA visualiserades mha av etidiumbromidfärgning och UVljus. Storleksbestämning utfördes med mjukvaran QuantityOne (BioRad).

PCR (polymerase chain reaction) utfördes för att se om det är möjligt att uppföröka DNA för specifika regioner i genomen. Uppförökningen gjordes av fragment av olika storlek från den s.k. ITS regionen av nukleärt ribosomalt DNA. Denna region valdes dels för att den innehåller konserverade sekvenser som gör att samma primers kan användas för alla växtarter, dels för att regionen förekommer i flera kopior per genom och därmed är lättare att amplifiera samt för att de amplifierade produkterna kan sekvenseras och jämföras med sekvens i databaser för att verifiera att produkten härstammar från det avsedda provet. Reaktionerna utfördes med primers ITS1+ITS4 resulterande i ett 650 bp fragment samt ITS5+ITS2 resulterande i ett 350 bp fragment (White et al., 1990). PCR amplifieringen gjordes i 20 µl reaktionsvolym bestående av 1 U Taq polymeras (Invitrogen), 1x Invitrogen buffer, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 µM var primer, 0,2 mM var dNTP and 0.5 µl DNA extrakt. Temperaturcyklning gjordes med 3 min initial denaturering vid 94°C, 35 cykler vid 94°C i 30 s, 52°C i 30 s och 72°C i 30 s samt ett slutligt elongeringssteg vid 72°C i 5 min. Amplifieringsprodukterna analyserades med gelelektrofores på 1,2% agarose /TBE geler och DNA visualiserades med etidiumbromidfärgning och UVljus.

Släktskapsanalys av ärtsorter

DNA från de 48 ärtsorterna (tabell 1) analyserades mha 14 mikrosatellitmarkörer enligt Loidon et al., (2005). Markörerna var AD73, AD147, AB71, AD83, AA200, AB109, AC58, AD79, AB141, AA278, AB128, AB122, AB130 och AD186. PCR utfördes enligt Loidon m fl. (2005) med semi-nestade primers där den nestade primern var inmärkt med fluoroforer, FAM eller HEX. Produkterna analyserades med kapilärelektrofores och konfokal laserscanning på en MegaBACE 500 (Amersham Biosciences). Som intern storleksmarkörer användes en 400 bp stege inmärkt med fluoroforen ROX. Storleksbestämning gjordes med mjukvaran MegaBACE Fragment Profiler 1.2. Beräkning av genetisk diversitet (Nei's genetic distances) och konstruktion av dendrogram genom UPGMA gjordes med mjukvaran POPGENE version 1.31 (<http://www.ualberta.ca/~fyeh/>).

Tabell 1. Ingående ärtsorter i genetisk släktskapsanalys med 14 SSR markörer. Förkortningar i accessionsnummer uttyds POM=material från Fröuppropet inom Programmet för odlad mångfald, JIC=material från John Innes Institute, Norwich, UK, NGB=material från Nordiska genbanken, KSLA=material från KSLAs historiska frösamling.

Namn	Acc nr	Ålder på frö
Biskopen	POM1	Färskt
Nusnäs	POM100	Färskt
Finas fina	POM103	Färskt
Örshult	POM104	Färskt
Demans	POM129	Färskt
Alunda	POM138	Färskt
Hilda	POM152.1	Färskt
Mors stora	POM153	Färskt
Kärra	POM184.1	Färskt
Stina	POM2	Färskt
Boaryd	POM26	Färskt
Mormor Hannas	POM31	Färskt
Svartbjörnsbyn	POM33	Färskt
Pjätteryd	POM34	Färskt
Vallagården	POM37	Färskt
Nybyggerud	POM43	Färskt
Norrhult	POM47	Färskt
Edsås	POM48	Färskt
Saga	POM69	Färskt
Farmor	POM78.2	Färskt
Bolum	POM78.6	Färskt
Champion of England	JIC1144	Färskt
Henderson´s first of all	JIC2247	Färskt
Gradus	JIC303	Färskt
Rapid	JIC662	Färskt
Fenomen	NGB101332	Färskt
Grå Kapuciner	NGB102084	Färskt
Victoria	NGB102201	Färskt
Buxbom de Grace	NGB102765	Färskt
Kelvedon Wonder	NGB102773	Färskt
Stensärt	NGB102775	Färskt
Kungsärt	NGB13148	Färskt
Grön stål	KSLA1215	1896
Rågärt	KSLA1217	1896
Lolländska Rosiner	KSLA1281	1896
Blågrön engelsk	KSLA1293	1896
Tysk moss	KSLA1294	1896
Grå, Bohuslän	KSLA1383	1896
Kapital II	KSLA1518	1918
Svalövs gröpärt	KSLA1523	1918
Fürst Bismarck	KSLA1537	1918
Fairbeards Nonpareil	KSLA1541	1918
Non plus ultra	KSLA1548	1918
Engelsk Sabel	KSLA1551	1918
Witham Wonder	KSLA1555	1918
Golden Drop	KSLA1836	1865
Kron-ärter	KSLA2316	1877
Daniel O´Rourkes	KSLA2335	1877

Resultat

DNAextraktion från gammalt frömaterial

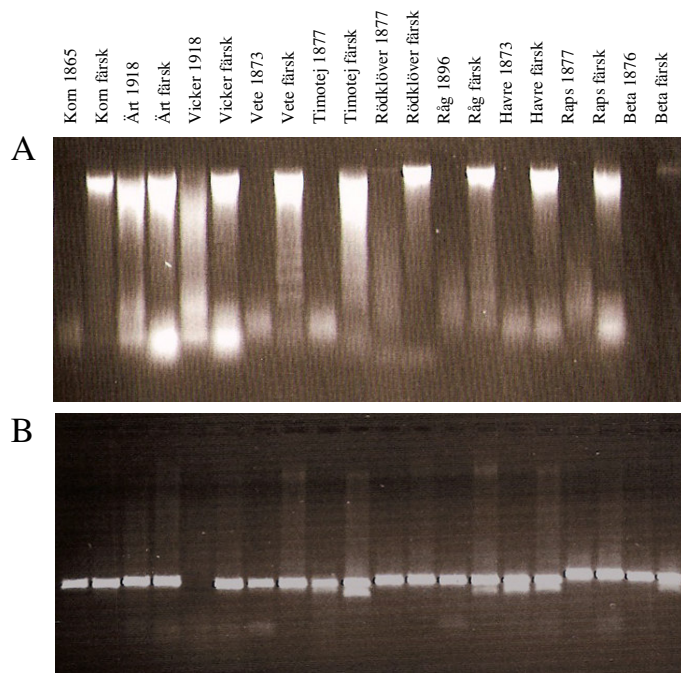
Två kommersiella kit för DNA extraktion från växtmaterial testades. Ingen skillnad kiten emellan kunde noteras. Viktigare för utbyte av kvalitet och mängd DNA var metodval för sönderdelning och lysering av frömaterial. Tre faktorer måste särskilt beaktas vid sönderdelning av växtmaterial: 1) Tillräcklig finfördelning, 2) Minimerad risk för kontamination av och mellan prov, 3) Tideffektivitet för att möjliggöra storskalig analys. De olika testade metoderna sammanfattas i tabell 2. Dyrast, men också överlägset effektivast är finfördelning med FastPrep och Lysis Matrix.

Tabell 2. Jämförande analys av olika metoder att söndela gammalt frömaterial inför DNA-analys.

	Finfördelning	Kontaminationsrisk	Tidseffektivitet	Kostnad
Krossning mellan papper	Dålig	medel	Måttlig	låg
Mortling i flytande kväve	Bra	medel	Dålig	låg
Uppmjukning + 'Blue tip'	Måttlig	Låg	Måttlig	låg
FastPrep	mycket bra	låg	Hög	hög

Utbyte och kvalitet av DNA från de olika proven varierade stort. Ålder på proven inom det undersökta spannet (1862-1918) hade härvid mindre betydelse utan störst skillnader noterades emellan de olika arterna. Ärt gav störst utbyte med högst andel högmolekylärt DNA. Även vicker gav stort utbyte DNA som var måttligt degraderat. Klöver och raps/kålrot gav litet utbyte och tämligen degraderat DNA. Spannmålsslagen och timotej gav litet utbyte och mycket degraderat DNA. Beta gav sämst utbyte DNA som dessutom var mycket degraderat. Exempel på gelelektrofores där DNA från färska och gamla fröprov jämförs ges i figur 2A. Från ett par delprov, alla från en delsamling donerad av *Vilmorin et Andrieux* 1908, kunde inget DNA detekteras. Dessa prov har antagligen vid något tillfälle värmebehandlats eller behandlats med kemikalier vilket totalt förstört DNAt.

Trots den stora andelen mycket fragmenterat DNA i proverna var det möjligt att specifikt uppföröka delar av DNA med PCR i det stora flertalet prov. Figur 2B visar exempel på PCR-produkter uppförökade från samma prov som visas i figur 2A. På grund av den låga DNA-kvaliteten (lågt kopietal och hög fragmenteringsgrad) kan dock PCRanalyser kräva särskild omsorg. Ett par faktorer kunde i synnerhet identifieras såsom viktiga: 1) Extra noggrannhet för att undvika kontamination i pre-PCR stegen inklusive negativa kontroller i alla steg, 2) Primers bör designas med särskild avsikt för att undvika formering av "primerdimer". 3) Individuell anpassning av mängd templatDNA i reaktionerna från olika prov för att balansera mellan tillräcklig mängd DNA och tillräckligt lite PCRinhibitorer. Sammanfattningsvis måste ändå materialet i KSLAs frösamling betraktas ha mycket hög kvalitet för sin ålder. Text visade en liknande studie av frön i motsvarande ålder från USA på avsevärt sämre DNAkvalitet (Walters m fl., 2006).

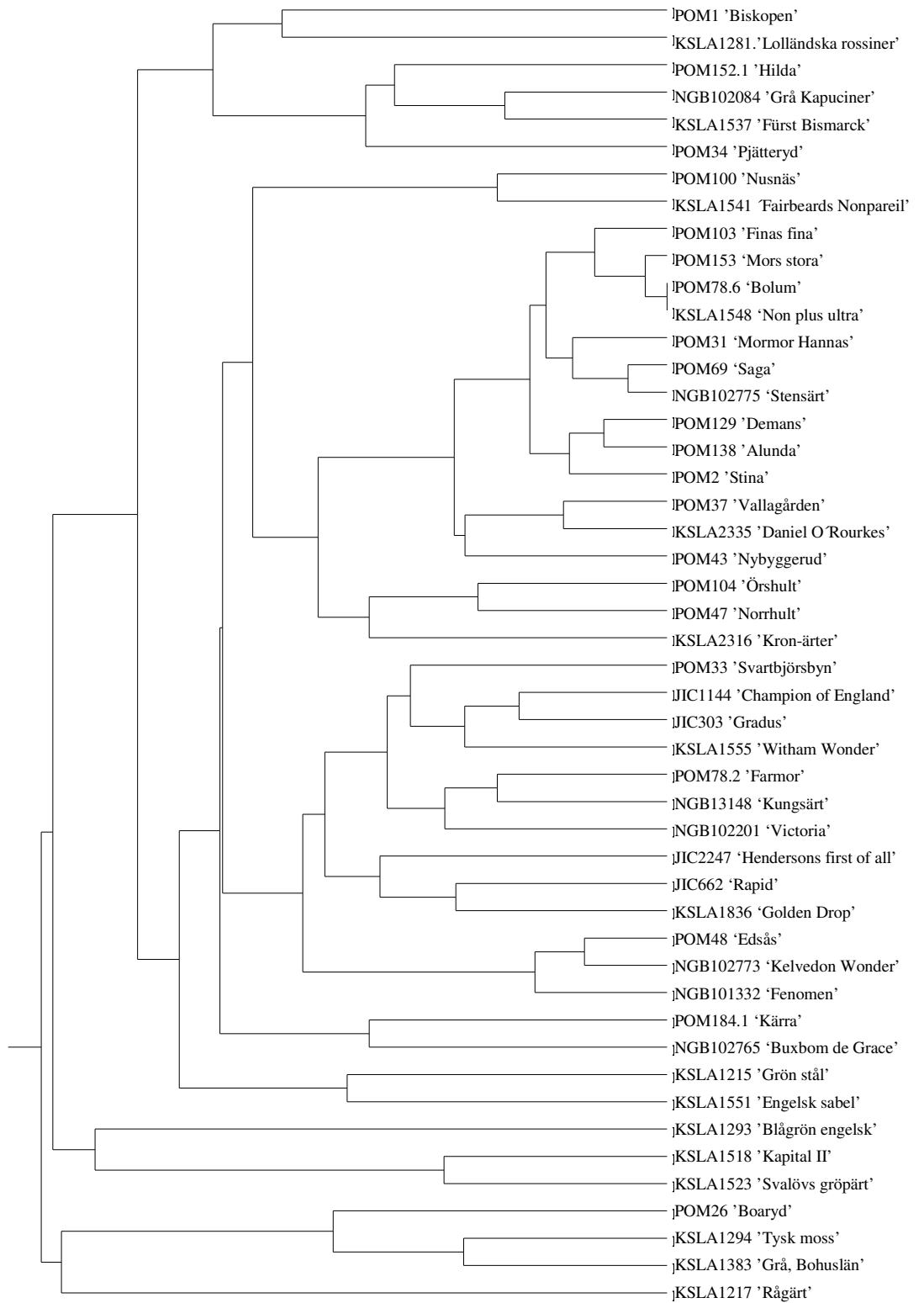


Figur 2. DNAkvalitet i färska och gamla fröprov A) Gelelektrofores av DNA. B) Gelelektrofores av PCR-produkter efter uppförökning med primers ITS2+ITS5. Samma prov som i A). Uppförökning var här möjlig i alla fall utom för vicker, troligen p g a för mycket PCRinhibitorer i provet.

Genetiskt släktskap mellan ärtsorter

För att utvärdera om material från frösamlingen kan användas som referensmaterial i genetiska släktskapsanalyser med material med annat ursprung genomfördes en analys av ärtsorter. Ärt var den art som hittades i störst utsträckning inom POM's "fröupprop" och därför av särskilt intresse. 21 sorter från "Fröuppropet" med äldst dokumenterad odlingshistoria valdes ut för analysen. De flesta av dessa sorter finns beskrivna av Nygårds (2005, 2007). Vidare medtogs 11 identifierade sorter som bevarats vid NGB eller John Innes Institute. Dessa sorter valdes på bas av förekomst i frökataloger äldre än 1920 (Svensson, 2004). Sluligen medtogs 16 sorter från KSLAs frösamling. Frösamlingen upptar mestadels sorter som odlats inom lantbruket, särskild vikt lades dock här på att välja sorter som odlats i trädgårdar då dessa bättre motsvarar materialet från POM. Sorterna från frösamlingen finns inte representerade i NGBs eller John Innes samlingar och är därför i de flesta fall troligen utdöda.

Mikrosatelliter analyserades från 14 loci och ett dendrogram för genetisk likhet konstruerades (figur 3). Analysen kommer att kompletteras i ett par fall varför dendrogramet ännu är preliminärt. Studien visade på stor variation mellan ingående sorter från alla tre grupper av sortmaterial. Sorterna från de tre grupperna är också jämt fördelade i dendrogramet och därför inte närmre besläktade med varandra inom grupperna än i övrigt. De ingående sorterna från Fröuppropet är sinsemellan mestadels genetiskt olika. Detta bekräftar resultaten från den tidigare molekylära analysen av ärtor från Fröuppropet (Kolodinska Brantestam m fl., 2006) och kan i några fall ytterligare skilja eventuella duplikat åt. Vidare är de flesta sorter säkert åtskiljbara från äldre sorter bevarade i NGB och John Innes Institute. Sammanfattningsvis tyder detta på att sortmaterialet av ärt insamlat i Fröuppropet är unikt och representerar delar av vad som troligen varit en närmast ofattbar sortriktedom för runt 100 år sedan.



Figur 3. Dendrogram baserat på preliminära resultat från mikrosatellitanalyser.

I några fall hittas närmare släktskap mellan sorter. T.ex så återfinns flera gråärter respektive mörkärter eller spritärter i samma kluster. Särskilt intressanta är sorterna 'Bolum' från Fröuppropet och 'Non plus ultra' från KSLAs frösamling som är genetiskt identiska. Bägge dessa är högvuxna mörkärter och det är troligt att Bolum är synonymt med Non plus ultra. Sorten 'Vallagården' från Fröuppropet är huvudsakligen genetiskt identisk med sorten 'Daniel O'Rourke'. Skillnaden här beror på tre markörer som inte kunnat fastställas i det mycket degraderade DNA:t från den sistnämnda sorten. För de övriga markörerna är de två accessionerna identiska. Vallagården och Daniel O'Rourke är bägge högvuxna spritärter och nya analyser av saknade markörer kommer förhoppningsvis kunna fastställa om sorterna är synonyma.

Slutsatser

Frömaterial i KSLAs frösamling utgör en värdefull resurs som genetiskt referensmaterial. Trots att sorterna är döda och har kraftigt degraderat DNA är det möjligt att med PCR använda materialet i genetiska släktskapsundersökningar. Materialets natur gör dock att särskild omsorg vid extraktion och uppförkning är nödvändig. Pilotstudien av ärtsorterna visar dels på att materialet från Fröuppropet är genetiskt särskiljbart och därför potentiellt värdefullt som genetisk resurs, dels på att det går att identifiera förmodat utdöda historiska sorter i fröuppropsmaterialet med hjälp av det historiska växtmaterialet från frösamlingen som referens.

Referenser

Kolodinska Brantestam, A., Khairullilina, A. & Wedelsbäck Bladh, K. (2006) Molekylära analyser av ärtor. Slutrapport POM/SJV.

Loridon K., McPhee K., Morin J., Dubreuil P., Pilet-Nayel M.L., Aubert G., Rameau C., Baranger A., Coyne C., Lejeune-Hénaut I. & Burstin J. 2005. Microsatellite marker polymorphism and mapping in pea (*Pisum sativum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **111**, 1022-1031.

Nygårds, L. 2005. Vi odlade till husbehov. – Centrum för biologisk mångfald, Alnarp

Nygårds, L. 2007. Om ärtor. CBM:s skriftserie 17 – Centrum för biologisk mångfald, Alnarp

Svensson, K. 2004. Trädgårdsärt och trädgårdsböna. Kartläggning av de i Sverige marknadsförda sorterna 1850-1970. Examensarbete inom trädgårdsingenjörsprogrammet 2004:2, SLU, Alnarp.

Walters, C., Reilley, A.A., Reeves, P.A., Baszczak, J. and Richards, C.M. (2006) The utility of aged seeds in DNA banks. *Seed Science Research* **16**, 169-178.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J.W. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 I *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, Inc., New York.