

Resultat af Ærtforsøg 2010

Ved et kursus på Institut for Jordbrug og Økologi, KU Life, blev dette ærtforsøg gennemført, med undervisning af Gunter Backes og Jihad Orabi.

Skrevet af Søren Holt

Frøsamlerne 2010

Udgangspunkt:

Vores spørgsmål og ærtesorter

Til sammenligning af forskellige portioner af Store Holgers Kæmpeært,- og til sammenligning af Store og Lille Holgers Kæmpeært:

- No. 7 - store Holgers Kæmpeært, Mogens Thomsen (PØ)
- No. 8 - store Holgers Kæmpeært, Dorthe Hougaard (PØ)
- No. 9 - store Holgers Kæmpeært, Jens Agner Christiansen (PØ)
- No. 10 - store Holgers Kæmpeært, Ida Soer Johannessen
- No. 11 store Holgers Kæmpeært, Jørgen Kristensen
- No. 12 lille Holgers Kæmpeært, Ida Soer Johannessen
- No. 13 lille Holgers Kæmpeært, Jørgen Kristensen

Til sammenligning af Store Holgers Kæmpeært og Holger-lignende ærter:

- No. 14 Faster Kirstens høje ært, Nanna Fyhn
- No. 17 HKH Chr. d. X's Hofært, Molly Hougaard

Til "analyse" af grobundens indvirken på sorten:

- No. 22 Amandas høje ært (dyrket på lerjord), Ulla Vester
- No. 23 Amandas høje ært (dyrket på sandjord), Elsa Krogh

For at undersøge om Frederik d. 7.'s ært er gammel:

- No. 16 HKH Frederik d. 7's ært, Molly Hougaard

Til sammenligning af andre høje ærter:

- No. 3 Lokalsort fra Stevns NGB13919.1, NordGen
- No. 4 Stevns høje ært, Nanna Fyhn
- No. 5 Videmoseært NGB11759.3, NordGen
- No. 6 Videmoseært, Søren Holt
- No. 15 Gyrithes høje ært, Ida Soer Johannessen
- No. 18 Stangært fra Fyn FS 554, NO Crossland
- No. 19 Grams høje ært, Søren Holt
- No. 20 Maries høje ært FS 240, Søren Holt
- No. 21 Juttas høje ært, Søren Holt
- No. 24 Juttas høje ært, Elsa Krogh
- No. 28 Høj ært fra Susie, Elsa Krogh
- No. 29 Karls høje ært, Karen Bredahl

Til undersøgelse af nogle gråærter/til sammenligning af ærter med farvede blomster:

- No. 25 Brun Ært fra Nakskov, Molly Hougaard
- No. 26 Errindlev ært, Søren Holt
- No. 27 Lollandske rosiner, Søren Holt

Kontrolærter (sikre en genetisk spredning i vores materiale):

- No. 1 Jærert NGB11149, NordGen
- No. 2 Julita NGB9927.3, NordGen

Andre ærter(udfyldte ledige pladser i vores undersøgelse):

- 30 Std_1-6, (Gråært NGB11737) Institut for Jordbrug og Økologi
- 31 Std_9-5, (Maglaby gråært NGB14154) Institut for Jordbrug og Økologi
- 32 Std_51-2, (Puggor från Ballingslöv-Glimåkra NGB17873) Institut for Jordbrug og Økologi

Store Holgers Kæmpeært og Lille Holgers Kæmpeært har vi medtaget fra flere kilder, da vi ville undersøge, om de var forskellige, og undersøge, om de forskellige kilder havde reelt afvigende ærter.

Amandas høje ært medtog vi fra to kilder, da vi ville se, om de var gledet fra hinanden gennem årene hvor de var dyrket på meget forskellig jordbund.

Juttas høje ært blev medtaget to gange, lidt af en tilfældighed – det skulle vise sig at være interessant.

Andre sorter er kun medtaget én gang.

Metode:

Undersøgelse af mikrosatellitterne:

A9 – D21 – AC58 – C20 – AA5 – AC75

Disse mikrosatellitter er meget stereotype områder på DNA-strengen, bestående af kun to baser (A, T, C eller G), der under kopiering af DNA en gang imellem bliver dupliseret et antal ekstra gange. Hvor mange gange er ofte forskelligt fra sort til sort – dvs. at dette område kan være af forskellige længde. Disse mikrosatellitter eller SSRs tilhører en gruppe markører, der ikke så vidt man ved har nogen mening for organismen og ikke markerer et gen- så de fortæller os ikke noget om vores sorter. Men de er gode til at skelne mellem beslægtede sorter.

Vi arbejdede i 4 grupper. Hver gruppe isolerede DNA fra op til 8 ærtesorter (Quick & dirty isolation of genomic DNA with NaOH (ætsnatron)), i alt 29 sorter, idet 30 Std_1-6, (Gråært NGB11737), 31 Std_9-5, (Maglaby gråært NGB14154) og 32 Std_51-2 (Puggor från Ballingslöv-Glimåkra NGB17873) allerede lå klar på Institut for Jordbrug og Økologi. Små stykker blade blev kølet ned for at hæmme de naturlige enzymer, der ville nedbryde DNA'et, før vi kunne gøre det. En natronlud fortynding blev tilsat, og blandingen kogt 1 minut. Derefter findeltes blandingen med enden af en tynd plasticstav, en buffer blev tilsat for at neutralisere ætsnatron og blandingen blev centrifugeret. Nederst samlede bladrestene sig i et grønt område, ovenpå flød DNA materialet i en klar væske. Prøver blev samlet af den klare væske med isoleret DNA til næste trin, så vi nu havde isoleret DNA fra alle 32 ærtesorter. Prøverne opbevarede på is.

I næste trin arbejdede alle grupper med isoleret DNA fra hver af de 32 sorter. Gruppe 1 og 3 opformerede mikrosatellitterne A9, D21 og AC58. Gruppe 2 og 4 opformerede mikrosatellitterne C20, AA5 og AC75.

For at opformere mikrosatellitterne blev det isolerede DNA tilsat primer, som man i forvejen vidste ville binde sig til DNA strengen før og efter den aktuelle mikrosatellit, og et enzym, Taq-DNA-Polymerase, som kopierede mikrosatellitten startende fra primeren. Forskellige hjælpestoffer tilsættes for at tilføre den nødvendige energi, indfarve mikrosatellitterne henholdsvis blå, grøn og gul, og holde den rigtige surhedsgrad. Herefter foregår opformeringen gennem omkring 40 cykliske temperaturændringer i en PCR maskine.

Ved 94°, hvor DNA-strengen adskilles,

64-55°, hvor primeren binder til DNA-strengen, og

72°, hvor Taq-DNA-Polymerase kopierer DNA-strengen fra primeren og frem (mikrosatellitten kopieres).

Ved de gentagne temperaturskift fik vi opformeret de udvalgte mikrosatellitter eksponentielt. De første gentagelser gav kun ganske lidt materiale, men for hver gentagelse var der mere materiale at kopiere. Derefter centrifugeres. Nu havde vi for hver sort to prøverør med hver mikrosatellit, i alt $2 \times 6 \times 32 = 384$ prøverør.

I sidste trin skal hver mikrosatellit sorteres efter længde. I kapillærrør med polymer gel laves et elektrisk spændingsfelt, der får de negativt ladede mikrosatellitter til at vandre op gennem røret. Korte molekyler slipper hurtigere gennem gelen end de lange. Der sker en sortering, som registreres af en fotocelle, der registrerer farven på mikrosatellitten.

Hver gruppe blander sine 3 indfarvede mikrosatellitter i et prøverør for hver ærtesort. Så spares der tid i sorteringsprocessen, og pga. farverne kender fotocellen forskel på mikrosatellitterne. Der er også tilsat en rød indfarvet prøve med molekyler af kendt længde. De angiver en skala for molekylestørrelsen, så vi ender med et resultat, hvor vi for de forskellige ærtesorter har hver mikrosatellits molekylestørrelse.

Resultat:

C20 og AA5 udgår. Den ene farvede ikke, så vi fik ikke resultat fra den. Den anden viste ingen variation, alle ærter havde den samme variant, den kunne ikke skelne mellem ærtesorterne.

Acc.	A9	A9	AC58	AC58	D21	D21	AC75	AC75
01_Jærert	385	385	230	230	282	282	287	287
02_Julita	383	383	236	236	298	298	281	281
03_Lokals	383	383	236	236	294	294	281	281
04_Stevns	383	383	236	236	294	294	281	281
05_Videmo	383	383	236	236	298	298	281	281
06_Videmo	383	383	236	236	298	298	281	281
07_store	383	383	236	236	294	294	281	281
08_store	383	383	236	236	294	294	281	281
09_store	383	383	236	236	294	294	281	281
10_store	383	383	236	236	294	294	281	281
11_store	383	383	236	236	294	294	281	281
12_lille	383	383	236	236	294	294	281	281
13_lille	383	383	236	236	294	294	281	281
14_Faste	383	383	226	226	294	294	281	281
15_Gyrit	383	383	260	260	294	294		
16_HKH_F	403	403	236	236	298	298	279	279
17_HKH_C	383	383	236	236	294	294	281	281
18_Stang	403	403	260	260	302	302	279	279
19_Grams	383	383	236	236	298	298	281	281
20_Marie	383	383	236	236	294	294	281	281
21_Jutta	403	403	260	260	294	294	279	279
22_Amand	387	387	260	260	248	248	281	281
23_Amand	387	387	260	260	248	248	281	281
24_Jutta	383	383	236	236	294	294	285	285
25_Brun_Æ	385	385	220	220	248	248	281	281
26_Errin	405	405	230	230	227	227	275	275
27_Lollan	385	385	220	220	248	248	281	281
28_Høj_ær	383	383	236	236	294	294	281	281
29_Karls	387	387	236	236	302	302	279	279
30_Std_1-6	383	383	236	236	298	298	281	281
31_Std_9-5	383	383	220	236	294	294	281	281
32_Std_51-2	379	379	226	226			285	285

Tabel 1

Tallene angiver længden af mikrosatellitterne, altså antal gange baseparret gentages.

Ærterne 15 Gyrites høje ært og 32 Std_51-2 mangler hver data fra én mikrosatellit, sandsynligvis fordi primeren ikke kunne binde, pga. variation i DNA strengen umiddelbart før mikrosatellitten.

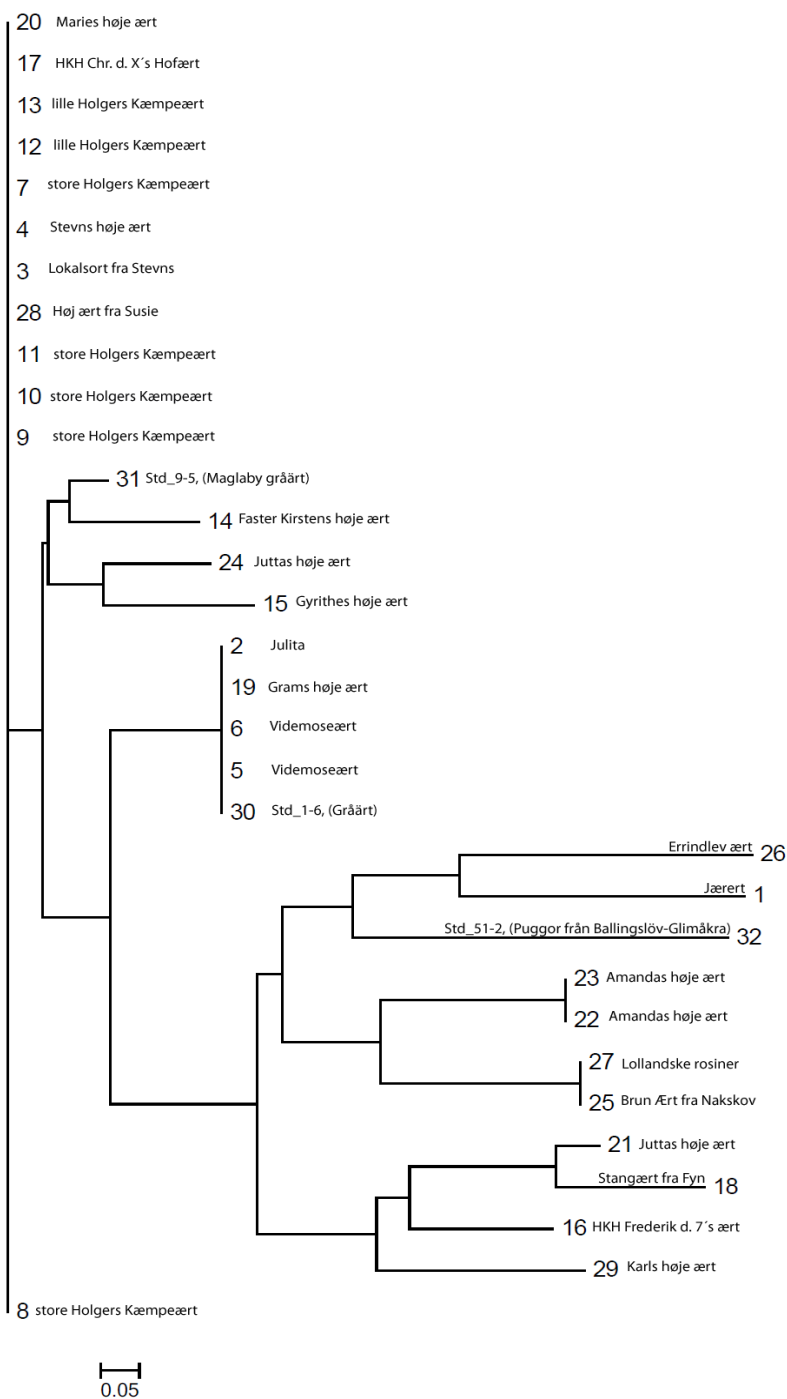
31 Std_9-5, (Maglaby gråært) viser uforventet variation i mikrosatellitten AC58, Det kan skyldes variation i sorten, som af NordGen angives som landrace, og at de to prøver er taget fra to forskellige individer. Kigger man på foto af frøene i NordGens database SESTO ser man også tydelig variation i farvemønstret på ærterne, noget der normal er arveligt.

Det er umiddelbart svært at overskue data i tabelform. Det er muligt at bearbejde data matematisk på forskellig vis, så man får en mere visuel præsentation.

Først et dendrogram. (figur 1)

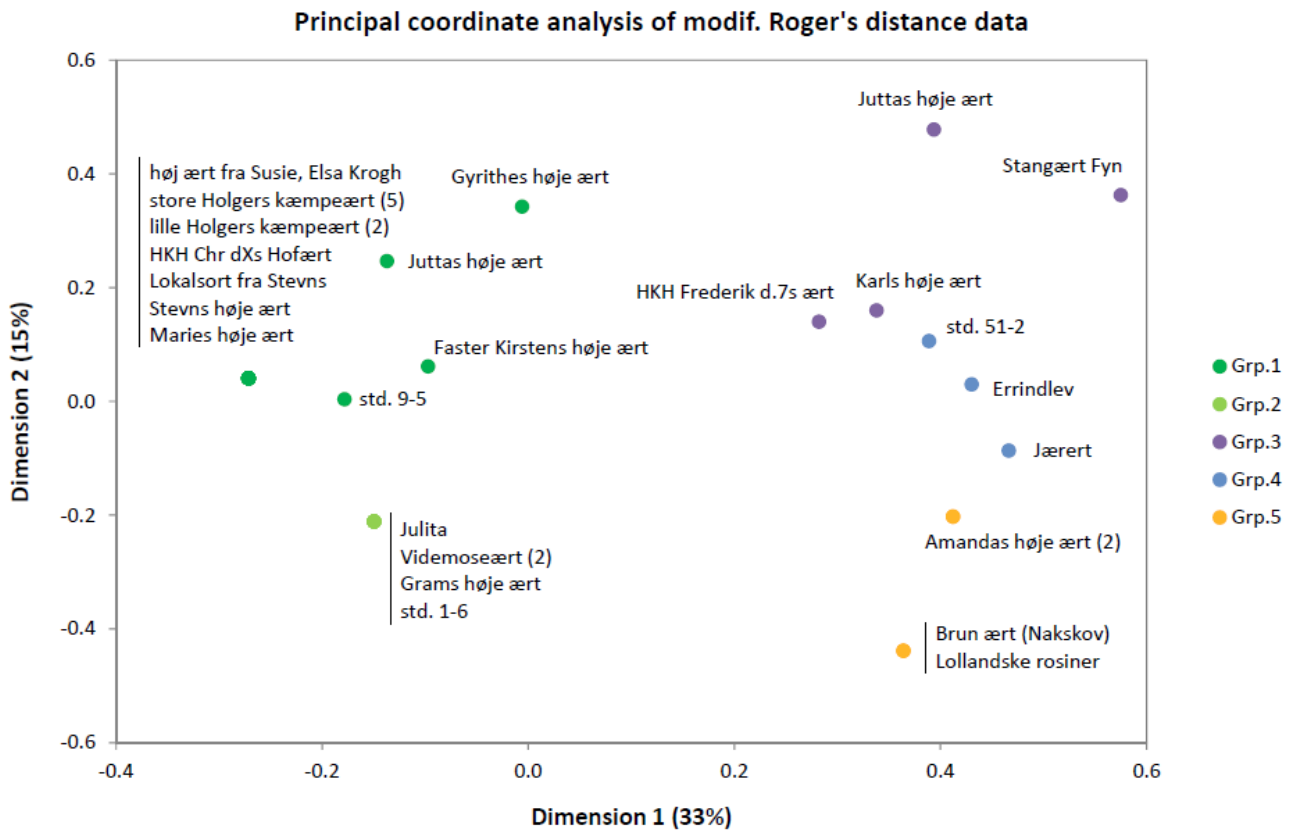
Det er baseret på afstanden mellem sorterne. Det bygges hierarkisk op, først findes de to nærmeste. Derefter slås deres to linier sammen til én linie, og de behandles derefter som én samlet enhed. Igen findes de to nærmeste, som derefter slås sammen osv.

Man skal være opmærksom på, at det på ingen måde kan læses som et stamtræ!



Figur 1

En anden måde at visualisere afstande er at lave en hovedkoordinat-analyse, sat op i to dimensioner.



Figur 2. Hovedkoordinat-Analysen

På ovenstående figur 2 vises, hvordan ærterne fordeler sig i to dimensioner. Dimensionerne er matematiske måder at udtrykke flere uafhængige variationer i et samlet billede. Det er altså ikke så præcist, som de eksakte tal for mikrosatelliternes længde. Til gengæld giver det et visuelt billede vi mennesker lang hurtigere kan overskue. Nogle vil også foretrække denne fremstilling frem for dendrogrammet.

Dimension 1 forklarer mere af forskellen mellem sorterne, end dimension 2. Farverne henviser til en opdeling i 5 grupper.

Grupperinger

Det giver mening at gruppere ærterne.

2 grupper er den sikreste opdeling, men 5 grupper er også rimeligt.

Ved en opdeling i 2 grupper, hvor gruppe 1 og 2 på ovenstående figur 2 udgør den ene, og gruppe 3-5 udgør den anden gruppe, fås en meget klar opdeling, hvor alle ærter i hver gruppe ligger tættest på ærter fra egen gruppe. Det er en højre-venstre opdeling, der følger dimension 1.

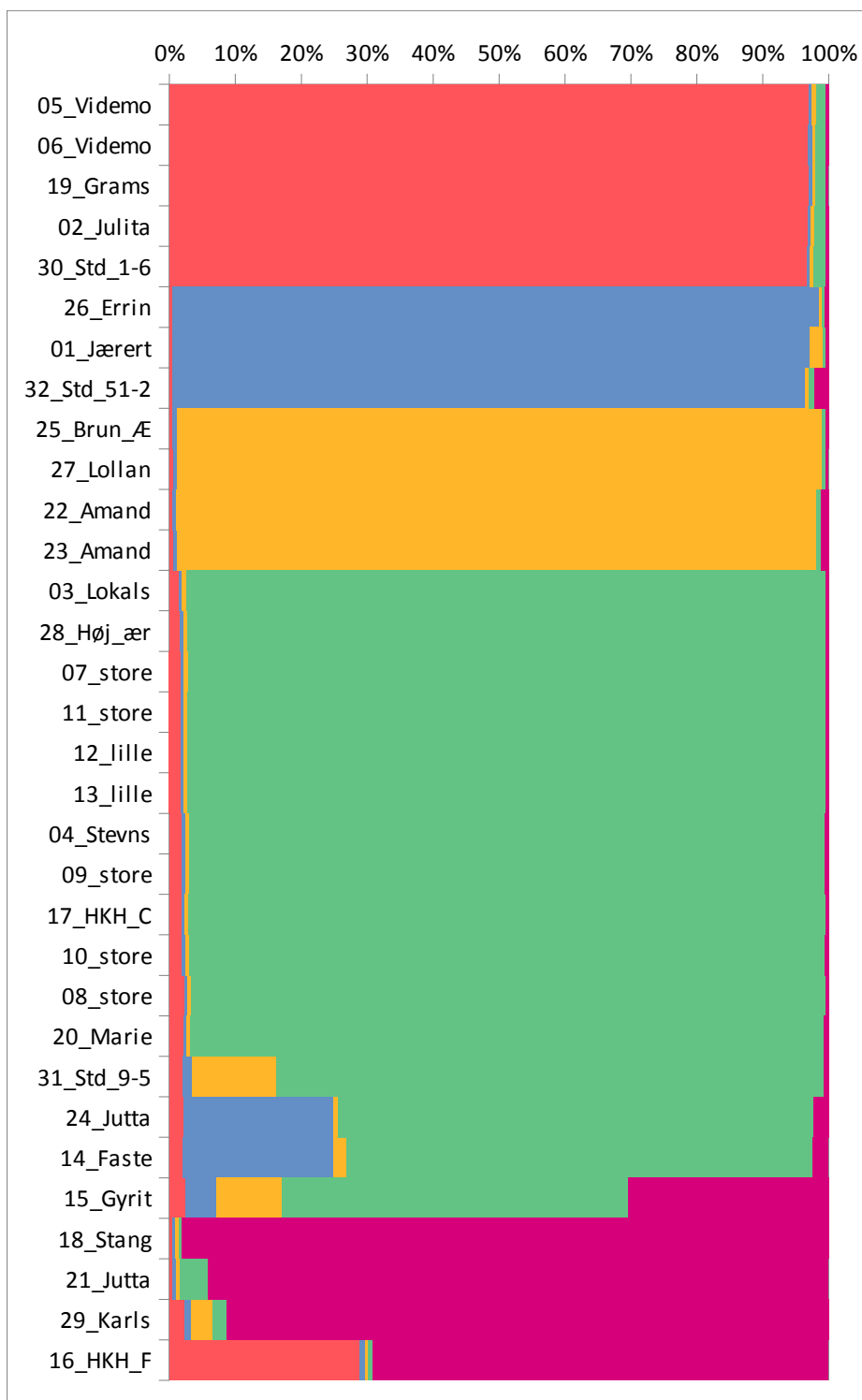
Ved opdeling i 5 grupper ser vi nogle pudsigheder, hvor f.eks. Amandas høje ært ligger tættere på Jærert, end de andre ærter i egen gruppe. Denne opdeling i 5 grupper er altså ikke lige så indlysende, som inddelingen i 2 grupper. Der sker dog ikke nogle helt overraskende ting.

Som frøsamler kan man nok også se en rimelighed i opdelingen i 7 grupper, fordi vi så får adskilt Amandas høje ært fra de to lollandske markærter, Brun ært fra Nakskov og Lollandske rosiner. På den anden side sker der noget underligt, og ikke troværdigt, med Std_51-2 (Puggor från Ballingslöv-Glimåkra), der så bliver grupperet med Faster Kirstens høje ært og No.24 Juttas høje

ært. Vores undervisere er ud fra vores data alene ikke tilbøjelige til at acceptere en opdeling i 7 grupper, men gør opmærksom på hvor stærk en opdeling i 2 grupper er, og at 5 grupper også kan accepteres

Bemærk, at ærternes placering på ovenstående figur er uafhængig af hvor mange grupperinger vi laver.

Ved en opdeling i 5 grupper, kan det kan sættes op som i nedenstående figur 3. Dette er en anden måde at visualisere variationen i vores ærter.



Figur 3

Gr.1: Grøn på figur 3. Gyrithes høje ært, Faster Kirstens høje ært, No.24 Juttas høje ært og 31 Std_9-5 (Maglaby gråært) er tydeligt forskellige fra hinanden og andre. De andre viser ikke tegn på at være forskellige, der må vi se på deres fænotyper (de egenskaber i planten, der stammer fra dens arveanlæg og kan observeres når vi dyrker den). Store og Lille Holger er ikke til at skelne fra hinanden, så Lille Holger er nok en variation af Store Holger, ikke en indblanding af en anden sort.

Gr.2: Korallrød på figur 3. Disse viser ikke tegn på at være forskellige, der må vi se på deres fænotyper. Det er rimeligt at antage, at de to Videmoseært er identiske.

Gr.3: Mørk rød. De er alle forskellige fra hinanden og andre.

Gr.4: Blå. De er forskellige fra hinanden og andre.

Gr.5: Gul. De to lollandske gråærter med store frø viser ikke tegn på at være forskellige, der må vi se på deres fænotyper.

De to Amanda viser ikke tegn på at være forskellige. Heldigvis.

21 Juttas høje ært og 24 Juttas høje ært burde være ens, men det er de slet ikke, og ingen af dem kan være identiske med andre af ærterne i forsøget. Det bør undersøges nærmere, f.eks. ved at se på fænotype.

De mulige grupperinger kan også sætte op i på følgende måde. (Tabel 2)

2 grupper	5 grupper	7 grupper	
store Holgers Kæmpeært (5) lille Holgers Kæmpeært (2) HKH Chr. d. X's Hofært Lokalsort fra Stevns Stevns høje ært Maries høje ært Std_9-5 (<i>Maglaby gråært</i>) Gyrithes høje ært Høj ært fra Susie FASTER KIRSTENS høje ært No.24 Juttas høje ært Julita Videmoseært (2) Grams høje ært Std_1-6, (<i>Gråært</i>)	store Holgers Kæmpeært (5) lille Holgers Kæmpeært (2) HKH Chr. d. X's Hofært Lokalsort fra Stevns Stevns høje ært Maries høje ært Std_9-5 (<i>Maglaby gråært</i>) Gyrithes høje ært Høj ært fra Susie FASTER KIRSTENS høje ært No.24 Juttas høje ært	store Holgers Kæmpeært (5) lille Holgers Kæmpeært (2) HKH Chr. d. X's Hofært Lokalsort fra Stevns Stevns høje ært Maries høje ært Std_9-5 (<i>Maglaby gråært</i>) Gyrithes høje ært Høj ært fra Susie FASTER KIRSTENS høje ært No.24 Juttas høje ært Std_51-2, (<i>Puggor från Ballingslöv-Glimåkra</i>)	
	Julita Videmoseært (2) Grams høje ært Std_1-6, (<i>Gråært</i>)	Julita Videmoseært (2) Grams høje ært Std_1-6, (<i>Gråært</i>)	Julita Videmoseært (2) Grams høje ært Std_1-6, (<i>Gråært</i>)
No.21 Juttas høje ært Stangært fra Fyn HKH Frederik d. 7's ært Karls høje ært Std_51-2, (<i>Puggor från Ballingslöv-Glimåkra</i>) Errindlev ært Jærert Amandas høje ært (2) Brun Ært fra Nakskov Lollandske rosiner	No.21 Juttas høje ært Stangært fra Fyn HKH Frederik d. 7's ært Karls høje ært	No.21 Juttas høje ært Stangært fra Fyn HKH Frederik d. 7's ært Karls høje ært	
	Std_51-2, (<i>Puggor från Ballingslöv-Glimåkra</i>) Errindlev ært Jærert	Errindlev ært Jærert	Errindlev ært Jærert
	Amandas høje ært (2) Brun Ært fra Nakskov Lollandske rosiner	Amandas høje ært (2) Brun Ært fra Nakskov Lollandske rosiner	Amandas høje ært (2) Brun Ært fra Nakskov Lollandske rosiner

Tabel 2

Bemærk, hvordan Std_51-2, (*Puggor från Ballingslöv-Glimåkra*) lave et gevaldigt krumspring fra 5 grupper til 7 grupper.

Svar på vores spørgsmål

Til sammenligning af forskellige portioner af Store Holgers Kæmpeært,- og til sammenligning af Store og Lille Holgers Kæmpeært:

Vi fandt ingen forskel imellem de forskellige portioner af Store- og Lille Holger.

Til sammenligning af Store Holgers Kæmpeært og Holger-lignende ærter:

14 Faster Kirstens høje ært er forskellig fra alle andre ærter i forsøget.

17 HKH Chr. d. X's Hofært viser ikke tegn på at være forskellig fra Holger ærterne.

Til "analyse" af grobundens indvirken på sorten:

Vi fandt ingen forskel mellem Amanda fra sandjord og fra lerjordsdyrkning gennem en længere årrække.

For at undersøge om Frederik d. 7.'s ært er gammel:

16 HKH Frederik d. 7's ært er forskellig fra alle andre undersøgte ærter, men om den er gammel kan vi ikke vide ud fra denne undersøgelse.

Til sammenligning af andre høje ærter:

Det lykkedes at sammenligne mange høje gamle ærter, og få dem grupperet på en meningsfuld måde. Det er også blevet klart, hvilke der er unikke, og hvilke der måske er samme sort med forskellige navne og kulturhistorie, og derfor bør undersøges nærmere med andre metoder.

Til undersøgelse af nogle gråærter/til sammenligning af ærter med farvede blomster:

26 Errindlev ært er forskellig fra de andre undersøgte ærter.

25 Brun Ært fra Nakskov og 27 Lollandske rosiner viser ikke tegn på at være forskellige, men der kan være fænotypiske forskelle at finde.

Bemærk i øvrigt, at gråærterne er fordelt over de fleste grupper!

Der er altså sorter, som vi nu ved er forskellige fra alle andre.

Der er også grupper af sorter, hvor vi bør undersøge, om vi f.eks. kan finde fænotypiske forskelle.

Det er en stor fordel, at det nu er klart afgrænset, hvilke sorter der skal sammenlignes ved f.eks.

dyrkningsforsøg. Der er nok også sorter, der er identiske med hinanden. Det er dog ikke noget der kan afklares ved dette forsøg, som kun egner sig til at finde forskelle i de 4 områder

(mikrosatellitter) vi fik brugbare resultater fra. Om de er identiske i mange flere mikrosatellitter kan vi ikke vide, før vi laver et nyt forsøg!

Tak til Gunter Backes og Jihad Orabi, både for det gode kursus, og for materialet efterfølgende. De har også leveret alle tabeller og figurer, undtagen tabel 2.