



PLANT RESEARCH INTERNATIONAL

Indicatie genetische variatie hoofdrassen paprika ten behoeve van verbetering uniformiteit

Verslag van een pilot-studie

M.J.M. Smulders, W.P.C. van 't Westende, J. van der Schoot, B. Vosman

Plant Research International B.V., Wageningen
Januari 2004

© 2004 Wageningen, Plant Research International B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Plant Research International B.V.

Exemplaren van dit rapport kunnen bij de (eerste) auteur worden besteld. Bij toezending wordt een factuur toegevoegd;
de kosten (incl. verzend- en administratiekosten) bedragen € 50 per exemplaar.

Plant Research International B.V.

Adres : Droevendaalsesteeg 1, Wageningen
: Postbus 16, 6700 AA Wageningen
Tel. : 0317 - 47 70 00
Fax : 0317 - 41 80 94
E-mail : postkamer.pri@wur.nl
Internet : <http://www.plant.wur.nl>

Inhoudsopgave

1. Inleiding	1
2. Werkwijze	2
3. Resultaten	3
4. Discussie	5
5. Referenties	7
Bijlage I. Tabel met de genetische similariteit binnen en tussen rassen	1

1. Inleiding

Morfologisch vertonen paprikarassen bij telers soms een gebrek aan uniformiteit. Dit kan een effect zijn van milieuomstandigheden, maar zou (deels) het gevolg kunnen zijn van genetische variatie in de rassen. In het laatste geval zou men de uniformiteit binnen een paprika-ras kunnen verhogen door weefselkweek.

Doel van deze korte studie was om vast te stellen of genetische variatie kan worden vastgesteld in paprikarassen met behulp van DNA fingerprint-technieken. Het is een pilot studie, met kleine aantallen bemonsterde planten, zodat het percentage afwijkende planten niet exact kan worden bepaald.

2. Werkwijze

Het materiaal bestond uit normale en afwijkende planten van 10 verschillende rassen. De keuze van rassen met afwijkende planten is uitgevoerd door Pascale Temmes van LTO Groeiservice. De planten werden bemonsterd op 24 en 31 oktober 2003 bij telers die deze rassen in commerciële teelt hadden, en de telers of Pascale Temmes gaven aan welke planten afwijkend waren. Het aantal afwijkende planten varieerde per ras/teler. Van elk ras werden 9 (voor Derby 10) planten bemonsterd. Ter controle van de procedure werden enkele planten in duplo bemonsterd; deze bleken in de analyse telkens identiek aan elkaar.

Tabel 1: Bemonsterde rassen

Ras	Kleur	Teler	Plaats
Boogie	Oranje	M. Barendse	Poeldijk
Corsica	Groen	J. Valstar	De Lier
Derby	Geel	L. Damen	Honselersdijk
Echo	Groen	J. van Leeuwen	Lepelstraat
Expres	Rood	P. Verheul	's Gravenzande
Fiesta	Geel	P. van Vliet	Monster
Goal	Rood	T. Barendse	Poeldijk
Inspiration	Rood	J.H. Verbeek	De Lier
Solution	Rood	A. de Groot	Naaldwijk
Tripoli	Groen	C.J. Middelburg	Naaldwijk

Van alle planten werd DNA geïsoleerd met Qiagen kolommetjes (protocol volgens de leverancier, Qiagen). Vervolgens werd AFLP analyse (Vos et al., 1995) uitgevoerd volgens Arens et al. (1998). Drie primerparen werden gebruikt, waarvan uit eerder onderzoek (Voortrips et al., unpublished) bekend was dat ze heldere patronen opleveren in paprika: E32/M48 (4 polymorfe banden), E37/M51 (10) en E38/M49 (8). Aan- (1) en afwezigheid (0) van elke polymorfe band werd gescorrd in een spreadsheet. Mate van genetische overeenkomstigheid (similariteit) werd berekend, en een UPGMA dendrogram werd geconstrueerd met NTSYSpc v. 2.10j (Exeter Software).

3. Resultaten

Met drie AFLP primer paren werden 22 banden gescoord die in sommige rassen of planten aanwezig waren, en in andere afwezig (polymorf), waarvan 5 in slechts één plant werden gevonden. Dit is een klein deel van de in totaal meer dan 200 banden die zichtbaar waren, en dat was verwacht omdat de genetische variatie in paprika relatief klein is (Paran et al. 1998; Prince et al. 1995; Rodriguez et al. 1999). Zestien polymorfe banden waren bruikbaar om rassen van elkaar te onderscheiden, en daarmee had elk ras een unieke fingerprint (combinatie van aanwezige banden).

In totaal werden 91 planten getest. In 15 van deze planten werd een bandenpatroon gevonden dat afweek van de rest van het ras, dat is in 16,5% van de monsters. In tien planten was de afwijking ten opzichte van het patroon van de andere planten van hetzelfde ras één band verschil, maar twee planten weken af in 3 banden, en drie planten zelfs in 4 banden.

De afwijkende planten zijn ongelijk verdeeld over de rassen. Een aantal rassen (Boogie, Derby, Echo) laat geen enkele afwijker zien, terwijl van Inspiration vier van de negen planten afwijken van de overige planten (van de vier afwijkers zijn er twee identiek aan elkaar). Tabel 2 geeft een overzicht van de verdeling van afwijkende planten.

De afwijkingen bestaan in bijna alle gevallen uit extra banden, behalve bij Solution, waar twee planten 3 banden uit het ras-patroon missen. Van de extra banden zijn er 5 uniek voor de dataset (waarvan 3 in één plant van Expres), en 13 extra banden komen voor in alle planten van een of meer andere rassen. In vijf afwijkende planten uit drie verschillende rassen komt een en dezelfde band voor die niet kenmerkend is voor een van de tien rassen.

Er is geen directe correlatie tussen de gevonden genetische afwijkingen en eventuele morfologische afwijkingen in de bemonsterde planten. Bij Boogie waren zeven van de negen planten morfologisch afwijkend, maar genetisch is daar geen afwijking in gevonden. Bij Solution was één plant met gebochelde vrucht genetisch afwijkend, maar een tweede gebochelde niet.

Tabel 2. Samenvatting van de resultaten van de AFLP analyse

Ras		Aantal planten getest	Aantal genetisch afwijkende planten	Totaal aantal afwijkende banden	
Boogie	B	9	0	0	
Corsica	C	9	2	3	
Derby	D	10	0	0	
Echo	E	9	0	0	
Expres	Ex	9	2	4	Eén plant bevat 3 extra banden, uniek voor de dataset
Fiesta	F	9	1	1	
Goal	G	9	2	1	
Inspiration	I	9	4	5	Twee planten hebben dezelfde 4 extra banden
Solution	S	9	3	5	Twee planten missen dezelfde 3 banden
Tripoli	T	9	1	1	

4. Discussie

Om na te gaan in hoeverre morfologische afwijkingen tijdens de teelt van paprikarassen een genetische basis hebben, is van 91 planten van negen rassen, deels morfologische normaal en deels afwijkend, een genetisch profiel opgesteld. Het bandenpatroon dat zo wordt verkregen is altijd maar een heel kleine steekproef uit het genetisch materiaal van een plant. Het nut van de steekproef is om de hoeveelheid variatie binnen een ras, en de omvang van de genetische verschillen tussen rassen, te kunnen schatten, en de ervaring leert dat, omdat de banden willekeurig uit het genetische materiaal afkomstig zijn, deze genetische 'afstanden' al snel in kaart te brengen zijn. Met name rolt er uit of een plant identiek is aan een andere plant, of niet.

Als steekproef voor een bepaalde eigenschap is hij echter veel te klein, omdat een plant minimaal 25000 verschillende genen bevat. Het is dan ook niet verwonderlijk dat een direct samengaan van een bepaald bandje en een bepaalde eigenschap slechts zelden toevassig wordt gevonden (het kan wel via gericht zoeken, maar dat is een andere benadering en valt buiten het kader van deze studie).

Er werden ruim 200 banden verkregen, waarvan 22 verschillen vertoonden in hun vóórkomen in de bestudeerde planten. De verschillen vielen inderdaad niet samen met morfologische variatie. De verschillen waren ongelijk verdeeld over de rassen. Drie rassen waren helemaal homogeen, terwijl van ras Inspiration 4 van de 9 planten genetisch afweken.

Een van de genetisch homogene rassen is Boogie, waarbij het monster bestond uit 7 afwijkende planten en 2 morfologisch normale planten. Dit geeft aan dat er, in ieder geval in bepaalde rassen, morfologische variatie aanwezig is die waarschijnlijk niet genetisch bepaald is, maar veeleer door milieuvloeden wordt veroorzaakt.

De genetische afwijkingen in 6 van de 9 rassen zijn hoogstwaarschijnlijk (omdat mutaties zeer zeldzaam zijn) afkomstig uit de ouders die zijn gebruikt om de (F1) zaden te maken. In het algemeen geldt bij hybride rassen (van de Wiel et al, in voorbereiding) dat genetische afwijkingen het gevolg kunnen zijn van:

- Niet zuivere ouderlijn of ouderlijnen (onvoldoende ingeteeld)
- Zelfbevruchting van de moederlijn
- Bestuiving met andere vaderlijnen

De afwijkingen die we in de paprikarassen vinden, vallen in verschillende groepen uiteen, en per groep is een andere oorzaak het meest waarschijnlijk. Het is een eerste interpretatie, voor verdere analyse zou het nodig zijn om ook de ouderlijnen in de analyse te betrekken.

- De verschillende afwijkingen die bestaan uit een enkele extra band per plant (zoals het geval is in 1 plant van Corsica, 1 plant van Expres, 2 planten van Inspiration, 2 planten van Goal, 1 plant van Tripoli, 1 plant van Solution, en 1 plant van Fiesta) zijn het meest waarschijnlijk het gevolg van onvoldoende zuivere ouderlijnen.
- Bij de afwijkingen die bestaan uit het ontbreken van verschillende banden (2 planten van Solution die dezelfde drie banden missen) is waarschijnlijk sprake van zelfbestuiving.
- Daar waar drie of vier extra banden worden gevonden in één plant, is bestuiving door een andere pollendonor het meest waarschijnlijk. Dit is het geval bij Express (drie banden in 1 plant) en Inspiration (2 planten met dezelfde vier extra banden).

Hoe zou de genetische variatie binnen rassen verminderd kunnen worden? Dit hangt onder meer af van de wijze waarop groenteverdelingsbedrijven de rassen produceren, welke ouderlijnen ze gebruiken, en welk mechanisme wordt gehanteerd om F1 hybriden te maken. In ieder geval kan de zuiverheid van hun zaadpartijen eenvoudig worden getoetst met de hier beschreven methode. Routine-analyse van

zuiverheid kan gebeuren met AFLP of met microsatelliet (Nagy et al. 1998; Sanwen et al. 2000; Arens et al., pers. mededeling) analyses.

Problemen bij het maken van de F1 lijnen kunnen onder meer worden opgelost door een F1 paprika plant vegetatief te vermeerderen. Het genotype zal dan identiek zijn aan het F1 uitgangsmateriaal. Hierbij moet echter worden aangetekend dat weefselkweekvermeerdering soms, afhankelijk van soort en genotype, ook tot morfologische afwijkingen leidt. De aanwijzing dat een deel van de morfologische variatie bij paprika waarschijnlijk een milieu-effect is, zou kunnen duiden op een grote invloed van het milieu op de morfologie van in ieder geval sommige paprikarassen.

5. Referenties

Arens P, Coops H, Jansen J, Vosman B (1998) Molecular genetic analysis of black poplar (*Populus nigra* L.) along Dutch rivers. *Molecular Ecology* 7: 11-18

Nagy I, A Polley, M Ganal (1998) development and characterisation of microsatellite markers in pepper. Xth Eucarpia meeting on genetics and breeding on capsicum and Eggplant, 1998, Avignon, France

Paran I, Aftergoot E, Shifriss C (1998) Variation in *Capsicum annuum* revealed by RAPD and AFLP markers *Euphytica* 99:167-174.

Prince JP, Lackney VK, Angeles C, Blauth JR, Kyle MM (1995) A survey of DNA polymorphism within the genus *Capsicum* and the fingerprinting of pepper cultivars. *Genome* 38: 224-231.

Rodriguez JM, Berke T, Engle L, Nienhuis J (1999) Variation among and within *Capsicum* species revealed by RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 99: 147-156

Sanwen H, Z Baoxi, D Milbourne, L Cardle, Y Guimei, G Jiazhen (2000) Development of pepper SSR markers from sequence databases. *Euphytica* 117: 163-170

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414

Bijlage I.

**Tabel met de genetische similariteit binnen en
tussen rassen**

