UPPSALA
UNIVERSITET

Könsbestämningstekniker som ett led i kampen mot svält

Christoffer Fransson

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, vårterminen 2014
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Sammandrag
Under de närmsta årtiondena kommer efterfrågan på mat öka dramatiskt. Större skördar behövs utan att odlingen kräver större arealer eller använder sig av mer resurser i form av fossila bränslen och vatten. Detta ställer högre krav på jordbrukets odlingsteknik och grödor. Dioika växter, växter med skilda hanplantor och honplantor, står visserligen för en liten del av matproduktionen men här finns en möjlighet att effektivisera jordbruket kraftigt genom en effektivare användning av odlingsyta, gödsel och vatten. Hos dioika växter är det i regel enbart det ena könet som är av kommersiellt värde men det tar lång tid innan könsbestämning av dioika växter är möjlig genom morfologiska karaktärer. Till exempel önskas en hög andel honor vid odling av humle (*Humulus lupulus*), papaya (*Carica papaya*) och havtorn (*Hippophae rhamnoides*). Hos humle tar det två år innan könsbestämning kan ske och när hanar har identifieras kasseras de och alla de resurser (gödsel, odlingsyta och vatten) som lagts på dem är resultatlösa. Genom att identifiera kön hos dioika växter tidigt med hjälp av genetiska markörer kan man undvika detta resursslöseri. Genetiska markörer har fördelen att man inte behöver vänta tills plantan visar könsspecifika morfologiska karaktärer (dess DNA är detsamma oavsett ålder). I denna uppsats avhandlar jag två PCR-baserade (Polymerase Chain Reaction) markörtyper, mikrosatellit- och SCAR-markörer. Den nuvarande användningen av de två markörtyperna undersöks och framtiden för könsbestämning av dioika växter diskuteras. Denna sammanställning visar på en stor potential hos bägge typerna av genetiska markörer och urskiljer två huvudsakliga utvecklingsvägar som tekniker kan följa i framtiden.

Inledning
Befolkningsökningen och en ökad inkomstnivå kommer fördubbla världsbehovet av mat fram till 2050 (Tilman *et al.* 2011). Jordbruket måste därför bli effektivare, mer mat ska produceras med mindre resurser. Den nuvarande förädlingstakten är för låg och kommer att leda till att mer mark behöver tas i anspråk för matproduktion (Ray *et al.* 2013). Det är problematiskt då det ofta inte finns tillräckligt med mark för att utöka odlingsarealen och dessutom leder ökad odlingsareal till mindre biologisk mångfald. En alternativ väg framåt är att utveckla metoder och grödor som sparar på resurser samtidigt som skörden ökar (Ray *et al.* 2013).

Med dagens biotekniska framsteg finns kraftfulla tekniker för att framställa genmodifierade organismer (GMO). I grödor som är GMO har man använt sig av en klippa-och-klistra-teknik där gener flyttas inom eller mellan artgränserna. Genmodifikation har en stor potential att möta utmaningen som det ökade matproduktionskravet ställer. Exempelvis har en bakteriegen överförts till bomull (*Gossypium hirsutum*), majs (*Zea mays*) och aubergine (*Solanum melongena*) där den uttrycker ett insektsgift (Jacobsen *et al.* 2013). En styrka med GMO är att den inte begränsas av den genetiska variationen inom en art, vilket skiljer tekniken från den traditionella växtförädlingen.

Ett stort problem för GMO inom Europa är dock den negativa uppfattning som allmänheten har om GMO, något som återspeglas i EU:s restriktiva lagar. Utanför EU, i till exempel USA är däremot majoriteten av de stora grödorna GMO (Bonny 2003). Oavsett vilken teknik som används i framtida växtförädling bör den vara allmänt betraktad som säker (Bohra 2013). Därför inriktar sig denna uppsats på förbättringar av den traditionella växtförädlingens metoder. Här begränsas man av den genetiska variationen inom arten och inga gener flyttas mellan arter. Den största flaskhalsen i växtförädlingen är för tillfället fenotypisk klassifikation (Poczai *et al.* 2013) och utvecklingen av en ny sort tar 12-15 år (Sivolap 2011). Genom att tidigt karakterisera fenotypiska drag kan därför den tidsödande växtförädlingen snabbas på.

Det finns tre huvudsakliga verktyg för att nå detta mål: morfologiska karaktärer, biokemiska markörer och genetiska markörer (Kumar *et al.* 2009).

Både morfologiska markörer (till exempel fruktmassa) och biokemiska markörer (till exempel halten av ett visst enzym) har nackdelen att man kan behöva vänta tills plantan är mogen nog att visa sina karaktärer (Kumar *et al.* 2009). Med hjälp av genetiska markörer kan man undvika denna nackdel. Genetiska markörer finns alltid tillgängliga i växten oberoende av ålder och vilken del av växten som helst kan användas för analys; DNA finns i alla celler.

Eftersom dioika växter, växter som har skilda hanplantor och honplantor, enbart utgör sex procent av alla blomväxter (Renner och Ricklefs 1995) är dessa inte av lika stort kommersiellt värde som monoika växter. Det finns ändå kommersiellt odlade dioika växter som humle (*Humulus lupulus*), papaya (*Carica papaya*), hampa (*Cannabis sativa*) och havtorn (*Hippophae rhamnoides*). Hos humle tar det hela två år innan könsbestämning kan ske med hjälp av morfologiska karaktärer (Jakse *et al.* 2008). Därför finns det ett stort intresse för att utveckla metoder som kan användas för att sortera bort ett oönskat kön från odlingarna tidigt, för att då spara både resurser och odlingsutrymme (Milewicz och Sawicki 2013).

Denna uppsats handlar om genetiska markörer som ger möjlighet att bestämma könet på dioika växter och besvarar hur två typer av PCR (Polymerase Chain Reaction)-baserade genetiska markörer används idag och diskuterar teknikernas framtid. Mer specifikt kommer denna uppsats att fokusera på de två PCR-baserade teknikerna SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) och användandet av mikrosatelliter som ger möjlighet att tidigt könsbestämma dioika växter. Här nedan kommer jag att beskriva mikrosatellit-DNA och hur det används för könsbestämning. Därefter förklarar jag SCAR-markörer och dess användning och slutligen kommer teknikernas fördelar, nackdelar och framtid att diskuteras.

Mikrosatellitmarkörer och SCAR-markörer

Mikrosatellitmarkörer

Mikrosatellit-DNA är korta repetitiva sekvenser på 1-6 baspar. Det kan beskrivas som mononukleotid, dinukleotid, trinukleotid, tetranukleotid, pentanukleotid eller hexanukleotid beroende på hur många baser som ingår i den repetitiva enheten (Kalia *et al.* 2011). Polymorfismen i antalet mikrosatelliter kan förklaras av replikationsfel där sekvenslängden ökas eller minskas (Ellegren 2004). Mikrosatellit-DNA kallas även SSR (Simple Sequence Repeat) eller STR (Short Tandem Repeats) (Kalia *et al.* 2011). Ett exempel på en SSR är tetranukleotidsekvensen GATA som repeteras n antal gånger (Parasnis *et al.* 1999).

Mikrosatellitmarkörer är vanligt förekommande och jämt utspridda i genomet hos både eukaryota- och prokaryota organismer (Zane 2002). Bland de eukaryota organismerna skiljer växters och djurs mikrosatellitsekvenser sig åt. Hos växter är den vanligaste repetitiva dinukleotidenheten av sorten AT medan det hos djur är vanligare med AC och TG. Skillnaden i uppbyggnad av mikrosatelliter kan därför användas för att bestämma om ett prov kommer från ett djur eller en växt (Powell *et al.* 1996). Även andelen mikrosatelliter skiljer sig mellan olika organismer. Hos växter och fåglar är mikrosatellitandelen i genomet låg medan fiskar har en hög andel mikrosatelliter. Andelen mikrosatelliter i genomet styr vilken effektivitet som krävs av metoden som används vid mikrosatellitidentifiering (Zane 2002).

En genetisk markör bör ha vissa egenskaper för att vara användbar, däribland stor allelisk variation (polymorf) och vara spridd i hela genomet (Kumar *et al.* 2009, Parida *et al.* 2009),

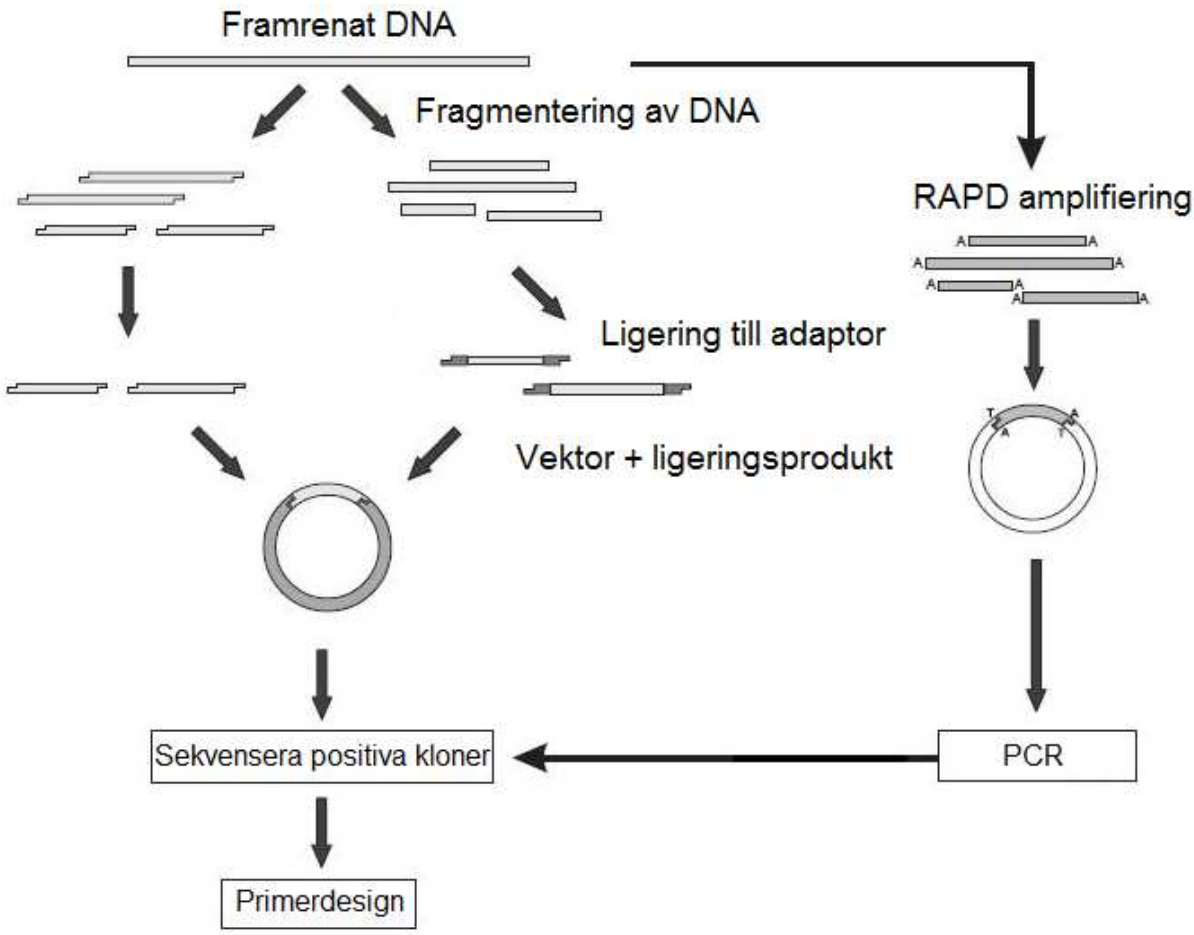
krav som uppfylls av mikrosatellit-DNA. Polymorfismen i antalet repetitiva enheter hos mikrosatelliter är hög (Kumar 2009). Denna typ av polymorfism kallas längdpolymorfism. En genotyp som uttrycker, till exempel kön eller fruktmassa, kan vara kopplad till ett visst antal repetitiva enheter av en viss mikrosatellit och genom att identifiera mikrosatellitens längd kan man därför uttala sig om vilken fenotyp som växten kommer att uttrycka. Kopplingen mellan gener och mikrosatellit-DNA öppnar för applikationer där genotyper kan särskiljas genom att detektera mikrosatellit-DNA, vilket kan användas i förädlingsarbetet (Parida *et al.* 2009).

Mikrosatelliters funktion

Både i och utanför kodande regioner finns mikrosatelliter och deras funktion är omdiskuterad. I debatten finns två sidor där den ena anser att mikrosatelliter är evolutionärt neutrala och utan praktisk funktion medan den andra anser att de visst har funktion och ingår i selektiva processer. Li *et al.* (2002) tar en mer försonande ton och anser att bägge sidor kan ha rätt samtidigt. Mikrosatelliter kan då, i vissa fall, vara evolutionärt neutrala, medan de i andra fall är av funktionell betydelse. Exempel på föreslagna funktioner hos mikrosatelliter är kromatinorganisation och genreglering (Li *et al.* 2002). Att mikrosatelliter skulle vara inblandade i genreglering hos växter stöds av att mikrosatelliter är vanligare i 5'-UTR (Untranslated Region) än i övriga delar av växters genom (Li *et al.* 2004).

Isoleringen av mikrosatelliter

Innan man kan dra nytta av en mikrosatellit så måste den identifieras *de novo*. Denna första identifiering av en mikrosatellit är ett tidsödande arbete. När man har en känd mikrosatellitsekvens kan däremot PCR-primrar designas för att binda till den konserverade kringliggande sekvensen (Kalia *et al.* 2011) och längden på mikrosatelliten kan bestämmas genom en PCR-reaktion och efterföljande elektrofores. Den höga initiala kostnaden övervägs av den kommande användbarheten (Kalia *et al.* 2011, Sivolap 2011). Karaktärisering av en mikrosatellit med kända flankerande sekvenser går fort då man utvecklat PCR-primrar som amplifierar mikrosatellitfrekvenserna.



Figur 1. Schematisk bild över den traditionella mikrosatellitisoleringsmetoden (till vänster) samt över mikrosatellitisolering med hjälp av RAPD-markörer (till höger). Omarbetad efter Zane *et al.* (2002).

Följande beskrivning av den traditionella mikrosatellitisoleringsmetoden baseras på Zane (2002) och beskrivs av det vänstra flödesschemat i figur 1. Genomiskt DNA fragmenteras med hjälp av restriktionsenzym, alternativt med den mindre vanliga och mer ospecifika tekniken sonikering (ultraljudsbehandling). Därefter ligeras DNA-fragmenten in i bakterievektorer. Dessa odlas på en agarplatta där en hybridiseringssond med en repetitiv sekvens tillsätts. Den repetitiva sekvensen letar rätt på mikrosatelliter, som även de har repetitiva sekvenser, och associeras med dessa. Hybridiseringssonden har en radioaktiv eller fluorescerande tillsats och därför kan de bakterievektorer som har ett DNA-fragment med en sekvens som matchar hybridiseringssonden detekteras. Bakteriervektorer som innehåller DNA-fragment med mikrosatellit-DNA är nu konstaterat och dessa sekvenseras, isoleringen av mikrosatelliterna är klar.

Med sekvensdata av dessa mikrosatelliters flankerande sekvenser – som är konserverade i högre grad (Kalia *et al.* 2011) – kan PCR-primrar konstrueras som kan användas för att detektera polymorfism i antalet repetitiva enheter. Skillnaden i antalet repetitiva enheter, längdpolymorfismen, är kärnan i användningen av mikrosatellitmarkörer.

Ett alternativt sätt som innefattar färre steg i isoleringen av mikrosatelliter är att använda sig av en eller flera PCR-primrar med godtyckliga sekvenser (eller repetitiva primrar), se högra flödesschemat i figur 1. De godtyckliga PCR-primrarna amplifierar DNA-segment och kallas RAPD-primrar, random amplification of polymorfic DNA (Meyer *et al.* 1993, Zane 2002). I fragment som är amplifierade av RAPD verkar andelen mikrosatelliter vara hög (Zane 2002).

Om RAPD åtföljs av hybridiseringssonder som märker ut kloner med en repetitiv sekvens kan tekniken användas för att få information av de flankerande regionerna efter en sekvensering (Zane 2002). Denna lösning kan ses som en genväg jämfört med den traditionella isoleringsmetoden.

I dagsläget kan mikrosatellitprimrar utvecklas direkt ur sekvensdata (Kalia *et al.* 2011, Kantety *et al.* 2002), och inte enbart ur riktade försök att hitta mikrosatellit-DNA på de sätt som beskrivs ovan. Detta är en konsekvens av att sekvenseringstekniker slagit igenom och en stor mängd sekvensdata finns tillgänglig i databaser. Med hjälp av datorprogram kan mikrosatellitmotiv identifieras i denna stora massa av sekvensdata (Thiel *et al.* 2002).

En sorts sekvensdata som används för mikrosatellitidentifikation är EST (expressed sequence tag) som grundar sig på omvänt transkriberat mRNA. Detta innebär att mikrosatelliterna som identifieras i EST ingår i en kodande region (Li *et al.* 2004, Varshney *et al.* 2005), vilket medför att de är mer konserverade (Chabane *et al.* 2005) än mikrosatelliter i icke-kodande regioner. Detta beror på det selektiva trycket mot en läsramsförskjutning (Metzgar *et al.* 2000) vilket minskar mutationshastigheten. Fördelen med mer konserverade mikrosatelliter är att jämförande studier mellan arter kan göras (Kalia *et al.* 2011). Mikrosatellitidentifiering från en sekvensdatabas är självfallet en mer kostnadseffektiv och tidssparande metod jämfört med att isolera mikrosatelliterna på det traditionella sättet eller med hjälp av RAPD-primrar (Varshney *et al.* 2005) och flera mikrosatelliter som har isolerats från EST-databaser har varit visat sig vara mycket användbara (Chabane *et al.* 2005).

Mikrosatellitmarkörer finns i både kodande och icke-kodande regioner men antalet repetitiva enheter i mikrosatelliter är högre i icke-kodande regioner (Li *et al.* 2004). Mikrosatelliter från icke-kodande regioner är överlägsna EST-mikrosatellitmarkörer i att skilja närbesläktade genotyper åt på grund av sin högre grad av polymorfism (Kalia *et al.* 2011).

RAPD och SCAR-markörer

RAPD kan användas även på egen hand för att identifiera DNA-polymorfism. Då används randomiserade PCR-primrar för att identifiera längdpolymorfism i DNA. Dessa DNA-fragments längdskillnader kan man korrelera med önskade fenotyper och därmed använda i växtförädling (Kumar *et al.* 2009). Det som skiljer dessa markörer från mikrosatellitmarkörerna är att de förra inte enbart består av repetitiva enheter utan att polymorfismen även kan uppkomma från deletioner och insertioner av DNA (Paran och Michelmore 1993). Fördelarna är att inga sekvensdata krävs då primrarna är randomiserade. Nackdelen är en låg reproducerbarhet då samma PCR-betingelser krävs (Schierwater och Ender 1993) vilket är anledningen till att fokus inte läggs på RAPD-markörer i denna uppsats.

RAPD-tekniken med efterföljande SCAR-omvandling är en av de mest använda teknikerna för könsbestämning av växter i nuläget, detta trots att utvecklandet av RAPD-tekniken skedde redan under tidigt 1990-tal (Milewicz och Sawicki 2013). Omvandlingen till SCAR-markörer innebär att RAPD-markören sekvenseras och långa (>20 baspar) PCR-primrar designas för att amplifiera en viss karakteriserad region, SCAR (Paran och Michelmore 1993). De långa PCR-primrarna ger en mer specifik och dessutom reproducerbar amplifieringsprodukt (Milewicz och Sawicki 2013) vilket är en tydlig fördel jämfört med RAPD-markörer (Kumar *et al.* 2009).

Användbarheten av SCAR-markörer ligger i att polymorfism kan mätas i längden på de amplifierade fragmenten eller den möjliga avsaknaden av amplifierat fragment (Paran och

Michelmore 1993). Vanligen används SCAR vid könsbestämning för att påvisa en könspecifik SCAR-markör som antingen amplifieras eller inte (Mandolino *et al.* 1999, Korekar *et al.* 2011, Milewicz och Sawicki 2013) men SCAR-markörer kan även användas för att detektera längdpolymorfism på samma sätt som mikrosatellitmarkörer (Paran och Michelmore 1993, Lee *et al.* 2010). Mikrosatellitmarkörer ser enbart polymorfism inom en mikrosatellit medan RAPD-SCAR kan se polymorfism i vilken del av genomet som helst. Genetiska markörer funna med primrar av godtycklig sekvens är idag en av de mest använda markörtyperna (Poczai *et al.* 2013).

Hur används SCAR och mikrosatellitmarkörer inom växtförädlingen?
Mikrosatelliter kan användas för analyser av släktskapsförhållanden mellan arter (Holton *et al.* 2002). Till följd av den höga polymorfismen i antalet repetitiva enheter hos mikrosatelliter kan de användas för att särskilja ner på individ- och sortnivå (Meyer 1993). Den höga polymorfismen kan också utgöra ett problem då mikrosatellitsammansättningen kan variera mellan populationer inom samma art (Jakse *et al.* 2008) och därmed försvåra utvecklandet av universella primrar för könsbestämning (Zane 2002). Mikrosatelliter från kodande regioner är värdefulla när man ska åtskilja sorter som är närbesläktade eftersom det då krävs en högre grad av polymorfism.

Inom växtförädling kan mikrosatelliter användas efter att deras koppling till gener klargjorts genom så kallad genkartläggning (gene mapping). Till exempel har virusresistensgenen *rym5* identifierats hos korn (*Hordeum vulgare*) och mikrosatelliten QLB1 har konstaterats vara associerad med denna (Tyrka *et al.* 2008). Associationen mellan mikrosatellit och resistensgen öppnar för användning av en simpel PCR-teknik där primrar för QLB1 används för att kontrollera om en individ har resistensgenen. Även jordgubbar har identifierande mikrosatelliter med tillhörande PCR-primrar med möjligheten att skilja på olika jordgubbssorter (Brunings *et al.* 2010). Både sortidentifikation och resistensgenidentifikation har betydelse i förädlingsarbetet där man vill korsa växter med gynnsamma genuppsättningar. SCAR-markörer kan även, i likhet med mikrosatelliter, användas för att kopplas till resistensgener (Cha *et al.* 2014) eller för sortbestämning (Yang *et al.* 2013).

Denna typ av användning kommer jag inte inrikta mig på i detta arbete. Istället för användning inom det aktiva förädlingsarbetet (där målet är nya varianter) har jag intresserat mig för könsbestämning av växter genom mikrosatellitmarkörer.

Könsbestämning med hjälp av mikrosatellitmarkörer och SCAR-markörer
En tidig könsbestämning av dioika grödor gör det möjligt att tidigt kassera växter av oönskat kön. Däri finns en potential att kraftigt förbättra lönsamheten för bönder genom att minska resursslöseriet (Parasnis *et al.* 1999). Ett effektivare jordbruk, och därmed ett lönsammare, är viktigt för att föda framtidens befolkning. Här följer exempel på hur könsbestämning med hjälp av mikrosatellitmarkörer och SCAR-markörer kan utnyttjas i ett antal olika dioika växter (varav tre är representerade i figur 2) och därmed bidra till ett effektivare jordbruk.

Figur 2. Ett urval av dioika växter. Från övre vänstra hörnet och uppräknat medsols: humle, hampa, pistasch, papaya och i mitten muskotnöt. Foto: Stock.xchng.

Humle

Humle odlas för den kåda som honplantorna producerar och som används vid ölbryggning. Problemet är att fenotypiska karaktärer som gör det möjligt att skilja en hona från en hanne syns först när plantan är två år (Jakse *et al.* 2007). En tidig könsbestämning skulle kunna spara odlingsyta och resurser som slösas bort på hanplantorna inom kommersiell odling. Närvaron av hannar försämrar dessutom kvaliteten hos den kåda som honorna producerar (Jakse *et al.* 2007). Det finns nio par autosomala kromosomer och ett par könskromosomer i humle. Precis som hos människan är könskromosommatchningen XX definitionen av en hona och XY en hane. När man letar efter en mikrosatellitskillnad kopplad till kön sker detta i könskromosomerna.

Jakse *et al.* (2007) använde sig av mikrosatellitmarkören HlAGA7 som utvecklades av Stajner *et al.* (2005) och kunde koppla förekomsten av en viss längd av mikrosatelliten (antalet repetitiva enheter) till kön. Med andra ord kunde mikrosatellitmarkörens längdpolymorfism kopplas till könet på humleplantan. HlAGA7-markören amplifierade 35 olika längdpolymorfismer (allelvarianter) i de testade humleindividerna (n = 174). I jämförelsen mellan honplantor och hanplantor visade det sig att tre alleler enbart fanns hos hanar och 14 alleler enbart hos honor. Två olika korsningar testades och i den ena fanns ett DNA-fragment av längden 165 baspar hos alla hanar medan ett DNA-fragment av längden 210 baspar hittades hos samtliga hanar i den andra korsningen (Jakse *et al.* 2007). Ytterligare bevis för att allelen av 210 baspar är kopplad till hanlig fenotyp är att den fanns i de plantor som visade hermafroditisk karaktär. I dessa fall uppstod tre band vid amplifieringen vilket troligen härrör från en XXY mekanism som ligger bakom den hermafroditiska karaktären (Jakse *et al.* 2007).

En styrka med att använda HlAGA7-mikrosatellitmarkören är att den ger en amplifieringsprodukt hos både hanar och honor. HlAGA7-markören bör därför ge två band oavsett kön och utifrån längden på dessa DNA-segment dras en slutsats om kön. Detta innebär att en misslyckad amplifiering inte misstolkas som ett faktiskt resultat då avsaknad av band alltid identifieras som en misslyckad amplifiering (Jakse *et al.* 2007).

Hampa
Tillsammans med humle ingår hampa i familjen Cannabinaceae och könsbestämningen styrs på samma som hos humle (XX = hona, XY = hane). Hanar och honor av hampa växer i olika takt och därmed ges en ojämn fiberkvalitet vid odling av båda könen på samma fält. För att förbättra fiberkvaliten önskas enkönade odlingsfält.

Rode *et al.* (2005) använde sig av 15 mikrosatellitprimrar, som tidigare utvecklats av Gilmore och Peakall (2003), i två skilda populationer av hampa. Författarna kopplade tre polymorfiska mikrosatelliter till kön i den ena populationen och en polymorfisk mikrosatellitmarkör till kön i den andra. Tyvärr visade det sig att ingen av mikrosatellitallelerna följde den förväntade segregationen hos avkomman till fullo. En del av avkomman hade en könspecifik längd på sin mikrosatellitallel som inte överensstämde med plantans faktiska kön. Detta var troligen på grund av rekombination mellan markörer och ett könslokus (Rode *et al.* 2005). Rekombinationen leder till att könsbestämningen inte kan ske med full säkerhet.

Havtorn
Havtorn är även den dioik och det är honornas frukt som är av kommersiellt värde. Korekar *et al.* (2012) har utvecklat en metod som baseras på SCAR-markörer för att kunna utföra en tidig könsbestämning. Utan denna genetiska markör behöver man vänta till första blomning för att könsbestämning ska kunna ske, vilket dröjer tre till fyra år (Korekar *et al.* 2012). Vid tidigare försök till könsbestämning av havtorn med hjälp av mikrosatelliter har man använt sig av ett för få individer och enbart speciella varianter (Korekar *et al.* 2012).

Korekar *et al.* (2012) identifierade en könspecifik SCAR-markör genom att samla in DNA från 20 honor och 20 hanar och, med hjälp av randomiserade RAPD-primrar, amplifiera DNA-fragment. Bandmönstret hos honor och hanar jämfördes och de RAPD-primrar som gav könsspecifika band användes sedan på de 20 honorna och 20 hanarna separat och könsspecifika band bekräftades. De könspecifika banden sekvenserades och en RAPD-markörs sekvens användes för att konstruera en SCAR-markör. SCAR-markören amplifierade ett 386 baspar långt DNA-fragment i alla honor medan ingen amplifiering skedde hos hanarna, vilket gör att den kan användas för könsbestämning.

Papaya
I en kommersiell papayaodling är det önskvärt med enbart fem procent hanar. Denna andel hanar räcker för att pollinera honorna som då ger frukt (Parasnis *et al.* 1999) och en större mängd hanar skulle inte bidra till något kommersiellt värde. Tyvärr består en odling av hälften hanar och hälften honor. Efter sex till åtta månader kan man identifiera hanarna och 90 procent av dessa kasseras (Parasnis *et al.* 1999). Om man i ett tidigt stadium kunde ta bort dessa hanar skulle man spara resurser och ge odlingsutrymme för fruktgivande honor.

Chaves-Bedoya och Nuñez (2007) identifierade en RAPD-markör som enbart amplifierades i hanar och hermafroditer. Denna RAPD-markör omvandlades till en SCAR-markör som amplifierades till ett 369 baspar långt fragment i hanar och hermafroditer men inte i honor. Därmed kan kön bestämmas genom en genotypisk undersökning. Att både hanar och hermafroditer amplifierar SCAR-markören antyder att den befinner sig på Y-kromosomen (Chaves-Bedoya och Nuñez 2007).

Chili
I chili (*Capsicum annuum*) kan SCAR-markörers längdpolymorfism användas för att detektera sterilitet hos hanar (Lee *et al.* 2010). SCAR-markörer används för att ge en

amplifieringsprodukt eller inte (Milewicz och Sawicki 2013) som exemplen på papaya och havtorn. Denna markör är inte utvecklad för att särskilja hanplantor och honplantor men visar att längdpolymorfism kan användas för att åtskilja två fenotyper även hos SCAR-markörer. En deletion av 42 baspar orsakar sterilitet och denna kan identifieras med hjälp av en SCAR-markör utvecklad av Lee *et al.* (2010). Denna markör amplifieras både i fertila och sterila hanar och genom att längdpolymorfismen detekteras kan man se om hanen är steril eller inte, vilket är användbart både i förädlingsarbetet och i den kommersiella odlingen.

Diskussion

PCR-baserade genetiska markörer som SCAR och mikrosatelliter har stor potential att förändra odlingen av dioika växter till det bättre. Från att ha slösat resurser och tid på ofruktsamma hanar (eller oönskade honor) kan användningen av vatten, gödning och arbetsinsatser effektiviseras genom en tidig könsgallring.

Anledningen till mikrosatellit- och SCAR-markörers stora potential är att de kan uppfylla många av de krav som ställs på genetiska markörer. Kumar *et al.* (2009) anser att en genetisk markör ska vara: mycket polymorf, vanlig förekommande och utspridd igenom hela genomet, samt enkel, snabb och billig att detektera. Både SCAR-markörer och mikrosatelliter kan uppfylla dessa krav.

Antalet amplifieringsprodukter har betydelse

SCAR och mikrosatelliter har stora likheter då bägge kan användas för att identifiera längdpolymorfism. Om de utvecklade PCR-primrarna amplifierar ett DNA-fragment hos både hanar och honor fast av varierande längd är den praktiska användningen identisk. Vanligtvis används däremot SCAR tekniken för att amplifiera ett DNA-fragment enbart hos honor eller hanar (Milewicz och Sawicki 2013), som med de utvecklade SCAR-markörerna i papaya (Chaves-Bedoya och Nuñez 2007) och havtorn (Korekar *et al.* 2012). Närvaron av amplifierat DNA-fragment efter en PCR ger svar på om plantan är en hona eller hane.

En fördel med denna typ av binära klassifikationstest (positivt eller negativt) är att inga bandjämförelser behöver göras, endast närvaro av amplifierad PCR-produkt är ett resultat i sig. Därmed bör tekniken lättare kunna undvika det arbetsintensiva momentet att använda sig av gelelektrofores, något som har pekats ut som ett hinder i vägen för storskalig användning (Ibitoye och Akin-Idowu 2010). PCR-baserade tekniker utan behov av gelelektrofores tillämpas i djur och människor men tekniken är ännu inte tillgänglig för växter i stor utsträckning. Ett exempel på PCR-baserad teknik utan behov av gelelektrofores och som används på växter är identifieringen av sterila hanar av lök (*Allium cepa*) med hjälp av SNP (Single Nucleotide Polymorfism) (Alcala *et al.* 1997). Allelspecifika PCR-primrar kan omvandlas till SNP-markörer (Ibitoye och Akin-Idowu 2010), vilket rättfärdigar det fortsatta utvecklandet av mikrosatelliter och SCAR-markörer.

En nackdel med ett binärt klassifikationstest är risken för ett falskt resultat. Om PCR-reaktionen av någon anledning inte fungerar kommer det att ge ett falskt negativ. Det leder då till en eventuellt felaktig könsbestämning eftersom avsaknad av amplifieringsprodukt tolkas som ett resultat. Enligt Brunings *et al.* (2010) måste åtskiljandet av genotyper ske genom att man ser på flera markörer samtidigt. Risken för ett falskt negativt resultat kan överkommas genom att markören ligger på X-kromosomen, vilken amplifieras hos både hanar och honor. Denna teknik kan utnyttjas med både mikrosatellitmarkörer och SCAR-markörer. Om SCAR-markören som Chaves-Bedoya och Nuñez (2007) utvecklade skulle ha varit X-

kromosomspecifik istället för Y-kromosomspecifik skulle denna metod ha haft en inbyggd kontroll mot misslyckade PCR-reaktioner. Genom att honor skulle ge två amplifieringsprodukter (två X-kromosomer) och hanar en amplifieringsprodukt (en X-kromosom) skulle inga hanar undgå detektion. Med en X-kromosomspecifik markör kan därför en misslyckad PCR-reaktion identifieras. Detta är mer önskvärt jämfört med en Y-kromsomspecifik markör där hanar kan undgå detektion vid en misslyckad PCR-reaktion och leda till en onödig investering i termer av vatten och gödning som skulle ges till hanplantorna (Jakse *et al.* 2008).

Ett ännu säkrare sätt som dessutom kan identifiera hermafroditer är att använda sig av en markör som amplifieras på både X-kromosomen och Y-kromsomen men där en specifik längd på amplifieringsprodukten står för könsbestämningen. Nackdelen med denna metod är att gelelektrofores krävs för att jämföra amplifieringsprodukternas storlek.

Jakse *et al.* (2007) använde sig av inbyggd kontroll när de identifierade en mikrosatellitmarkör som kunde skilja på honplantor och hanplantor av humle. Två amplifieringsprodukter gavs av honor och av hanar men det var enbart hos hanar som det fanns en amplifieringsprodukt av längden 210 baspar. Genom att jämföra bandbredder kunde honor och hanar skiljas åt men även hermafroditer kunde urskiljas. Hermafroditer gav tre amplifieringsprodukter i PCR-reaktionen, ett av dessa band var det hanligt associerade med längden 210 baspar. En misslyckad PCR-reaktion skulle med denna inbyggda kontroll kunna identifieras genom avsaknaden av amplifieringsprodukter.

SCAR-markörer kan även de användas genom att detektera deras längdpolymorfism (Paran och Michelmore 1993) men denna användning är inte utbredd inom könsbestämning (Milewicz och Sawicki 2013). Ett exempel på en SCAR-markör med potentiell könsbestämningsförmåga genom identifikation av längdpolymorfism är den som har utvecklats av Lee *et al.* (2010). Den har utvecklats för att upptäcka sterilitet hos hanliga chiliplantor inom växtförädlingsarbetet men visar att längdpolymorfism kan användas även för SCAR-markörer.

Styrkor och svagheter hos mikrosatelliter och SCAR

Utvecklandet av mikrosatelliter i kodande regioner (EST-mikrosatelliter) har en fördel gentemot SCAR-markörer då en utvecklad EST-mikrosatellit, med lite tur, kan användas på närbesläktade arter. Ett sådant exempel är utvecklingen av PCR-primrar till vete (*Triticum aestivum*) där 55,12 procent av de utvecklade PCR-primrarna (78 stycken) visade sig vara användbara även i korn (*Hordeum vulgare*), vilket visar att EST-mikrosatelliter kan vara konserverade över artgränserna (Gupta *et al.* 2003). Utvecklingen av EST-mikrosatelliter får därmed ett högre värde jämfört med SCAR-markörer då resultatet kan bli mer användbart eftersom EST-mikrosatelliter potentiellt kan användas i flera närbesläktade arter. De exempel på mikrosatellitmarkörer som används för könsbestämning som har diskuterats i denna text har inte varit isolerade från EST-databaser.

Identifiering av RAPD-markörer som leder fram till SCAR-markörer kan låta enkelt då man använder sig av randomiserade primrar för att hitta könsspecifika amplieringsband. I praktiken kan man dock behöva testa ett stort antal RAPD-primrar innan man lyckas identifiera ett könsspecifikt band. I Chaves-Bedoya och Nuñez (2007) behövdes det bara 32 RAPD-primrar för att identifiera ett hanspecifikt fragment i papaya. I jämförelse krävdes det över 700 RAPD-primrar för att identifiera två SCAR-markörer (som amplifierade samma

fragment) som kunde skilja honplantor från hanplantor i en viss korsning av sparris (*Asparagus officinalis* L.) (Jiang *et al.* 2007).

Generella styrkor och svagheter med PCR-baserade tekniker

Att använda sig av PCR-baserad teknik har sina fördelar och nackdelar. Både SCAR-markörer och mikrosatellitmarkörer kräver sekvenseringsdata för att primrar ska kunna designas, vilket är en nackdel jämfört med RAPD-markörer där randomiserade primrar används.

Två ytterligare användbara tekniker vid könsbestämningssammanhang som inte kräver sekvensdata är RFLP (Restriction Fragment Length Polymorfism) och AFLP (Amplified Fragment Length Polymorfism) (Milewicz och Sawicki 2013). Vid RFLP används restriktionsenzym med målet att få könsspecifika bandstrukturer och vid AFLP används restriktionsenzymer för att få fram fragment av en viss längd som senare amplifieras av randomiserande primrar (Kumar *et al.* 2009). Bägge dessa tekniker kräver stor massa framrenat DNA (Kumar 2009). AFLP har visat sig vara mycket kraftfullt då en mängd information fås av varje gelelektrofores med efterföljande sekvensering och denna teknik kan efterföljas med utvecklandet av SCAR-markörer (Noguera *et al.* 2005). Renheten och mängden DNA som krävs innebär däremot att PCR-baserade tekniker har fler fördelar jämfört med RFLP och AFLP vid storskalig användning inom det kommersiella jordbruket.

Antalet mikrosatelliter som karaktäriseras ökar hela tiden och därmed minskas den initiala kostnaden för dem som vill använda sig av mikrosatellitmarkörer då de inte behöver identifieras *de novo* (Kalia *et al.* 2011). Dessutom medför den växande mängden sekvensdata nya, mer kostnadseffektiva lösningar att identifiera mikrosatelliter *de novo* (Varshney *et al.* 2005). Detta förminskar de nuvarande nackdelarna med mikrosatelliter.

Slutsats

Det finns två huvudvägar att gå i utvecklandet av PCR-baserade könsbestämningstekniker. Den första är att använda sig av en binär typ av markör som antingen amplifieras eller inte hos ett visst kön. Denna typ av markör bör kombineras med flera markörer för att undvika falska negativa resultat vid misslyckade PCR-reaktioner. Den andra huvudvägen är att använda sig av en markör som ger amplifieringsprodukt hos både hanar och honor men där antalet amplifieringsprodukter eller en specifik längd på amplifieringsprodukten står för könsspecificiteten. Denna typ av markör har i dagsläget nackdelen att en gelelektrofores krävs för att tolka resultatet av PCR-reaktionen. Den första vägen utnyttjas oftast av SCAR-markörer (Milewicz och Sawicki 2013) och den andra vägen av mikrosatellitmarkörer men båda har potential för bägge tillämpningarna.

Det finns mer effektiva tekniker, som SNP-baserade PCR-tekniker, men dessa är inte kostnadseffektiva i nuläget (Tyrka *et al.* 2008). Sivolat (2011) påpekar att kostnaden för utvecklingen och användningen av genetiska markörer utgör ett allvarligt problem. I utvecklandet av nya grödor med hjälp av genetiska markörer är mikrosatelliter det bästa alternativet i dagsläget (Tyrka *et al.* 2008). Om man sammanslår dessa slutsatser från Sivolap (2011) och Tyrka *et al.* (2008) återstår att mikrosatelliter är ett bra alternativ bland sämre men att tekniken behöver bli billigare. En vision Ibitoye och Akin-Idowu (2010) uttrycker är att kunna automatisera utvinnandet av DNA ur löv och integrera detta i PCR-reaktionen. Denna förenkling av tekniken, i synnerhet om man samtidigt lyckas hitta ett alternativ till gelelektrofores, skulle öka användbarheten och därmed efterfrågan. En ökad försäljning av tekniken skulle troligen leda till en prissänkning (lägre produktionskostnad per enhet) vilket ytterligare ökar intresse för tekniken.

Ett återkommande tema i flera sammanfattningsartiklar om framtiden för genetiska markörer (Ibitoye och Akin-Idowu 2010, Cobb *et al.* 2013) är den nuvarande bristen på samarbete mellan olika expertisgrupper. Samverkan mellan växtförädlare, ingenjörer, kemister och biologer pekas ut som essentiellt för att utveckla nya tekniker, förbättra befintliga och att få de befintliga och framtida teknikerna ut i praktisk, kostnadseffektivt och storskalig användning.

Tack

Jag vill tacka min handledare Andreas Ödeen för synpunkter och förslag under skrivprocessen samt Markus Hiltunen och Henrik Karlsson för deras värdefulla åsikter och tankar kring arbetet.

Referenser

Alcala J, Giovannoni JJ, Pike LM, Reddy AS. 1997. Application of genetic bit analysis (GBA™) for allelic selection in plant breeding. Molecular Breeding **3**: 495–502.

Bohra A. 2013. Emerging paradigms in genomics-based crop improvement. The Scientific World Journal 2013: 1–17.

Bonny S. 2013. Why are most Europeans opposed to GMOs? Electronic Journal of Biotechnology **6**: 50–71.

Brunings AM, Moyer C, Peres N, Folta KM. 2010. Implementation of simple sequence repeat markers to genotype Florida strawberry varieties. Euphytica **173**: 63–75.

Cha TS, Anne-Marie K, Chuah TS. 2014. Identification and characterization of RAPD–SCAR markers linked to glyphosate-susceptible and -resistant biotypes of *Eleusine indica* (L.) Gaertn. Molecular Biology Reports **41**: 823–831.

Chabane K, Ablett GA, Cordeiro GM, Valkoun J, Henry RJ. 2005. EST versus genomic derived microsatellite markers for genotyping wild and cultivated barley. Genetic Resources and Crop Evolution **52**: 903–909.

Chaves-Bedoya G, Nuñez V. 2007. A SCAR marker for the sex types determination in Colombian genotypes of Carica papaya. Euphytica **153**: 215–220.

Cobb JN, DeClerck G, Greenberg A, Clark R, McCouch S. 2013. Next-generation phenotyping: requirements and strategies for enhancing our understanding of genotype–phenotype relationships and its relevance to crop improvement. Theoretical and Applied Genetics **126**: 867–887.

Ellegren H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. Nature Reviews Genetics 5:435–445.

Jacobsen SE, Sørensen M, Pedersen MP, Weiner J. 2013. Feeding the world: genetically modified crops versus agricultural biodiversity. Agronomy for Sustainable Development **33**: 651–662.

Jiang C, Sink KC. 1997. RAPD and SCAR markers linked to the sex expression locus M in asparagus. Euphytica **94**: 329–333.

Gilmore S, Peakall R. 2003. Isolation of microsatellite markers in *Cannabis sativa* L. (marijuana). Molecular Ecology Notes **3**:105–107.

Gupta PK, Rustgi S, Sharma S, Singh R, Kumar N, Balyan HS. 2003. Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat. Molecular Genetics and Genomics **270**: 315–323.

Holton TA, Christopher JT, McClure L, Harker N, Henry RJ. 2002. Identification and mapping of polymorphic SSR markers from expressed gene sequences of barley and wheat. Molecular Breeding **9**: 63–71.

Ibitoye DO, Akin-Idowu PE. 2011. Marker-assisted-selection (MAS): A fast track to increase genetic gain in horticultural crop breeding. African Journal of Biotechnology **10**: 11333–11339.

Jakse J, Stajner N, Kozjak P, Cerenak A, Javornik B. 2008. Trinucleotide microsatellite repeat is tightly linked to male sex in hop (*Humulus lupulus* L.). Molecular Breeding **21**: 139–148.

Kalia RK, Rai MK, Kalia S, Singh R, Dhawan AK. 2011. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. Euphytica **177**: 309–334.

Kantey RV, La Rota M, Matthews DE, Sorrells ME. 2002. Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. Plant Molecular Biology **48**: 501–510.

Korekar G, Sharma RK, Kumar R, Meenu, Bisht NC, Srivastava RB, Ahuja PS, Stobdan T. 2012. Identification and validation of sex-linked SCAR markers in dioecious *Hippophae rhamnoides* L. (Elaeagnaceae). Biotechnology Letters **34**:973–978.

Kumar P, Gupta VK, Misra AK, Modi DR, Pandey DR. 2009. Potential of molecular markers in plant biotechnology. Plant Omics Journal **2**: 141–162.

Lee J, Yoon B, Han JH, Lee WP, Do JW, Ryu H, Kim SH, Park HG. 2010. A codominant SCAR marker linked to the genic male sterility gene (ms1) in chili pepper (*Capsicum annuum*). Plant Breeding **129**: 35–38.

Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. Molecular Ecology **11**: 2453–2465.

Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E. 2004. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. Molecular Biology and Evolution **21**: 991–1007.

Mandolino G, Carboni A, Forapani S. 1999. Identification of DNA markers linked to the male sex in dioecious hemp (*Cannabis sativa* L.). Theoretical and Applied Genetics **98**: 86–92.

Metzgar D, Bytof J, Wills, C. 2000. Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA. Genome Research **10**: 72–80.

Meyer W, Mitchell TG, Freedman EZ, Vilgalys R. 1993. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. Journal of Clinical Microbiology **31**: 2274–2280.

Milewicz M, Sawicki J. 2013. Sex-linked markers in dioecious plants. Plant Omics Journal **6**: 144–149.

Noguera FJ, Capel J, Alvarez JI, Lozano R. 2005. Development and mapping of a codominant SCAR marker linked to the andromonoecious gene of melon. Theoretical and Applied Genetics **110**: 714–720.

Paran I, Michelmore RW. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. Theoretical and Applied Genetics **85**: 985–993.

Parasnis AS, Ramakrishna W, Chowdari KV, Gupta VS, Ranjekar PK. 1999. Microsatellite (GATA)n reveals sex-specific differences in Papaya. Theoretical and Applied Genetics **99**: 1047–1052.

Parida *et al*. 2009. Informative genomic microsatellite markers for efficient genotyping

applications in sugarcane. Theoretical and Applied Genetics **118**: 327–338.
Poczai P, Varga I, Laos M, Cseh A, Bell N, Valkonen J, Hyvönen J. 2013. Advances in plant gene-targeted and functional markers: a review. Plant Methods **9**: 1–32.
Powell W, Machray GC, Provan J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. Trend in Plant Science **1**: 215–222
Ray DK, Mueller ND, West PC, Foley JA. 2013. Yield trends are insufficient to double global crop production by 2050. PLoS ONE doi 10.1371/journal.pone.0066428.
Renner SS, Ricklefs RE. 1995. Dioecy and its correlates in the flowering plants. Trend in Plant Science **82**: 596-606.
Rode J, In-Chol K, Saal B, Flachowsky H, Kriese U, Weber WE. 2005. Sex-linked SSR markers in hemp. Plant Breeding **124**: 167–170.
Schierwater B, Ender A. 1993. Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products. Nucleic Acids Research **21**: 4647–4648.
Sivolap Y. 2011. Molecular markers and plant breeding. Cytology and Genetics **47**: 188–195.
Stajner N, Jakse J, Kozjak P, Javornik B. 2005. The isolation and characterisation of microsatellites in hop (*Humulus lupulus* L.). Plant Science **168**: 213–221.
Thiel T, Michalek W, Carshney RK, Graner A. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). Theoretical and Applied Genetics **106**: 411–422.
Tilman D, Balzer C, Hill J, Befort BL. 2011. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. PLOS 108:20260–20264.
Tyrka M, Perovic D, Wardynska A, Ordon F. 2008. A new diagnostic SSR marker for selection of the Rym4/Rym5 locus in barley breeding. Journal of Applied Genetics **49**: 127–134.
Varshney RK, Graner A, Sorrells ME. 2005. Genic microsatellites markers in plants: features and applications. Trends in Biotechnology **23**: 48–55.
Yang L, Fu S, Khan A, Zeng W, Fu J. 2013. Molecular cloning and development of RAPD-SCAR markers for *Dimocarpus longan* variety authentication. Springer Plus **2**:501.
Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. Molecular Ecology **11**: 1–16.