

SAKREDOVISNING, 2008

Genetisk variation hos kulturrosor anpassade för svenskt klimat

Dnr: 25-10198/06, 25-10893/07

Ulrika Carlson-Nilsson
SLU, Växtförädling och Bioteknik, Balsgård
Fjälkestadsvägen 459, 291 94 Kristianstad

Målsättning

Sverige har förbundit sig att, inom det nationella programmet Programmet för Odlad Mångfald (POM), bevara och hållbart nyttja bland annat de svenska kulturrosorna. Riksomfattande inventeringar för kulturrosor påbörjades 2005 och arbetet planeras fortsätta åtminstone till och med 2010. En av POMs målsättningar är att bevara största möjliga biologiska mångfald av dessa kulturrosor i en eller flera genbanker.

Inom det aktuella projektet är målsättningen att:

- 1) underlätta identifierings- och klassificeringsarbetet av okända kulturrosor i den nationella rosinventeringen
- 2) studera den genetiska variationen i det insamlade materialet för att få vägledning kring hur urvalet bäst skall göras angående hur många och vilka rosor som bör ingå i den slutliga nationella genbanken.

Inledning

Redan under inventeringens första år visade det sig att många av de funna genotyperna var näst intill omöjliga att sortbestämma enbart med hjälp av morfologiska karaktärer. Från och med hösten 2006 planteras på en provodling på Fredriksdals friluftsmuseum, Helsingborg, därför kontinuerligt rotskott från de genotyper som inte kunnat identifieras vid inventeringarna. Här kommer de att studeras ingående under samma klimat- och växtbetingelser. Genom det aktuella SJV-finansierade projektet (Dnr: 25-10198/06, 25-10893/07) inleddes 2007 ett samarbete med POM för att som ovan nämnts bland annat underlätta identifieringen av dessa okända genotyper.

Under projektets första verksamhetsår (2007) påbörjades första steget av projektet vilket innebär att DNA-profiler tas fram för olika kända sorter och sortgrupper av äldre kulturrosor. För detta arbete används så kallade mikrosatellit-markörer. Dessa robusta och i hög grad polymorfa markörer har på senare år utvecklats till ett allt viktigare verktyg för sortidentifiering och kartering av referenssamlingar av olika organismer. Detta är anledningen till att just denna teknik valdes för att ta fram DNA-profiler för rosorna. Den vunna kunskapen samlas i en referenssamling – en DNA-databas. I dag finns ännu ingen allmänt tillgänglig databas för rosor vare sig nationellt eller internationellt. De nu framtagna DNA-profilerna är därför ett första steg i uppbyggnaden av en större nationell databas för äldre kulturrosor. Genom att använda samma mikrosatellit-markörer som används av internationella

forskare finns även möjligheter till ett framtida internationellt samarbete och jämförelser med sorter i en framtida europeisk databas för äldre kulturrosor.

I referenssamlingen ingår olika speciellt betydelsefulla sorter i kulturrosornas släkträd och målsättningen är att sorterna skall fungera som referenser till de okända sorter som samlas in vid inventeringen samtidigt som släktskapet mellan de olika genotyperna skall kunna kartläggas i möjligaste mån. Möjligheten finns även att karteringsarbetet kan resultera i upptäckten av DNA-markörer unika för någon eller några av de viktigaste sortgrupperna av rosor (till exempel Alba-, Bourbon-, Centifolie-, Damascener- och Gallica-rosor). En sådan upptäckt skulle bli ett mycket värdefullt verktyg och ett komplement till traditionella morfologiska studier för att avgöra var gränserna mellan enskilda sortgrupper går.

Under 2008 startade projektets andra fas som innebär att samma mikrosatellit-markörer som använts till referenssamlingen används för att analysera de genotyper som i inventeringen visat sig omöjliga att artbestämma enbart med hjälp av morfologiska karaktärer. Genom att ta fram DNA-profiler för dessa genotyper och göra jämförelser med DNA-profilerna i referensdatabasen från 2007 års arbete kommer klassificeringsarbetet att underlättas. Målsättningen är att flertalet av de okända genotyperna skall kunna bestämmas till sort eller åtminstone till sortgrupp. Även i de många fall där de morfologiska skillnaderna mellan olika inventerade genotyper är små, kommer DNA-data från enskilda plantor att vara till god hjälp vid sortidentifieringen. De samlade resultaten kommer samtidigt att vid projektets slut, när samtliga okända genotyper analyserats, ge en god bild av den genetiska variationen i materialet. Med utgångspunkt från dessa resultat kan värdefull information ges om hur en eller flera framtida nationella genbanker skall utformas för att diversiteten i de svenska kulturrosorna på bästa sätt skall kunna bevaras. Resultaten kommer även att vara vägledande vid urvalet av de framtida mandatsorterna för rosor.

Material och metoder

2007

I samråd med Lars-Åke Gustavsson och POMs inventeringssektariat bestämdes vilka arter/sorter som skulle ingå i referenssamlingen.

Unga späda blad utan synliga angrepp av insekter eller svampar samlades in sommaren 2007 från de 160 utvalda genotyperna. Flertalet genotyper samlades in på Fredriksdals rosarium och de genotyper som saknades där plockades från olika lokaler i Skåne samt på Cedergrens plantskola, Råå. Bladen förvarades kallt i kylväska tills de kunde placeras i kylskåp (cirka + 5-7 °C). DNA extraherades från bladen med hjälp av "eZNA Plant DNA Kit". Extraktionerna gjordes inom 2-3 dygn från insamlingstillfället.

Tio olika holländska primer-par, speciellt utvecklade för rosor, användes sedan för att genom PCR-teknik amplifiera specifika mikrosatellit-sekvenser i DNAt. Storleken på dessa mikrosatellit-fragment för respektive primer-par och genotyp bestämdes därefter med hjälp av kapillär-elektrofores (köpt tjänst, Swegene, Malmö).

Genom varje genotyps specifika uppsättning av mikrosatellit-fragment för de tio olika primer-paren togs en DNA-profil fram för respektive genotyp. Detta gjordes med hjälp av dataprogrammet "GeneMapper".

Genom att konstruera en binär databas utifrån förekomst (1) eller avsaknad (0) av de olika förekommande fragmentlängderna har även ett dendrogram (släkttrod) för dessa kända genotyper konstruerats med hjälp av metoden UPGMA (unweighted pair-group method of arithmetic averages) i statistikprogrammet "SPSS".

2008

Växtmaterialet för 2008 års arbete inom projektet hämtades från provodlingarna på Fredriksdals rosarium, Helsingborg. Som nämndes ovan planteras där sedan hösten 2006 rotskott från de genotyper som visat sig svåridentifierade vid inventeringarna runt om i landet. Rosor som inte är villiga att skjuta rotskott vid den ursprungliga växtplatsen okuleras istället. Planteringen på Fredriksdal kommer att förlöpa efterhand som inventeringen ute i landet pågår.

Under sommaren 2008 samlades blad från de första 220 genotyperna in på samma sätt som beskrevs ovan för 2007 års bladinsamlingar. Denna gång placerades dock proverna i -80 °C istället för i kylskåp. Extraktion av DNA gjordes därefter förlöpande under sensommaren. Dock utfördes denna gång extraktionerna med hjälp av "Qiagen DNeasy Plant Mini Kit" istället för med "eZNA Plant DNA Kit" som användes vid 2007 års extraktioner. Anledningen till detta är att DNA-kvaliteten alternativt koncentrationen på flera av proverna vid 2007 års extraktioner visade sig vara allt för låg för att fungera tillfredsställande för några av primerparen.

För att kunna jämföra dessa okända genotyper med de arter/sorter som ingår i referenssamlingen har samma tio primer-par använts för att genom PCR-teknik amplifiera specifika mikrosatellit-sekvenser i DNAt. Även denna gång har de resulterande fragmenten storleksbestämts genom kapillär-elektrofores av Swegene, Malmö. Resultaten har sedan analyserats på Balsgård med hjälp av programmet "GeneMapper".

De morfologiskt svårtbestämda genotypernas DNA-profiler jämförs därefter med de i DNA-databasen redan befintliga profilerna från 2007 års undersökningar för en identifiering till sort eller åtminstone till sortgrupp. Jämförelserna görs framför allt genom att studera var de okända rosorna placerar sig i ett dendrogram tillsammans med genotyperna i referenssamlingen. Detta dendrogram konstrueras liksom tidigare med hjälp av metoden UPGMA (unweighted pair-group method of arithmetic averages) i statistikprogrammet "SPSS".

Resultat och diskussion

2007

Redan resultaten från 2007 års studier av de 160 kända genotyperna i referenssamlingen visar en tydlig genetisk variation bland de olika genotyperna när de tio olika primer-paren används. Detta gör det möjligt att ta fram unika DNA-profiler för flertalet av arterna/sorterna. Samtliga 160 genotyper har i nuläget analyserats med alla tio primer-paren. Preliminära tolkningar, gjorda tillsammans med Lars-Åke Gustavsson, av resultaten från studierna av referenssamlingen rapporterades i "Sakredovisning, 2007".

Av de genotyper där inget resultat kunde fås för något av de tio primer-paren vid 2007 års analyser insamlades nytt växtmaterial under sommaren 2008 och nytt DNA extraherades med "Qiagen DNeasy Plant Mini Kit". Fortfarande finns dock tyvärr enstaka genotyper som inte

fungerat tillfredsställande för en eller ett av par primer-paren och där följaktligen resultat saknas för att en fullständig DNA-profil skall kunna tas fram. Vi kommer att analysera om dem ytterligare en gång under våren 2009, då med högre koncentration på DNAt.

2008

DNA från samtliga 220 genotyper från 2008 års insamling har i nuläget amplifierats med samtliga tio primer-par. Alla proverna har också storleksbestämts med hjälp av kapillär-elektrofores. Liksom vid 2007 års analyser har vissa av genotyperna inte gett tillfredsställande resultat i kombination med ett par av primer-paren. Tyvärr har vi inte inom ramen för 2008 års projekttid hunnit upprepa dessa körningar för att se om bättre resultat kan erhållas exempelvis vid högre DNA-koncentration. Detta kommer att dock att göras snarast möjligt och det är vår målsättning att dessa resultat skall vara klara i god tid före starten av inventerarnas insamlingsarbete säsongen 2009. Det har också visat sig att en del av resultaten från storleksbestämningen är mycket svårtolkade delvis beroende på rosornas varierande ploidalitet. Arbetet med att ta fram det slutliga dendrogrammet baserat på samtliga tio primer-par och 160+220 genotyper har därför försenats men kommer också att färdigställas under våren.

Preliminära resultat

Vid rosinventerarnas höstträff i Vårdsnäs, 25-26 oktober 2008, redogjordes tillsammans med Lars-Åke Gustavsson för projektet och de hittills uppnådda resultaten. Dessa baseras på de fyra primer-par som är lättast att tolka och de genotyper som fungerat utan tveksamheter. Intresset från åhörarna var mycket stort och det var tydligt att man ser fram emot en fortsättning på projektet där ytterligare okända genotyper från inventeringen kommer att analyseras på samma sätt. De resultat som presenterades vid träffen bifogas i ett dendrogram i Bilaga C 1-6.

Även om dessa resultat baserades på enbart fyra av de tio primer-paren kunde värdefulla resultat noteras. De hittills erhållna resultaten föranleder omedelbara förändringar i de kommande årens inventeringsstrategi. De vunna kunskaperna får därför praktisk betydelse för det fortsatta inventeringsarbetet och senare för etableringen av POMs genbank av svenska kulturrosor. Enligt Lars-Åke Gustavsson har POMs genetiska studier redan gett helt ny kunskap om de äldre kulturrosornas variation och släktskap, vilket på sikt – när hela rosinventeringen avslutats och utvärderats – kommer att medföra att delar av rosornas släkträd måste skrivas om.

Ingen enda av de under inventeringen funna kulturrosorna är i de preliminära resultaten genetiskt identisk med någon av de 160 handelssorter och arter från vår tid som undersöktes under 2007. De tidigare undersökta 160 arterna och sorterna, som odlas på Fredriksdal, har inköpts i två plantskolor, Cedergrens på Råå och Valdemar Petersens plantskola på Själland. Detta synnerligen anmärkningsvärda resultat väcker en rad intressanta frågor inom skilda områden. En aspekt rör de funna kulturrosornas historia i Sverige och deras introduktion i svenska trädgårdar. Varifrån kom vårt lands funna kulturrosor och när introducerades de i Sverige? Varför skiljer sig de funna POM-rosorna sig så markant från dagens sortiment i svenska plantskolor?

I den följande texten rapporteras om några särskilt intressanta resultat som dragits från det preliminära dendrogrammet. Två studerade insamlingar av albarosor är klart genetiskt skilda från vad projektet med stor sannolikhet anser är 'Alba Maxima' respektive 'Maiden's Blush'. Resultatet indikerar att albarosorna är mer genetiskt variabla än vad som hittills varit känt,

vilket stöds av de morfologiska skillnader som ofta diskuteras mellan inventerarna och rosarianer över hela jordklotet. Det ska i det fortsatta arbetet bli intressant att se om ”POM147” och ”POM148” kommer att förbli genetiskt identiska eller visa sig vara två skilda kloner som inventeraren angett.

Sorten ’Aimable Amie’ i Gallica-gruppen skiljer sig genetiskt markant från många fynd som vid inventeringarna identifierats som rosor av ’Aimable Amie’-typ. Någon genetisk skillnad mellan olika fynd som klassificerats som gallicarosor av ’Aimable Amie’-typ har inte kunnat påvisas. Morfologiska data antyder dock att det finns minst två distinkta kloner av ’Aimable Amie’-typ. Finns det ett vedertaget sortnamn för de funna ’Aimable Amie’-typerna? Frågan kan inte besvaras i dag.

Resultaten av de många ”POM-rosorna” som redovisas på dendrogrammets andra och tredje sidor klargör en mycket stor genetisk variation som också återspeglas av dessa rosors morfologi. Rosorna på andra sidan är morfologiskt svåra att föra till en vedertagen sortgrupp och består uppenbarligen till största delen av sorter med ursprung i både Gallica-gruppen och Damascena-gruppen. I detta material faller enskilda kloner inom några få undergrupper och det finns åtskilliga genetiskt identiska plantor. En liten intressant iakttagelse i detta material, rosen ”POM3” från Vrigstad i Småland är identisk med en ros som påträffades i Sigtuna, ”POM33”, där den bär namnet ”Vrigstadrosen”.

En mycket distinkt grupp om tre rosor, ”POM6”, ”POM9” och ”POM36”, har av inventerarna klassificerats som albarosor. De är uppenbarligen hybrider mellan ursprungliga, vitblommade albarosor och rosablommade sorter i andra sortgrupper.

Från de nedre sorterna på andra sidan i dendrogrammet till och med ”POM113” nedanför mitten på tredje sidan utgörs de funna rosorna av distinkta och typiska rosor i Gallica-gruppen. De fördelar sig i några få mindre undergrupper, som på den analyserade nivån, innehåller flera genetiskt identiska plantor. Utöver de ovan kommenterade ’Aimable Amie’-typerna ska här framhållas att den genetiska variationen inom vad inventerarna benämnt ”Zinnia-gallica”, ”POM8”-”POM129” är oväntat stor. Även i detta material finns några dublettplantor.

Något nedom mitten på tredje sidan visar de hittills genomförda analyserna att några rosor som inventerarna identifierat som centifoliarosor mycket väl ansluter till några kända och i handeln förekommande centifoliarosor.

Två funna bourbonrosor, ”POM60” och ”POM78”, uppvisar släktskap med den kända sorten ’Parkziede’ i Bourbon-gruppen. På morfologiska grunder har inventerarna hittills ansett att de två funna bourbonrosorna har ett nära släktskap med ’Great Western’. Dess placering i dendrogrammet, längst ned på första sidan, talar dock emot detta antagande.

Analyserna av inventeringens sorter i Spinosissima-gruppen grupperar sig väl blandade med de i handeln förekommande sorterna (se dendrogrammets femte sida). Få dublettplantor förekommer inom sortgruppen. Intressant är att två gulblommiga sorter, ”POM35” och ”POM41”, faller inom dendrogrammets förtecknade sorter som hör till Spinosissima-gruppen. Gulblommiga hybrider mellan sorter i Spinosissima-gruppen och Foetida-gruppen klassificeras av tradition i Foetida-gruppen. Det erhållna resultatet visar dock att de två nämnda POM-plantorna inte är identiska med någon undersökt sort i Foetida-gruppen, vilket inventerarna antagit, och att en placering av dem i Spinosissima-gruppen vore mera relevant.

Slutligen ska framhållas att de undersökta plantorna med tydliga Rugosa-karaktärer, vilket för övrigt gäller både kända handelssorter och funna POM-rosor, faller inom två väl skilda undergrupper i dendrogrammet. En återfinns på dendrogrammets femte sida (något nedom mitten) medan den andra återfinns på sista sidan, från 'Hansa' till 'Roseraie de l'Hay'. Resultatet är oväntat och behöver ytterligare studeras.