

**Genetisk och morfologisk variation hos äldre,
enkla påskliljor, *Narcissus pseudonarcissus*,
från södra Sverige**

**Genetic and morfological diversity in old, single blooming Lent lilies,
Narcissus pseudonarcissus, from southern Sweden**

Av Susanne Westerberg

**Handledare och examinerator: Prof. Roland von Bothmer
Institutionen för växtvetenskap
Sveriges Lantbruksuniversitet, Alnarp**

**”Daffodils That come before the swallow dares, and take The winds of
March with beauty”**

Shakspeare

SAMMANFATTNING	1
SUMMARY	2
INLEDNING	3
SYFTE	4
<i>NARCISSUS PSEUDONARCISSUS</i> - PÅSKLILJA	4
UTBREDNING OCH STÅNDORT	4
KLASSIFICERING	5
LIVSCYKEL	5
MORFOLOGI	6
FÖRÖKNING	7
SVAMPSJUKDOMAR, VIRUS OCH INSEKTSANGREPP	7
MOLEKYLÄRA MARKÖRTEKNIKER	7
AFLP-TEKNOLOGI	8
MATERIAL OCH METOD	11
VÄXTMATERIAL.....	11
MORFOLOGISK FAKTAINSAMLING.....	14
INSAMLING AV BLAD.....	15
DNA-EXTRAKTION	15
KVALITETSKONTROLL OCH BESTÄMNING AV DNA-KONCENTRATION	15
AFLP (AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORFISM).....	16
POLYAKRYLAMIDGEL-ELEKTROFORES	18
FÄRGNING OCH FRAMKALLNING AV POLYAKRYLAMIDGEL	19
AVLÄSNING AV GELPLATTOR.....	20
ANALYS AV DATA	20
RESULTAT	21
LANDSKAPSFLORNA	22
INFORMATION SOM ÅTFÖLJDE KOLLEKTERNA.....	22
GENETISKA DENDROGRAMMET	22
MORFOLOGISKA DENDROGRAMMET	24
JÄMFÖRELSE MELLAN DET GENETISKA OCH DET MORFOLOGISKA DENDROGRAMMET	27
DISKUSSION	28
AFLP-METODEN	28
GENETISKA DENDROGRAMMET	29
MORFOLOGISKA DENDROGRAMMET	29
JÄMFÖRELSE MELLAN DET GENETISKA OCH DET MORFOLOGISKA DENDROGRAMMET	30
BEVARANDE AV NARCISSLÖKAR	30
TACK	31
KÄLL- OCH LITTERATURFÖRTECKNING	32
LITTERATUR	32
INTERNET	33
FOTOGRAFIER OCH TECKNINGAR	33
BILAGA 1	34
STAMLÖSNINGAR FÖR DNA-EXTRAKTION.....	34
STAMLÖSNINGAR FÖR AFLP	35
KEMIKALIER/REAGENS FÖRETAG.....	36
MASKINELL UTRUSTNING LEVERANTÖR	36

SAMMANFATTNING

Trots att Sverige inte är ett land som är särskilt rikt på egna genresurser har odlingen av kulturväxter en lång historia. Som ett led i att bevara och hållbart nyttja våra kulturväxtresurser startade år 1999 det nationella Programmet för Odlad Mångfald (POM). POM är ett av de större projekt som Centrum för Biologisk Mångfald (CBM) koordinerar. Eftersom kunskapen om svenska genresurser generellt är mycket liten behövs en kunskapsuppbyggnad vad gäller exempelvis arters genetiska och morfologiska variation.

Detta examensarbete är en del av ett projekt om narcisser som koordineras av POM. Materialet skickades in av människor från sex landskap i södra Sverige, efter en uppmaning i TV-programmet "Gröna rum", våren 2000. För att studera påskliljornas (*Narcissus pseudonarcissus*) genetiska variation användes den molekylära markörtekniken Amplified Fragment Length Polymorfism (AFLP). Metoden visade sig fungera bra när det gäller de små, enkla, ofta förvildade påskliljor som ingick i detta examensarbete. De flesta narcisskollekterna visade sig vara genetiskt mycket lika, och 36 av de 43 kollekterna grupperade sig tillsammans. De rena arterna *Narcissus pseudonarcissus* och *N. lobularis* var med som jämförelse i undersökningen och dessa bildade en egen grupp. De övriga kollekterna var ensamma i sina grupper. Den kollekt som avvek mest visade sig vid blomningen vara *N. x incomparabilis*, en hybrid mellan påsk- och pingstlilja (*N. poeticus*). Detta visar att metoden kunde skilja ut de rena arterna samt hybridarten från de övriga kollekterna.

När även den morfologiska variationen hos kollekterna undersöktes, indelade de sig i sex huvudgrupper. Korrelationen mellan den genetiska och den morfologiska grupperingen var med några få undantag dålig. Då de enkla, små påskliljorna är genetiskt mycket lika är den lämpligaste metoden att skilja dessa åt, de morfologiska karaktärerna. För att kunna bevara så mycket genetisk variation som möjligt hos ett fåtal kollekt bör fler individer från samma population undersökas vad gäller inomvariationen, så att tillräckligt stort individantal bevaras.

SUMMARY

Although Sweden is not particularly rich in genetic resources, plant cultivation has a long history. As a means of preserving and allowing sustainable use of our cultivated plant resources, the National Programme for Diversity of Cultivated Plants (Programmet för Odlad Mångfald, POM) was started in 1999. POM is one of the major projects coordinated by the Swedish Biodiversity Center (Centrum för Biologisk Mångfald, CBM). Knowledge of Swedish genetic resources is generally quite scarce and increased knowledge is needed in areas such as genetic and morphological variation within species.

This thesis is one element of the narcissus project coordinated by POM. In response to a request aired in spring 2000 in the television program 'Gröna rum', material from old narcissus plantings was acquired from private individuals in six provinces of southern Sweden. To study the genetic variation of the Lent lilies (*Narcissus pseudonarcissus*), the molecular marker technique Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) was used. The method functioned well on the small, single-blooming, often wild Lent lilies included in this study. Most of the Lent lilies proved to be genetically very uniform, out of 43 accessions 36 were grouped together. The pure wild species *Narcissus pseudonarcissus* and *N. lobularis* were also included in this study as a comparison and they formed one group. The remaining accessions were alone in their groups. The accession that differed most proved to be a *N. x incomparabilis*, a hybrid between a Lent lily and a Pheasant's eye (*N. poeticus*), when it bloomed. This demonstrates that this method could separate the two pure species and the hybrid from the other accessions. Morphological variation among the accessions was also studied and they were grouped into six main groups. The correlation between the genetic and the morphological grouping was, with a few exceptions, poor. As the single-blooming, small Lent lilies are genetically very uniform the best method to separate them is with the help of morphological characteristics. The goal is to preserve the broadest genetic diversity possible in a limited number of accessions. Due to the variation within the accessions and the need to assure that a sufficient number of individuals will be preserved, further studies of accessions from the same populations are required.

INLEDNING

Det är de facto en naturlig process att arter dör ut och att nya arter utvecklas. Men de senaste tre hundra åren dör antalet arter ut med ca 1 000 gånger högre frekvens än under tidigare tidsperioder (Bothmer, 1996). Den 14/7 1992 i Rio de Janeiro, Brasilien, beslutades det om en internationell konvention om biologisk mångfald. Enligt konventionen är den nuvarande minskningen i biodiversitet i stort ett resultat av mänsklig aktivitet och representerar ett allvarligt hot mot den mänskliga utvecklingen (www.biodiv.org, 020522). Som ett led i detta har Sverige utarbetat ett nationellt program för växtgenetiska resurser. Arbetet leds av Jordbruksverket och koordineras av Centrum för Biologisk Mångfald (CBM) vilket bildades år 1994 efter ett beslut från regeringen. Målsättningen är att förverkliga Rio-konventionens innehåll d.v.s. bevara och hållbart nyttja den biologiska mångfalden. Ett av de större projekten som CBM koordinerar är Programmet för Odlad Mångfald (POM) som startade 1999. POM's syfte är att bevara och hållbart nyttja våra odlade växter.

Den genetiska variationen är avgörande för artens förmåga att anpassa sig till förändringar i miljön. Eftersom det är svårt att veta vilka egenskaper eller arter som kommer att behövas i framtiden så måste representativa prov av hela genetiska materialet bevaras. Mot den bakgrunden är det viktigt att bevara växtgenetiskt material, för när en art väl är utrotad så är den försvunnen för all framtid.

För att bedöma den genetiska variationen kan nu den traditionella morfologiska bedömningen kompletteras med molekylära markörtekniker. Därmed fås även kunskap om hur stora populationer som bör bevaras. Om den genetiska variationen är liten behöver bara ett fåtal populationer och/eller accessioner bevaras långsiktigt. Är den genetiska variationen däremot stor bör ett stort antal populationer och/eller accessioner bevaras. Dessa kunskaper är därför direkt kopplade till långsiktiga ekonomiska åtaganden. Det material som skall bevaras skall vara väl dokumenterat och denna information skall vara fritt tillgänglig.

Under år 2000 startade POM ett pilotprojekt, där tre grupper av folkkära och välkända kulturväxter provinventerades i mindre skala. De tre växtgrupperna som ingick var äldre sortmaterial, lantsorter och tidigt införda påsk- och pingstliljor (*Narcissus* L.), rosor (*Rosa* L.) och rovor (*Brassica rapa* L. ssp. *rapa*). Då prydnadsväxternas genetiska resurser är dåligt kända prioriterades denna grupp av växter. Delprojektet *Narcissus* är fokuserat på den genetiska diversiteten vilken skall karaktäriseras med hjälp av molekylära metoder. Materialet skall även dokumenteras morfologiskt med hjälp av ett trettiotal deskriptorer. Med hjälp av de erhållna resultaten skall man kunna peka ut adekvata strategier för bevarande och dokumentation för framtiden.

Narcisserna har en lång odlingshistoria i vårt land. *N. poeticus* L. (pingstlilja) finns angiven i dansk litteratur från 1530 och troligen innefattas även *N. pseudonarcissus* L. (påsklilja) (Lange, 1994). Att den har funnits i Danmark vid den tiden gör det troligt att påskliljan även fanns i de södra delarna av Sverige som vid den tiden tillhörde Danmark. De är perenna, oftast friska och långlivade lökväxter. De sprider sig lätt och finns naturaliserade på en del platser i de södra delarna av landet. Då vissa har vuxit i vårt land ända sedan i början av 1700-talet (Wallenquist, 2000) kan de bära på många värdefulla egenskaper. Detta gäller till exempel resistensgener mot olika sjukdomar.

Detta examensarbete är en del av Narcissprojektet. Arbetet har inneburit att undersöka den genetiska variationen hos de små, enkla, ofta förvildade påskliljorna med hjälp av den

molekylära markörtekniken Amplified Fragment Length Polymorfism (AFLP). De i arbetet ingående narcisserna är en del av det stora antalet narcisslökar som folk från sex landskap skickade in till de botaniska trädgårdarna i Lund och Göteborg efter ett upprop i tv-programmet "Gröna rum", våren 2000. Det insamlade materialet har undersökts av Karin Persson, vad gäller den morfologiska variationen. Dessutom har ytterligare ett examensarbete utförts, där den genetiska variationen hos en del av materialet har undersökts med hjälp av DNA-markörtekniken Randomly Amplified Polymorfism (RAPD) (Wallin, 2002). Anledningen till att AFLP valdes till detta arbete är att AFLP är säkrare och att det ger en högre upplösning än RAPD, vilket är önskvärt då de små, enkla, ofta förvildade påskliljorna utseendemässigt är mycket lika varandra.

Syfte

Syftet med detta examensarbete var att undersöka om den genetiska markörtekniken Amplified Fragment Length Polymorfism (AFLP) är användbar för att mäta den genetiska variationen hos påskliljor (*Narcissus pseudonarcissus*) genom att undersöka den genetiska variationen hos äldre, svenska, förvildade, enkla påskliljor. Dessutom jämfördes den genetiska och den morfologiska variationen hos de i undersökningen ingående kollektionerna.

Narcissus pseudonarcissus - påsklilja

Narcissus pseudonarcissus L. är påskliljans vetenskapliga namn och den är en härdig och perenn lökväxt. Den är en monokotyledon växt som tillhör familjen Amaryllidaceae (amaryllisväxter; Dahlgren et al., 1983). Till den familjen hör exempelvis även *Amaryllis* L. (amaryllis), *Leucojum* L. (snökllocka) och *Galanthus* L. (snödroppe) (Aldén et al., 1998).

På engelska heter arten Lent lily och i Tyskland har den två namn, Trompetennarzisse och Osterglocke. Det finns åtminstone två förklaringar till varför den har fått sitt vetenskapliga namn, *N. pseudonarcissus*. En förklaring är att släktnamnet *Narcissus* troligen kommer av det grekiska ordet *narkissos* som kan vara en ombildning av *narke*, som betyder bedövning, förlamning och det skulle kunna syfta på blommans bedövande doft. Det grekiska namnet användes redan av Hippocrates (Bryan, 1989). Han ses som läkekonstens fader och han levde ca 460-377 f. Kr. (Larousse de poche, 1954). Den andra förklaringen och den mer troliga är att namnet syftar på att växten innehåller ämnen som i tillräckligt stor dos är förlamande. Senare har myten om Narkissos kommit till, vilken berättar om den grekiska ynglingen Narkissos som blev så förälskad i sin egen spegelbild som han såg i en källa, att han försökte fånga den. Då han inte lyckades med detta, blev han så förtvivlad att han tog sitt liv. Gudarna förvandlade då honom till en blomma, en narciss. Artepitetet *pseudonarcissus* kommer av *pseudo* som betyder falsk, oäkta (Månsson & Johanson, 2000).

Utbredning och ståndort

De vilda påskliljorna finns i Spanien och Portugal och utbredningen sträcker sig in i Frankrike över Pyrenéerna och norrut till Storbritannien. I Belgien och i Skandinavien finns det populationer som anses vara ett resultat av naturalisering (Jefferson-Brown, 1991). Den växer i skogar, ängar och steniga marker. Då den har odlats under lång tid har den blivit naturaliserad på många platser (Bryan, 1989). Påskliljor tolererar eller föredrar jord som inte torkar ut på sommaren (Blanchard, 1990). De klarar de flesta väl-dränerade jordar bara de inte är för torra och magra. De vill växa i soliga eller lätt skuggiga lägen och deras konkurrensförmåga mot ogräs varierar mellan olika sorter (Månsson & Johanson, 2000).

Klassificering

Som ett resultat av att förädlingen av påskliljor påbörjades i större skala på 1850-talet, ökade antalet nya sorter enormt och det blev då mycket svårt att hålla reda på dessa. J. G. Baker klassificerade 1888 narcisserna i tre grupper efter petalernas (kronbladen) och bikronans längd (Baker, 1888. cit. från Jefferson-Brown, 1991). 1908 antog The Royal Horticultural Society (RHS) "Narcissus Classification Committee" en förenklad klassificering. Påskliljorna delades då in i sju grupper men eftersom denna klassificering inte blev helt accepterad, utökades klassificeringen år 1910 till att omfatta elva grupper. Detta system var efter några små ändringar i bruk till 1950. Därefter reviderades klassificeringssystemet så att det skulle bli mer logiskt, mer lättförståeligt och lättare att tillämpa. Då introducerades bl.a. färgkoder, som anger kalkbladens och bikronans färg. I princip är detta klassificeringssystem fortfarande basen för det system som reviderades 1998 och som nu är i bruk.

Idag delas narcisserna in i 13 olika grupper eller divisioner (Tabell 1) som baseras på blommans proportioner. Grupp 1-12 består endast av kulturformer. (www.rhs.org, 011217). För att ytterligare beskriva plantan anges blommans färg/färger med en bokstavskod. Exempelvis anges en blomma med gula kalkblad och vit bikrona som YW (yellow, white). Bokstäverna tas från den första bokstaven i färgens engelska namn. Den officiella klassificeringen sköts av RHS och den baseras på den beskrivning av sorten som personen som vill registrera den lämnar (Jefferson-Brown, 1991; www.rhs.org, 011217).

Tabell 1. Klassificering av *Narcissus* enligt RHS (Royal Horticultural Society)

Grupp	Gruppens namn
1	Långkroniga
2	Storkroniga
3	Småkroniga
4	Fylldblommiga
5	<i>Triandrus</i>
6	<i>Cyclaminus</i>
7	<i>Jonquilla</i>
8	<i>Tazzeta</i>
9	Pingstliljor
10	<i>Bulbocodium</i>
11	Flikkroniga
12	Övriga som inte passar in i någon av de övriga grupperna
13	Vilda arter och naturliga hybrider, t.ex. <i>N. poeticus</i> , <i>N. pseudonarcissus</i> , <i>N. x incomparabilis</i> (stjärnnarciss), <i>N. lobularis</i> (påsklilja)

Enligt Flora Europaea finns det 26 europeiska narcissarter samt 4 hybridarter. *N. pseudonarcissus* består av sju underarter (Tutin et al., 1980). Då arterna lätt korsar sig med varandra är det svårt att dra en gräns för vad som är en art och vad som är en hybridart. Detta medför en viss svårighet vid bestämningen av antalet narcissarter.

Livscykel

Varje lök går igenom en karakteristisk utvecklingscykel som börjar med dess initiering som ett meristem och slutar med blomning och eventuell frösättning. Utvecklingscykeln består av

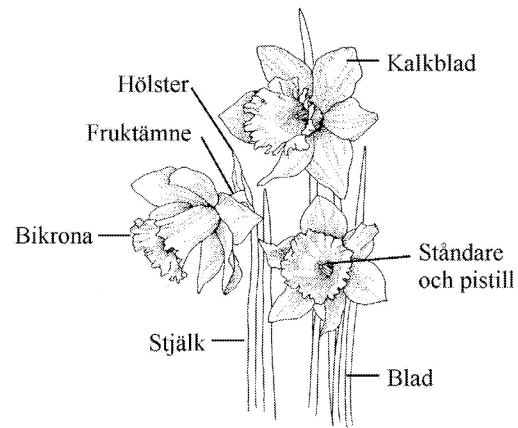
två faser, en vegetativ och en reproduktiv fas. Den vegetativa fasen innebär att den lilla löken tillväxer tills den är stor nog att orka blomma samt att löken når sin maximala vikt. Den reproduktiva fasen följer därefter och innebär att blomning induceras och initieras, blommans olika delar differentieras, blomskottet tillväxer och slutligen sker anthesis (blomning). Ibland förekommer även frösättning (Hartmann et al., 1997). Påskliljan har en perenn lök i motsats till exempelvis tulpanen, som är anuell. Påskliljans blommor utvecklas från axillära knoppar vilket medför att den apikala knoppen kan bilda blad år från år (Capon, 1997). Påskliljan fortsätter att växa från centrum av löken år från år och den producerar dotterlökar vilka kan sitta förankrade vid moderlöken i flera år innan de lossnar. Dotterlökarna måste nå en viss storlek innan de kan initiera blomanlag. Blomstorleken och kvaliteten på blomman är direkt relaterad till lökens storlek (Hartmann et al., 1997).

Morfologi

Löken är ett specialiserat underjordiskt organ som ytterst består av en tunika, lökskal som är torra och membranösa. Tunikan skyddar löken mot uttorkning och mekanisk skada. Innanför tunikan finns tjocka lökskal som dels fungerar som näringslager för löken, dels omger tillväxtpunkten. Löskalen är vid sin bas förankrade i en mycket kort tilltryckt stamdel. Hos den vilande löken finns adventivrotanlag vilka sitter på stamdelens basala del. Adventivrötter utvecklas först när löken planteras vid rätt tidpunkt och under rätt förhållanden (Hartmann et al., 1997). De många och odelade adventivrötterna börjar oftast tillväxa i augusti eller senare om jorden är mycket torr (Blanchard, 1990).

Antalet blad varierar oftast mellan ett och sex (Blanchard, 1990). Bladens längd varierar mellan 10-50 cm och bredden ca 0,5-2 cm (Bryan, 1989). Vanligast är att de är utvecklade när löken blommar. Bladen fortsätter att växa efter att blomningen är över och fortsätter en bit in på sommaren att fotosyntetisera för att löken återigen ska lagras med näring så att den kan fortleva (Blanchard, 1990). Även nästa års blomma anläggs efter blomningen. Det är därför viktigt att låta bladen vissna ner av sig själva och inte ta bort dem i förtid.

Påskliljornas blomstjälk saknar alltid blad och den är ogrenad. Den är mer eller mindre upprättväxande (Blanchard, 1990).



Figur 1. Påskliljans olika delar.

Blomman består av sex kalkblad (tepaler) vilka egentligen är tre foderblad (sepaler) och tre kronblad (petaler) (Figur 1). De dubbla formerna har fler än sex kalkblad. Kalkbladens position kan variera mellan rakt utstående, lutande och bakåtböjda. Bikronan är rörformig eller en tvär kon där den yttre kanten ofta är vidgad och ofta delad i sex lober. Hos många påskliljor är bikronan längre än kalkbladen. Innan blomman slår ut omges blomknoppen av hölsterbladet. Ståndarnas knapp är antingen vit eller gul, ståndarna är lika långa och pistillens märke är tredelat. Påskliljans blomma är epigyn, d.v.s. kalkbladen sitter ovanför fruktämnet. Då blommorna är doftande, är det troligt att de pollineras av insekter (Blanchard, 1990). Färgen på blommorna är olika gula nyanser samt vit (Månsson & Johanson, 2000). Det är

även känt att färgen på en sort kan variera beroende på klimat, väder och växtförhållanden (www.rhs.org, 011217).

Förökning

Förutom att förökning sker genom frön kan *N. pseudonarcissus* förökas vegetativt, vilket kan ske på flera olika sätt, t.ex. att bildade dotterlökar säras ifrån moderlöken eller genom stamsticklingar. Även själva löken kan delas och ge upphov till flera nya lökar. Slutligen kan odling av lökar ske med hjälp av vävnadskulturer (Hartmann, 1997). Genom att odla växtens meristem i vävnadskultur kan plantor fria från virussjukdomar produceras (Bryan, 1989; Hartmann, 1997). På så sätt rensas materialet och kvaliteten på lökarna blir den bästa möjliga eftersom virus påverkar löken negativt.

Svampsjukdomar, virus och insektsangrepp

Det är framförallt två svampar som kan ställa till problem när det gäller *Narcissus* sp. Narcissgråmögel (*Botrytis narcissicola*) är en röta som oftast börjar i rothalsen. Angrepp resulterar i att lökarna inte växer alls eller att bladen blir förvridna och delvis bruna. För att undvika angrepp bör lökarna förvaras på en plats med god luftcirkulation. Den andra svampsjukdomen är narcissfusarios eller lökröta (*Fusarium oxysporum* f.sp. *narcissi*) vilken ger upphov till en mjuk och blöt röta som ofta börjar i rotvalken. I värsta fall ruttnar löken innan den har planterats, i annat fall ses gulaktiga och dåligt utvecklade blad och dåliga blommor.

Narcisser kan angripas av minst 15 olika virus och detta ses ofta som mosaik, strimmor och fläckar på bladen. Symptomen kan maskeras vid hög temperatur. Bladlöss är vektorer för vissa virus medan andra virus kan överföras mekaniskt. Problemet med virusangrepp är att det nedsätter växtens vitalitet.

Stjälknematoden (*Ditylenchus dipsaci*) gör att plantorna ofta blir korta och missbildade. De inre lökfjällen brunfärgas vilket kan ses vid tvärgenomskärning av löken. Nematoderna sprids med smittade lökar, jord, redskap och vatten som kommit i kontakt med sjuka plantor.

Narcisskvalster (*Steneotarsonemus laticeps*) är en annan ekonomiskt betydelsefull skadegörare. Bladen skadas redan när de befinner sig i löken, när de kommer fram är de gulfläckiga och ofta sneda och trasiga. Blomknoppar och blommor är mer eller mindre förstörda. Biologisk bekämpning med tripsrovkvalstret *Amblyseius cucumeris*, kemisk bekämpning med spinnpreparat eller varmvattenbehandling vid 43 °C i två timmar är olika sätt som kan användas för att försöka komma till rätta med problemet. Narcissflugans larver (*Merodon equestris*) förstör narcisslökarna, för att komma ifrån detta kan löken varmvattenbehandlas enligt ovan (Pettersson & Åkesson, 1998). I hemträdgården brukar sjukdomar och insektsangrepp inte vara något problem utan narcisser uppfattas som friska och långlivade, däremot förekommer angrepp i kommersiell odling.

Molekylära markörtekniker

Traditionellt har morfologiska karaktärer använts för att mäta diversitet (Karp et al., 1996). Under de senaste åren har emellertid DNA-baserade tekniker gjort sitt intåg och därmed har det blivit möjligt att mäta diversiteten på gennivå. Dessa tekniker har en fördel då de synliggör en ofantlig mängd karaktärer (Karp et al., 1996). De olika molekylära teknikerna

har olika förutsättningar vad gäller t.ex. kostnader, tillförlitlighet, reproducerbarhet, teknisk svårighet, vilken DNA-mängd som krävs och antal loci som kan detekteras. Nedan följer en kort beskrivning av några av de olika teknikerna samt deras för- och nackdelar.

Restriction Fragment Length Polymorfism (RFLP) innebär att DNA klipps i bitar med hjälp av restriktionsenzymer. De erhållna fragmenten separeras med hjälp av gelelektrofores och förs sedan över till ett filter där en DNA-probe får hybridisera med DNA-fragmenten (Karp et al., 1996; Brändén, 1997). Metoden har god reproducerbarhet och är codominant d.v.s. det är möjligt att upptäcka heterozygota former. Metoden är dock tids- och kostnadskrävande och stora mängder (μg) DNA krävs (Karp et al., 1996).

Variable Number of Tandem Repeats (VNTR) bygger på att det spritt i genomet, hos högre organismer, finns hypervariabla regioner, som består av DNA-sekvenser som upprepas ett olikt antal gånger. De delas in i två klasser beroende på hur många baspar den repeterade DNA-sekvensen består av. Microsatelliter eller Simple Sequence Repeat (SSR) har sekvenser med en längd av 2-8 baspar medan minisatelliter har längre repetitiva sekvenser, 16-100 baspar. Genom att låta en probe hybridisera med dessa DNA-sekvenser kan variationer i antalet upprepningar urskiljas. Metoden har god reproducerbarhet och är codominant men utvecklingskostnaderna är höga (Karp et al., 1997).

I och med Polymeras Chain Reaction (PCR) teknikens intåg, vilken gjorde det möjligt att uppföröka DNA, utvecklades ett flertal nya metoder som baseras på denna teknik. Nackdelarna är att dessa metoder är mycket känsliga för reaktionsförhållandena, DNA-kvaliteten samt PCR-metodens temperaturprofil (Vos et al., 1995).

Randomly Amplified Polymorfism (RAPD) innebär att primrar får hybridisera med DNA. PCR körs för att uppföröka detta DNA och därefter separeras de olika fragmenten med agarosgelelektrofores. Denna teknik är snabb, enkel och förhållandevis billig. En nackdel är den dåliga reproducerbarheten. Det är en dominant markör, d.v.s. heterozygota former kan inte urskiljas (Karp et al., 1997).

Amplified Fragment Length Polymorfism (AFLP) metodens fördelar är att den detekterar ett stort antal loci (50-100), den har hög reproducerbarhet men däremot är metoden tekniskt krävande. Mot bakgrund av bl.a. dessa fördelar valdes ändå denna metod ut till detta examensarbete. Under rubriken AFLP-teknologi beskrivs tekniken mer ingående.

AFLP-teknologi

Med hjälp av AFLP-tekniken kan DNA-polymorfism visuellt påvisas mellan olika prov. Metoden är relativt ny och den utvecklades av Pieter Vos m.fl. och den beskrevs i en artikel 1995 (Vos et al., 1995).

Utgångsmaterialet för denna teknik är DNA som extraherats ur de växter som skall undersökas. Det första steget är att restriktionsenzymer tillsätts, vilka känner igen en specifik sekvens i DNA (restriction site) och när så sker, klipper DNA i bitar. Det bästa resultatet fås om två olika restriktionsenzymer används. I det redovisade arbetet används EcoR I som klipper av DNA när en kombination av sex baspar påträffas. Då chansen att träffa på just denna kombination av baspar är ganska liten sker detta inte speciellt ofta. Denna typ kallas därför för "rare cutter". Det andra restriktionsenzymet Mse I känner igen en sekvens som är fyra baspar lång, vilket medför en större chans att finna just den rätta sekvensen. Därmed

kommer detta enzym att klippa oftare och denna typ kallas för "frequent cutter". Denna kombination av enzymer ger upphov till små DNA-fragment som storleksmässigt lämpar sig för uppförökning och senare separering på polyakrylamidgel (Gibco BRL®; Karp et al., 1997).

Nästa steg innebär att dubbelsträngade adapterar med kända sekvenser sätts till de av restriktionsenzymerna klippta DNA-fragmentens båda ändar (Vos et al., 1995). Dessa adapterar ligeras (sätts på plats) med hjälp av enzymet T4 DNA-ligas. Adapterar är nödvändiga för att de primrar som sedan skall användas skall kunna kopplas på DNA-fragmenten. Härnäst sker en så kallad Preamplification Reaction vilket innebär att DNA uppförökas (Gibco BRL®). Detta sker med hjälp av tekniken PCR (Polymeras Chain Reaction) som uppfanns 1984 av Kary Mullis (Lehninger et al., 1993). Inför PCR-1 sätts till provet en primer, byggstenar i form av dNTP (deoxinukleosidtrifosfat) och *Taq* DNA-polymeras. Primerns funktion är att inkorporeras (bindas) till den kända adaptersekvensen samt till ytterligare ett baspar (selektiv nukleotid). Uppförökningen sker endast hos de fragment där primern bundit både till adaptern och till den selektiva nukleotiden. För att flera DNA-fragment skall kunna bildas krävs byggstenar i form av dNTP där N är en av de fyra kvävebaserna Adenin, Cytosin, Guanin eller Tymin. För att dessa skall kunna kopplas ihop till en ny DNA-sträng krävs enzymet *Taq* DNA-polymeras (Gibco BRL®). *Taq* DNA-polymeras är ett termostabilt enzym som kommer från bakterien *Thermus aquaticus* vilken lever i heta källor. Just dess termostabilitet gör den mycket lämpad eftersom den klarar de höga temperaturer som används i PCR-tekniken (Winter et al., 1998).

Proverna placeras i en PCR-maskin som enkelt kan beskrivas som ett värmeblock vilket kan programmeras och mycket snabbt fås att ändra temperatur. Första steget är att proverna värms till 94 °C under 30 sekunder, vilket gör att de dubbelsträngade DNA-fragmenten sårar på sig och blir enkelsträngade. Temperaturen sänks sedan snabbt till 56 °C under 60 sekunder och under denna fas bindes primern till de enkelsträngade DNA-fragmenten utan att DNA dubbelsträngen återbildas. Temperaturen höjs till 72 °C under 60 sekunder. Vid denna temperatur är *Taq* DNA-polymeras som mest aktivt och det är under detta steg som det enkelsträngade DNA-fragmentet kopieras. Enzymet ser till att byggstenarna kopplas ihop till strängar som är komplementära till de enkelsträngade DNA-fragmenten. På så sätt blir DNA-fragmenten återigen dubbelsträngade. Dessa tre steg återupprepas 20 gånger och när så skett har det erhållits en stor mängd DNA-fragment eftersom antalet ökar exponentiellt (Winter et al., 1998).

Av detta prov görs en spädning till vilken två olika primrar tillsätts. Det som önskas är primerpar som ger lämpligt antal band (inte för många men inte heller för få) och där en variation mellan de olika proverna kan ses. Återigen görs en PCR-körning (PCR-2). Till proverna sätts de två primrarna vilka i detta steg har tre selektiva nukleotider samt dNTP och *Taq* DNA-polymeras. Genom att nu använda sig av tre selektiva nukleotider kopplade till primern gör att den passar till färre DNA-fragment. Poängen med att primern passar till färre fragment är att det är bara dessa fragment som uppförökas under PCR körningen (Gibco BRL®). För varje tillägg av en selektiv nukleotid till primern, minskar antalet band ungefär fyrfaldigt (Vos et al., 1995). Om man får för många olika fragment kan inte enskilda band urskiljas på den efterföljande polyakrylamidgelen. Ett antal av 50 till 100 band är önskvärt och det är vad som kan förväntas enligt denna metod. Programmet för PCR-körningen skiljer sig något från den föregående men processerna som sker är desamma.

Efter detta steg tillsätts loading buffert till proven som återigen sätts i PCR-maskinen där de värms upp till 90°C under tre minuter för att DNA-fragmenten skall bli enkelsträngade. Proverna appliceras därefter på en polyakrylamidgel och får med hjälp av en pålagd spänning vandra längs gelen (Gibco BRL®). Loading bufferten innehåller två färgpigment som vandrar olika fort. Bromfenolblått vandrar snabbast och 15 minuter efter att den har vandrat ut från gelen avslutas elektroforesen. Xylen cyanol har vid den tidpunkten nått drygt halvvägs. Förutom att visa hur långt elektroforesen har nått, hjälper den proverna att lägga sig i brunnens botten. Principen för att olika band ska ses är att ju större fragment desto kortare bit på gelen vandrar de, medan små fragment vandrar snabbare och kommer att påträffas längre ifrån provets appliceringsställe.

Tabell 2. Sammanställning av de i arbetet ingående kollekternas odlingsplats, id-nummer, insamlingsplats samt det årtal från vilket de växt på platsen och ståndort i de fall där det angivits. L = Lund, G = Göteborg, A = Alnarp, N = Närke, H = Halland, Sk = Skåne, Sm = Småland, V = Västergötland, *N.l* = *N. lobularis*, *N.p* = *N. pseudonarcissus*, SO = sydost, SV = sydväst, ? = oklara uppgifter.

Plats	Nummer	Landskap	Ort	Angivet årtal	Ståndort
L	N.l	Belgien ->Småland	Gamleby		
G	H 14	Halland	Fagered		vild i trädgård
G	H 115	Halland	Fagered		betesbage
G	H 129	Halland	Grimeton		
G	H 78	Halland	Gällared		
G	H 177	Halland	Harplinge		
G	H 20	Halland	Krogsered	slutet av 1800	
G	H 121	Halland	Kullavik?		
G	H 189	Halland	Kungsbacka		
G	H 192	Halland	Köinge	1900	
G	H 75	Halland	Oskarström	1930	
G	H 220	Halland	Rolfstorp		sandjord
G	H 83	Halland	Slöinge	<1946	
G	H 208	Halland	Steninge-Ugglarp	1920	ängsmark
G	H 158	Halland	Veddinge	<1898	
G	H 69	Halland	Veinge		vild i trädgård
L	N 223	Närke	Bo	1700-talet	magert
A	N.p	Skåne	Alnarp		stenparti
L	Sk 191	Skåne	Ballingslöv	1850-1900	
L	Sk 119	Skåne	Hässleholm	1920	
L	Sk 26	Skåne	Lönsholma	1907 ?	
L	Sk 39	Skåne	Vittsjö	1900-1965	slutning, mo-mull
L	Sm 121	Småland	Ballabo		
L	Sm 35	Småland	Hallaryd	<1950	ängsmark
L	Sm 55	Småland	Halltorp	<1860	vild vid å
L	Sm 210	Småland	Markaryd	≤1900	gräsmatta, mossa
L	Sm 172	Småland	Reftele		SO.slutning
L	Sm 118	Småland	S Unnaryd		fuktigt/torrt
L	Sm 52	Småland	Söderåkra	<1920	
L	Sm 51	Småland	Tenhult	1920 ?	
G	Sm 41	Småland	Torsås	<1950	
L	Sm 126	Småland	Älmhult	1900	
L	Sm 187	Småland	Önnabo	1900	gräsmark
G	V 103	Västergötland	Björketorp	slutet av 1800	
G	V 59	Västergötland	Borås		
G	V 147	Västergötland	Herrljunga	1950	
G	V 63	Västergötland	Horred		
G	V 225	Västergötland	Holsljunga		
G	V 226	Västergötland	Mjölback		
G	V 102	Västergötland	Skene		
G	V 119	Västergötland	Skene-Örby	1860	SV.slutning
G	V 111	Västergötland	Ubbhult		stenrös
G	V 178	Västergötland	Vedum	1930	matjord, sand

Morfologisk faktainsamling

För att undersöka den morfologiska variationen användes ett trettiotal deskriptorer (Tabell 3). Kollektornas morfologiska variation undersöktes på deras odlingsplatser i Lund respektive Göteborg. De erhållna resultaten matades in i en textfil.

Tabell 3. De deskriptorer enligt UPOV's (International Union for the Protection of New Varieties of Plants) beskrivande sortlista för narcisser, som användes för att morfologiskt beskriva kollektorna.

Deskriptor	enhet
Blomstjälk, längd	cm
Antal blad på blommande lök	antal
Blad, längd	cm
Blad, bredd	cm
Blad, färg	1. gulgrön, 2. blekgrön, 3. grön, 4. blågrön
Vårblommande, tid	mäts i vilken dag
Blommans position i förhållande till bladen	1. under, 2. lika, 3. över
Blomskafet (pedicel), längd	cm
Blommans position	1. upprätt, 2. horisontell, 3. hängande
Blomtyp	1. enkel, 2. dubbel
Kalkbladen (perianth) – läge i relation till blomaxeln	1. starkt bakåtböjd, 2. bakåt böjd, 3. rät vinkel, 4. framåt, 5. starkt framåt
Kalkbladen – storlek på diametern (när segmenten hålls i rät vinkel till blomaxeln)	cm
Kalkbladen, position av segmenten	1. fri, 2. nuddar vid varandra, 3. överlappar
Kalkbladen - skruvade eller ej	1. Ja, 2. Nej
Kalkbladen, segmentens form	1. nästan helt äggformade, 2. nästan äggformade 3. äggformade, 4. brett äggformade 5. mkt brett äggformade
Kalkbladen olika utseende	1. Ja, 2. Nej
Kalkbladen, segmentets färg i helt utslagen blomma	RHS-färgkarta
Trumpetens längd	cm
Trumpetens form	1. platt, 2. cylindrisk, 3. klockformad, 4. urnformad, 5. konformad, 6. bägarformad, 7. skålformad, 8. kanten utböjd (listad), 9. kanterna bakåt lutande
Påskliljor, trumpetens färg	RHS-färgkarta
Trumpetens typ vid brämen	1. hel, 2. uddkantig, 3. veckad, 4. dubbelveckad
Trumpetens längd av veckningen relaterad till kronan	1. mindre än halva, 2. halva längden, 3. över hela längden
Bildas frukt och frön	1. Ja, 2. Nej
Luktar blomman	1. inte, 2. lite, 3. mycket
Ståndare och pistill	1. lika långa, 2. pistillen längre, 3. ej utvecklade, 4. ståndare i två grupper, 5. ståndare är längre
Brämens bredd	cm

Insamling av blad

Under våren 2001 samlades unga blad in (~1 dm långa). Bladen lades i plaströr vilka direkt placerades i frigolitlådor med krossad is. Direkt efter ankomst till Alnarp placerades rören i flytande kväve och sedan i -80°C. Efterhand frystorkades bladen under 3-4 dygn och därefter förvarades bladen i Eppendorfrör i -20 °C i väntan på analys.

DNA-extraktion

Den metod som användes för att isolera DNA från narcissblad var enligt T. Kamatsuda och G. L. Sun (personliga kommentarer). Det enda avsteg som gjordes enligt denna metod var att frystorkade blad användes istället för färska. För information om kemikalier, apparatur och leverantörer samt beredning av stamlösningar se Bilaga 1.

Mellan 10 och 20 mg blad mosades med hjälp av en homogenisator (RE 16, Janke & Kunkel, IKA[®] Labortechnik) tillsammans med 100 µl extraktionsbuffert (100 mM Tris-HCl med pH 8,0, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl och 10 mM 2-merkaptoetanol) i Eppendorfrör. Därefter tillsattes ytterligare 200 µl extraktionsbuffert samt 40 µl 10 % SDS (natriumdodecylsulfat), varefter allt blandades med hjälp av en vortex mixer. Rören inkuberades under 15 minuter i ett 50-60 °C vattenbad. Varefter 100 µl 5M kaliumacetat (pH 7,5) tillsattes och blandades. Rören inkuberades ~30 minuter i isvatten. Därefter tillsattes 500 µl fenol/kloroform (den undre fasen) och innehållet i röret blandades. Härfter skedde allt arbete med sterila redskap. Rören centrifugerades i fem minuter vid 12 000 rpm. Det översta skiktet fördes över till nya Eppendorfrör och 350 µl kall isopropanol tillsattes. Rören vändes försiktigt upp och ner 15 gånger för att fälla ut DNA. Därefter centrifugerades rören i 30 sekunder vid 12 000 rpm. Vätskan hälldes bort och den lilla pelleten av DNA tvättades med 350 µl 70 % etanol. Rören centrifugerades i 30 sekunder vid 12 000 rpm. Etanolen hälldes av och pelleten fick lufttorka. Därefter tillsattes 100 µl av 1 µg/ml RNase i TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0, och 1 mM EDTA pH 8,0) och detta fick inkubera 30 minuter i 65 °C vattenbad. Varefter 12 µl 3M natriumacetat (pH 5,2) tillsattes och detta blandades. Återigen tillsattes 100 µl kall isopropanol och rören vändes försiktigt 15 gånger för att fälla ut DNA. Rören centrifugerades 30 sekunder vid 12 000 rpm. Vätskan hälldes bort och pelleten tvättades med 100 µl 70 % etanol, centrifugerades i 30 sekunder vid 12 000 rpm. Vätskan hälldes av och pelleten fick återigen lufttorka. Slutligen tillsattes 50 µl 1xTE (10 mM Tris-HCl pH 8,0 och 1 mM EDTA pH 8,0). Rören inkuberades i 30 minuter i 50°C vattenbad om kvalitetskontroll av DNA med hjälp av elektrofores skulle göras direkt. Om kvalitetskontrollen däremot skulle utföras dagen därpå förvarades rören i kylskåp över natten.

Kvalitetskontroll och bestämning av DNA-koncentration

Det DNA som isolerats kontrollerades med hjälp av elektrofores. Till 2 µl prov tillsattes 4 µl sterilt H₂O och 2 µl loading buffert (0,12 % bromfenol blått, 30 % glycerol), varefter det blandades. Detta applicerades på en agarosgel (1,4 % agaros, 1xTEA (0,01 M Tris, 0,02 M isättika, 1 mM EDTA), ethidiumbromid 1 dr/50 ml buffert). Då denna agarosgel innehöll det carcinogena ämnet ethidiumbromid, skedde arbetet med största försiktighet. För att samtidigt koncentrationsbestämna DNA-halten i proverna kördes även standardiserade prover, λ-DNA med koncentrationerna 100, 150 respektive 200 ng/ml. Av λ-DNA togs 1 µl prov vilket blandades med 5 µl sterilt H₂O och 2 µl loading buffert.

Elektroforeskärlet (Mini-sub[®] cell GT, Biorad) innehöll 1xTEA buffert (0,01 M Tris, 0,02 M isättika, 1 mM EDTA) och gelen kördes i ~15 minuter vid 80 V. Gelen fotograferades med hjälp av UV-ljus och med hjälp av fotot kunde de erhållna banden inspekteras. Prover vars band var skarpa och inte för utdragna samt hade rätt position på gelen, passerade kvalitetskontrollen. Genom att jämföra provernas bandstyrka med bandstyrkan hos λ -DNA kunde koncentrationen hos proverna visuellt uppskattas. De prover som klarade kvalitetskontrollen förvarades i -20° C frys i väntan på fortsatt analys.

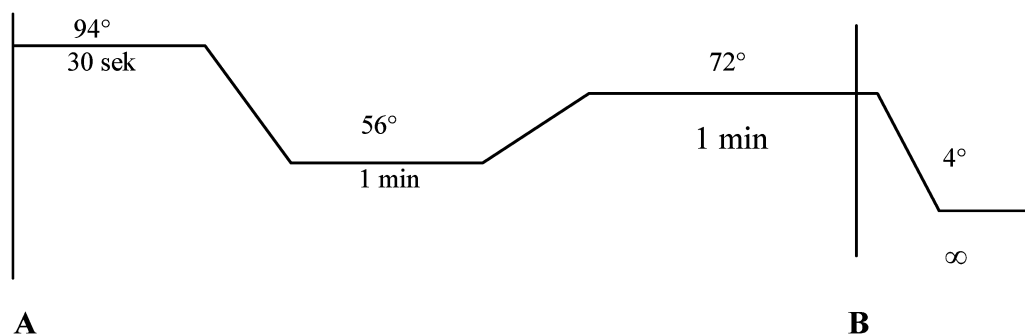
AFLP (Amplified Fragment Length Polymorfism)

De reagenser som användes var AFLP Core Reagent Kit (Gibco BRL, Life Technologies). Den metod som följdes var enligt AFLP[®] Analysis System 1 AFLP Starter Primer Kit instruktions manual (Gibco BRL, Life Technologies).

Som kontroll för att metoden fungerade, användes tomat-DNA som medföljde reagenskitet. Med hjälp av koncentrationsbestämningen av DNA togs en sådan mängd DNA-prov ut så att koncentrationen blev 250 ng. Därefter tillsattes 5 μ l 5x reaktionsbuffert samt 2 μ l EcoR/Mse 1 till DNA-proverna i Eppendorfrör. Destillerat vatten tillsattes till en slutvolym av 25 μ l. Efter försiktig blandning centrifugerades rören en kort stund. Därefter inkuberades rören vid 37°C under två timmar, följt av 15 minuters inkubering vid 70°C. Rören placerades på is och det kondens som bildats centrifugerades lätt ner. Till varje rör tillsattes 24 μ l "adapter ligation solution" och 1 μ l T4 DNA-ligas. Efter försiktig blandning och kort centrifugering, inkuberades rören under två timmar i 20 °C. Varje rör spädades 10 gånger (10 μ l prov och 90 μ l TE-buffert) vilket blandades väl. Inför den första PCR (Polymeras Chain Reaction)-körningen togs 5 μ l spätt DNA-prov vilket blandades med 40 μ l Pre-amp-primer mix, 5 μ l 10x PCR buffert, 3 μ l 25 mM magnesiumklorid och 0,2 μ l Taq DNA-polymeras (5 U/ μ l). Därefter placerades proverna i PCR-maskinen (Gene Amp[®] PCR system 9700) och PCR-1 kördes (Tabell 4 och Figur 5).

Tabell 4. Program för PCR-1 vad gäller tid och temperatur.

Steg 1	94°C	30 sek
Steg 2	56°C	1 min
Steg 3	72°C	1 min
Steg 4	gå till steg 1, 20 gånger	
Steg 5	4°C	Stand by



Figur 5. Program för PCR-1 vad gäller tid och temperatur. Stegen mellan A och B upprepas 20 gånger.

Efter den första PCR-körningen späddes de amplifierade proverna 1:50 med TE buffert (3µl prov och 147µl TE buffert). Inför nästa steg förvarades proverna i -20 °C.

Genom att kontrollköra olika kombinationer av primerpar på narcissblad kunde de väljas ut som gav önskvärt antal band och den största variationen. Till detta examensarbete utvaldes sex stycken, se Tabell 5.

Tabell 5. Primerpar som användes för AFLP analys

M CAC – E AGC	M CAC – E AAG
M CAA – E ACC	M CAG – E ACG
M CAC – E ACC	M CAT – E ACC

Inför den andra PCR-körningen (PCR-2) späddes EcoR I primern 1:1 med destillerat vatten. För mix 1 användes 5 µl av denna lösning samt 45 µl Mse I primer, denna mängd räcker för 10 prover. Till mix 2 blandades 67 µl destillerat vatten, 20 µl 10x reaktionsbuffert IV, 12 µl MgCl₂ samt 1 µl Taq DNA polymeras (5 U/µl). Även denna mängd räcker för 10 prover. Till varje brunn i en mikrotiterplatta (MicroAmp[®] Optical) sattes 5 µl prov, 5 µl mix 1 och 10 µl mix 2, varefter PCR-2 kördes (Tabell 6 och Figur 6).

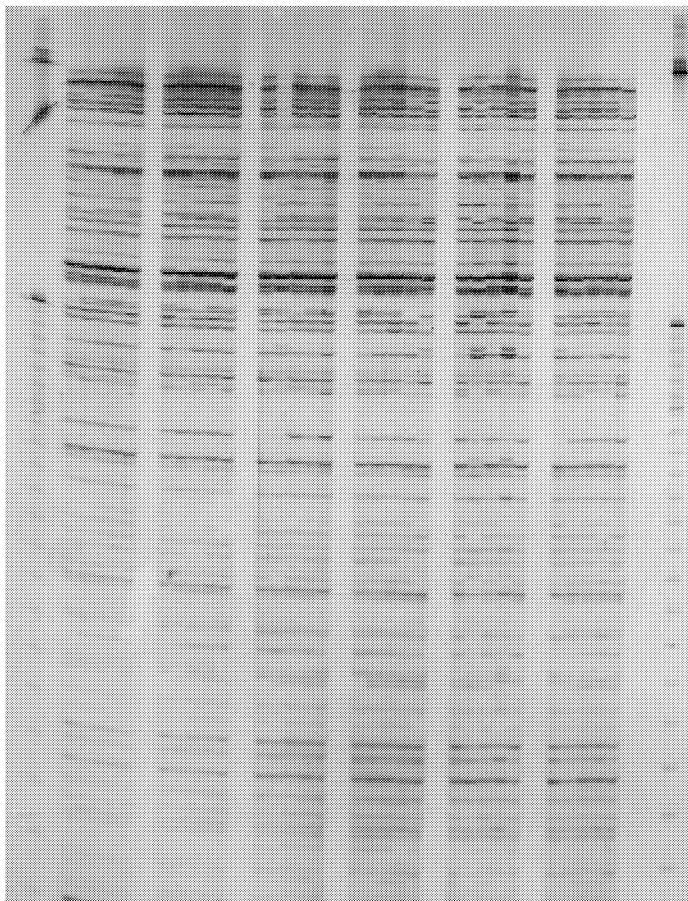
Tabell 6. Program för PCR-2 vad gäller tid och temperatur.

Steg 1	94°C	30 sek
Steg 2	65°C	30 sek
Steg 3	72°C	1 min
Steg 4	94°C	1 min
Steg 5	65°C	1 min
Steg 6 *	- 0,7°C varje cykel	Modifiera auto X, - 0,7°C
Steg 7	72°C	1,5 min
Steg 8	gå till steg 4, 13 gånger	
Steg 9	94°C	30 sek
Steg 10	56°C	30 sek
Steg 11	72°C	1 min
Steg 12	Gå till steg 9, 23 gånger	
Steg 13	4°C	Stand by

brunn tillsattes 5 µl prov. En basparsstege, DNA Ladder 30-300 bp AFLP, (Invitrogen, Life Technologies) kördes även med för att fungera som referens vid avläsning av banden och av den togs 4 µl. För att göra avläsningen av banden enklare sattes proverna fem och fem med en tom brunn emellan. Elektroforesen kördes vid 2 500 V, 80 mA och 80 W. Det tog cirka 1 timme och fyrtio minuter, den avslutades 15 minuter efter att det första färgbandet (bromfenolblått) vandrat ut ur gelen (Figur 7).

Färgning och framkallning av polyakrylamidgel

Den övre glasplattan togs bort och den undre plattan med gelen lades direkt i fixeringslösning (10 % ättiksyra) under 40 minuter. Därefter sköljdes plattan tre gånger med milliporvatten (4 + 4 + 2 minuter). Plattan placerades sedan i silverfärglösning (0,5 % formaldehyd, 1 g AgNO₃/l) under 45 minuter. Plattan sköljdes med milliporvatten i åtta sekunder. Därefter lades plattan omedelbart i kall framkallningslösning (3 % Na₂CO₃, 1 % formaldehyd, 2 mg Na₂S₂O₃/l) tills banden framträtt och var klart synliga. Reaktionen stoppades genom att plattan återigen placerades i fixeringslösningen i fem minuter. Slutligen sköljdes plattan i avjoniserat vatten under tio minuter och därefter lämnades den att lufttorka (Figur 8). Alla lösningar var rumstempererade förutom framkallningslösningen som var kylskåpskall. När gelplattan låg i de olika lösningarna var träget placerat på en skakmaskin så att lösningarna var under ständig omrörning. Därigenom försvann den film av föregående lösning som var kvar snabbare från gelplattan.



Figur 8. Exempel på en polyakrylamidgel med narcissprover körda med hjälp av AFLP-teknologi. I ytterkanterna ses basparsstegen och den använda primerkombinationen är M-CAC, E-AGC.

Avläsning av gelplattor

Avläsningen av banden på gelplattorna skedde manuellt. Eftersom det är en subjektiv bedömning om det finns eller saknas band var det en och samma person som läste av samtliga gelplattor. Fyra av gelplattorna avlästes direkt ifrån plattorna medan de övriga två avlästes från utskrifter efter att dessa plattor scannats in i dator. Detta gjordes på grund av att tillräckligt många glasplattor ej fanns. Svårigheten är att vara konsekvent då banden kan vara allt från mycket distinkta och skarpa till suddiga och svaga. Band hos de olika kollekterna som vandrat lika långt på gelen bedömdes som likvärdiga. Fanns band hos en kollekt tilldelades den värdet 1 och saknades band tilldelades den värdet 0. Endast band som var klart synliga hos alla kollekt bedömdes och medverkade till resultaten. De erhållna resultaten matades in i en textfil.

Analys av data

För att beräkna den genetiska variationen användes Shannons formel (Hutchenson, 1970). Kollektens genetiska variation beräknades enligt, $H_0 = -\sum \pi_i \ln \pi_i$, där π_i är frekvensen av fenotypen 'i'. Den genomsnittliga variationen hos 'n' olika populationer beräknades enligt $H_{pop} = 1/n \sum H_0$. Variationen hos den fenotypiska frekvensen ' π ' då alla populationer beaktas tillsammans beräknades enligt $H_{sp} = -\sum \pi \ln \pi$.

De erhållna resultaten analyserades med hjälp av programmet SIMQUAL i NTSYS-pc, version 2.1 (Rohlf, 2000). Likheten mellan kollekterna beräknades med Jaccard's koefficient (J) enligt $J = a/(n-d)$ där 'a' är antalet positiva träffar (båda kollekterna har band), 'd' är antalet negativa träffar (båda kollekterna saknar band) och 'n' är det totala bandantalet d.v.s. både antalet träffar och icke träffar. Av dessa resultat skapades ett dendrogram för att åskådliggöra de genetiska släktskapen mellan kollekterna. UPGMA (unweighted pair-group method) som använder aritmetiska medelvärden, var den metod som användes för att gruppera kollekterna i dendrogrammet.

Även data från den morfologiska undersökningen analyserades med hjälp av programmet SIMQUAL i NTSYS-pc, version 2.1. Likheten mellan kollekterna beräknades med simple matching coefficient (SM) enligt $SM = m/n$, där 'm' är antalet träffar och 'n' är det totala bandantalet d.v.s. både antalet träffar och icke träffar. Av dessa resultat skapades ett dendrogram för att åskådliggöra de morfologiska släktskapen mellan kollekterna. Även här användes UPGMA (se ovan).

RESULTAT

Varje primerpar gav i medeltal 34,7 avläsbara band (min 21, max 47), se Tabell 7. Totalt avlästes 208 band. Varje primerkombination gav upphov till ett mycket stort antal band, av vilka många inte kunde avläsas, då de på vissa områden på gelen var mycket otydliga.

Tabell 7. Totalt antal avlästa band, andelen polymorfa band samt beräknat värde för H_{pop} för respektive primerpar.

Nr.	Primerpar	Totalt antal band	% polymorfa band	H_{pop}
1	M-CAC E-AGC	34	82,4	0,103
2	M-CAA E-ACC	47	76,6	0,083
3	M-CAC E-ACC	41	75,6	0,120
4	M-CAC E-AAG	39	41,0	0,049
5	M-CAG E-ACG	26	65,4	0,091
6	M-CAT E-ACC	21	76,2	0,046
	Medelvärde	34,7	69,5	0,082

I Tabell 7 kan även ses att primerpar 1, 2, 3 och 6 gav den största andelen polymorfa band. Andelen polymorfa band varierade mellan 41,0 och 82,4 %. Primerpar 1 och 3 visade på den största genetiska variationen hos de i undersökningen ingående kollekterna. H_{pop} -värdet var som lägst 0,046 och som högst 0,120.

Tabell 8. H_{pop} och H_{sp} för de olika kollekterna samt medelvärde för H_{pop} och H_{sp}

Kollekt	H_{pop}	H_{sp}	Kollekt	H_{pop}	H_{sp}	Kollekt	H_{pop}	H_{sp}
H 14	0,130	0,145	V 147	0,104	0,117	Sm 121	0,120	0,129
H 20	0,130	0,145	H 158	0,088	0,104	Sm 126	0,173	0,187
V 59	0,082	0,096	H 177	0,082	0,091	Sm 172	0,160	0,157
V 63	0,134	0,149	V 178	0,149	0,169	Sm 187	0,124	0,141
H 69	0,085	0,100	H 189	0,129	0,141	Sk 191	0,141	0,161
H 75	0,147	0,153	H 192	0,139	0,153	Sm 210	0,137	0,153
H 78	0,117	0,129	H 208	0,182	0,195	N 223	0,072	0,083
H 83	0,128	0,141	H 220	0,075	0,087	<i>N. l</i>	0,173	0,180
V 102	0,126	0,137	V 225	0,134	0,145	<i>N. p</i>	0,196	0,216
V 103	0,143	0,157	V 226	0,134	0,145	Sm 51	0,217	0,226
V 111	0,152	0,169	Sk 26	0,114	0,133	Sm 52	0,279	0,278
H 115	0,113	0,137	Sm 35	0,110	0,125	Sm 55	0,114	0,176
V 119	0,140	0,149	Sk 39	0,128	0,133	Sm 41	0,092	0,109
H 121	0,085	0,100	Sm 118	0,138	0,149			
H 129	0,107	0,121	Sk 119	0,125	0,141	Medelv.	0,131	0,146

I tabell 8 kan ses att medelvärdet för H_{sp} är 0,146 (spännvidd mellan 0,083 och 0,278). Detta värde används i huvudsak för att kunna jämföra den genetiska variationen med andra arter. De kollekt som avviker mest från varandra (har högst H_{pop} -värden) är Sm 51, 52, 208, 126 samt de rena arterna *N. lobularis* och *N. pseudonarcissus*. Medelvärdet för H_{pop} är 0,131 (lägst 0,072 och som högst 0,279).

Landskapsflororna

I de äldre landskapsflororna verkar det som om de förvildade kulturväxterna inte finns upptagna. I Västergötlands flora nämns inte *N. pseudonarcissus* överhuvudtaget (Hasselrot, 1967). Inte heller i Smålands flora från 1864 nämns den (Scheutz, 1977). I Hallands flora (Georgson et al., 1997) kan man däremot läsa att *N. pseudonarcissus* finns i anslutning till gårdar och byar, inte minst i det inre av landskapet där åtskilliga torp och gårdar står öde, där den har blivit förvildad. Särskilt i skogsbygden finns en lågvuxen, tidigblommande och frosthärdigare sort som är odlad sedan länge. Vid den angivna inventeringen delades landskapet in i rutor och i 43 % av dessa fanns påskliljan. Värdet kan vara högre eftersom den inte alltid antecknades under inventeringen. Enligt den inventering som gjorts inom projektet Skånes flora växte påskliljor i cirka 79% av de rutor som landskapet indelats i. De växte i allt från torr gräshed till fuktig lövskog (Olsson, K-A., personlig kommentar).

Information som åtföljde kollektorna

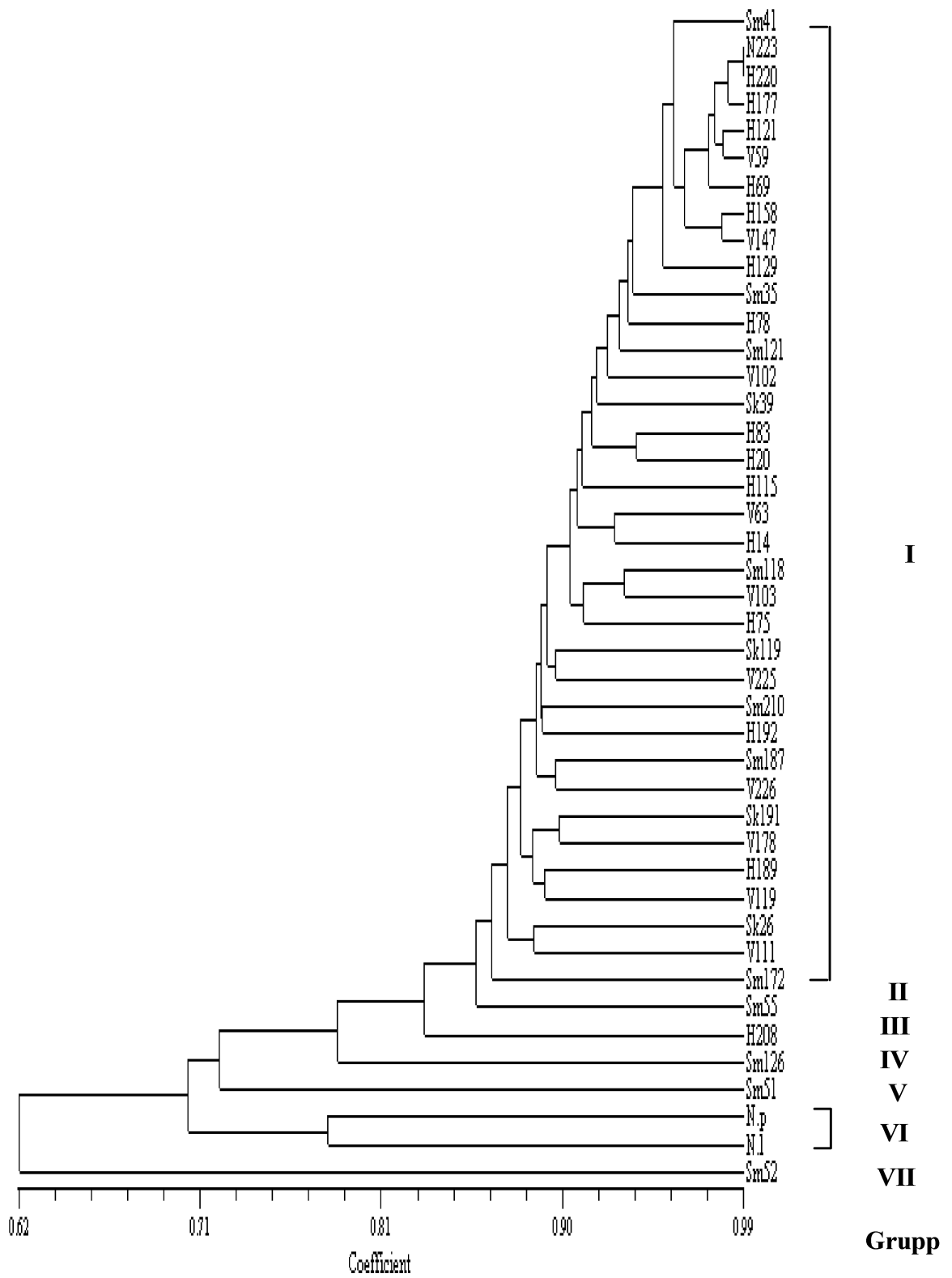
Tyvänn åtföljdes inte alla insända kollekt av uppgifter vad gäller ståndort och hur länge de varit i odling på insamlingsplatsen. Det som ändå verkar vara ett genomgående drag är att narcisserna är konkurrenskraftiga, då de ofta växer i ängsmarker och betesmarker samt att de verkar trivas på de flesta jordar (Tabell 2). Vad gäller hur länge de olika kollektorna har odlats på insamlingsplatsen så är de angivna årtalen ganska osäkra. Många har angivit att narcisserna är gamla, att de alltid har funnits där, men den exakta tidpunkten, går inte att få fram. Den äldsta kända kollekt i undersökningen är kollekt N 223 som är insamlad i Bo i Närke. Den lär ha kommit med familjen Hamilton från södra Skottland någon gång i början av 1700-talet (Wallenquist, 2000) (Tabell 2).

Genetiska dendrogrammet

Generellt visar det genetiska dendrogrammet att de undersökta kollektorna är genetiskt mycket lika (Figur 9). Medelvärdet för distanskoefficienten var 0,895, den varierade mellan 0,62 och 0,99. Kollektorna kan delas i sju grupper. Till grupp I hör 36 av de 43 kollektorna, dessa har en distanskoefficient som ligger mellan 0,87 och 0,99. I denna grupp återfinns de genetiskt mest lika kollektorna N 223, H220 och H177. Distanskoefficienten för N 223 och H 220 är 0,99. Även kollektorna H 158 och V 147 samt H 121 och V59 visade sig vara genetiskt mycket lika varandra.

De resterande sju kollekternas distanskoefficienter ligger mellan 0,62 och 0,86. Endast en kollekt återfinns i var och en av grupperna II–V samt VII (Sm 55, H 208, Sm 126, 51 respektive 52). Till grupp VI hör de rena arterna *N. pseudonarcissus* och *N. lobularis*, deras distanskoefficient är 0,78. Fyra av de fem kollekt som avviker från de övriga och bildar egna grupper, kommer från Småland. Insamlingsplatserna för Sm 52 och 55 ligger förhållandevis nära varandra, i den sydöstra delen av Småland. De övriga tre kollektorna ligger mer geografiskt separerade från varandra. Dessa fem kollekt har enligt uppgifter odlats sedan 1920-talet eller tidigare. Redan före år 1861 lär Sm 55 ha vuxit på sin insamlingsplats.

Den kollekt som avvek allra mest var Sm 52 och den återfinns i grupp VII. Dess distanskoefficient är 0,62. Den blommade först år 2002 och visade sig vara en hybrid mellan påsk- och pingstlilja. I grupp V finns Sm 51, även den blommade först år 2002 med en gul helt enfärgad blomma. Sm 126 tillhör grupp IV, H 208 tillhör grupp III samt i grupp II återfinns H 55.



Figur 9. Genetiskt dendrogram för de i arbetet ingående kollekterna. Siffrorna I-VII anger huvudgrupper som återfinns i resultat- och diskussionsdelen.

Morfologiska dendrogrammet

I det morfologiska dendrogrammet (Figur 10) ses tydliga grupperingar mellan kollekterna. Medelvärde för distanskoefficienten var 0,590 och den varierade mellan 0,40 och 0,79. Det finns sex huvudgrupper varav tre med tillhörande undergrupper. Endast i huvudgrupp IV sågs en geografisk gruppering efter landskap (Sm 35 och 210). Gemensamma morfologiska karaktärer hos alla kollekter är att de har en pistill som är längre än de lika långa ståndarna och att deras blommor är enkla. Blommornas bräm är dubbelveckade och dess bredd är kortare än halva längden på bikronan.

Grupp I består av fyra undergrupper, som har det gemensamt att de saknar doft samt att färgen på deras kalkblad är lika. Grupp Ia karaktäriseras av att kalkbladen har olika utseende, de nuddar vid varandra och de är riktade framåt. Kollekterna i Grupp Ib har gulgrön bladfärg och kalkblad som är riktade framåt. Det finns en tendens till en geografisk gruppering i den norra delen av Halland. Grupp Ic har gulgrön bladfärg, en horisontellt placerad blomma och kalkblad som inte är skruvade, vilka är placerade i rät vinkel mot bikronan. Även här ses en tendens till att kollekterna grupperar sig i den mellersta delen av Halland. I grupp Id återfinns endast en kollekt (Sm 172).

Grupp II består av två kollekter (V226 och Sm 126). Gemensamma morfologiska karaktärer är: antalet blad, gulgrön bladfärg, blomstjälkens längd, en doftlös horisontellt placerad blomma på samma höjd som bladen samt skruvade kalkblad vilka är riktade framåt och alla med lika utseende.

Kollekterna i grupp III har kalkblad som ser likadana ut samt doftlösa blommor. IIIa karaktäriseras av gulgrön bladfärg, gemensam blomningstid, kalkblad med lika utseende och färg samt en bikrona vars kant är utböjd. Här återfinns H 20 och 208 som är de mest morfologiskt lika kollekterna (distanskoefficient 0,79). Tendens finns bland dessa kollekter att de grupperar sig i den mellersta delen av Halland och vid Smålands gräns mot Halland. I undergruppen IIIb ingår två kollekter. Likheterna är antalet blad, att den hängande, klockformade blomman är placerad under bladen och att de har likstora, framåtriktade, ej skruvade och nästan helt äggformade kalkblad vilka nuddar vid varandra. Dessutom är deras bikronor lika långa. Även i IIIc ingår två kollekter. De har likartad blomningstid, en horisontellt placerad blomma i samma höjd som bladen, framåtriktade, ej skruvade kalkblad som nuddar vid varandra, vilka har lika utseende och färg och en bikrona vars kant är utböjd och av likadan färg. Till grupp IIId hör tre kollekter: dessa har lika blomningstid, ej skruvade likformiga kalkblad som är nästan äggformade med likadan färg och en bikrona som är klockformad och där även färgen är lika.

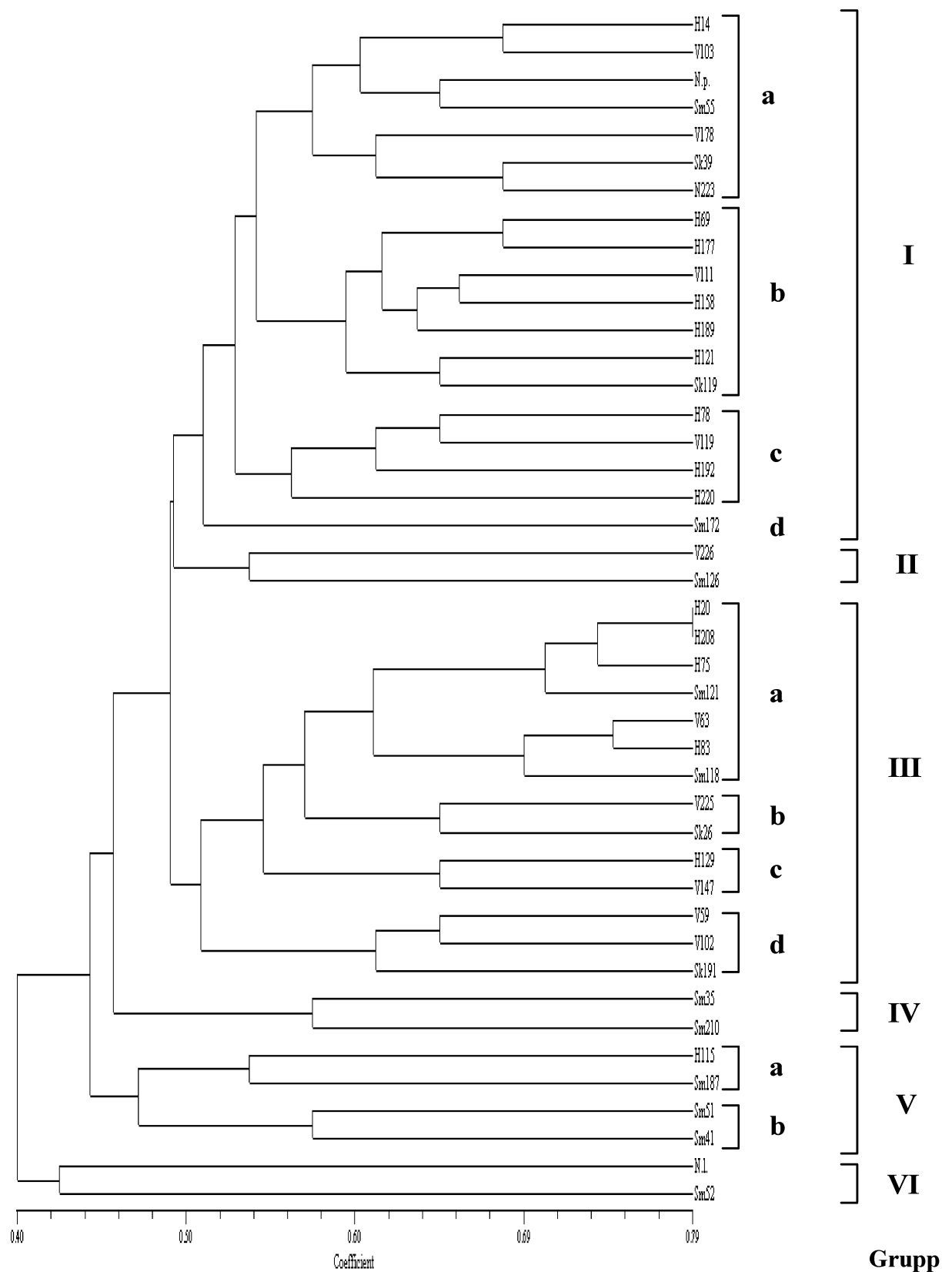
Till grupp IV hör två kollekter, båda från Småland (Sm 35 och 210). Gemensamma karaktärer är blågrön bladfärg, horisontellt placerad blomma som sitter på samma höjd som bladen, ej skruvade nästan äggformade kalkblad vilka är framåtriktade, men med olika utseende, vilka överlappar varandra. Även färgen på den klockformade bikronan är lika.

Till grupp V hör fyra kollekter och gemensamt för dessa är att blomman sitter ovanför bladen och de ej skruvade kalkbladen är riktade framåt. Dessa kollekter grupperar sig två och två i undergrupper. Grupp Va där H 115 och Sm 187 ingår har lika blomningstid, en hängande blomma vars bräm är lika breda, kalkblad som överlappar varandra och lika många blad. Till Vb hör Sm 41 och 51 och de karaktärer de har gemensamt är antalet blad, blomskäftets längd,

färgen på den klockformade bikronan och att kalkbladen, vilka är nästan äggformade, har samma form och att de nuddar varandra.

Till den sista gruppen VI hör *N. lobularis* och Sm 52 (*N. x incomparabilis*). Dessa två kollektioner har lika många blad, en horisontell blomma som är placerad ovanför bladen och bikronor som är lika långa och vars bräm är lika breda. Deras kalkblad har olika utseende.

Sm 52 visade sig vid blomningen vara en *N. x incomparabilis*, en korsning mellan påsk- och pingstlilja. Sm 52 avviker från de övriga genom att ha betydligt längre blad och blomstjälk. I motsats till de andra kollektionerna har den äggformade kalkblad som är fria från varandra. Bikronan är förhållande vis kort. Sm 51 visade sig ha en helgul blomma och inte som de övriga ha kalkblad som är ljusare än bikronan. Dessa båda kollektioner var de enda som hade svagt doftande blommor.



Figur 10. Dendrogram baserat på morfologiska egenskaper för de i arbetet ingående kollektorna. Siffrorna I-VII anger huvudgrupper som återfinns i resultat- och diskussionsdelen.

Jämförelse mellan det genetiska och det morfologiska dendrogrammet

Det morfologiska dendrogrammet visade på en klarare gruppering av kollektorna än det genetiska dendrogrammet. Korrelationen mellan dendrogrammen var generellt dålig. Av de 43 kollektorna är det endast tre som grupperar sig tillsammans både genetiskt och morfologiskt (N 223, H 220 och H177) (Figur 9 och 10). Vad gäller den genetiskt mycket avvikande Sm 52 så avviker den även morfologiskt från de övriga men den grupperar sig morfologiskt tillsammans med *N. lobularis*. Distanskoefficienten för dessa två kollektioner är 0,43.

För de fem kollektioner som genetiskt avvek från de övriga, grupperar sig fyra av dem morfologiskt bland de övriga kollektionerna som var genetiskt mycket lika. Detta gäller även för *N. pseudonarcissus*. H 208 som avviker genetiskt från de övriga visar sig morfologiskt vara mycket lik H 20 med en distanskoefficient på 0,79.

DISKUSSION

AFLP-metoden

Andelen polymorfa band som de olika primerkombinationerna gav upphov till (Tabell 7) var lågt i primerpar 4 (41%). Detta visar på vikten av val av vilka primrar som skall användas. Målet är att finna de genetiska skillnaderna så att icke identiska individer skall kunna skiljas åt. Primerpar 4 och 6 som visade sig ha ett lågt H_{pop} -värde (0,049 resp. 0,046) var av mindre värde för denna undersökning då de inte visar på någon större variation i det undersökta materialet. De övriga primerparen hade ett högre H_{pop} -värde, vilket är önskvärt, då det är den befintliga variationen mellan kollektorna som är av intresse.

Då antalet band som varje primerkombination gav upphov till var mycket stort, skulle en möjlighet för att få färre band vara, att en av primrarna i primerparet skulle ha fyra selektiva nukleotider istället för tre. Resultatet skulle då bli färre band eftersom primern då måste baspara med fyra nukleotider istället för tre. Men resultatet kan bli fler band eftersom selektiviteten kan gå förlorad på grund av fler fel när primern skall baspara till DNA-fragmenten (Vos et al., 1995). Ett annat sätt att få färre band är att använda primrar med ett större innehåll av kvävebaserna G och C (Gibco BRL). Anledningen till detta är att de flesta eukaryota genom är A och T rika (Vos, 1995), d.v.s. genomet innehåller en mindre mängd G och C. Ett minskat antal band skulle ha den fördelen att avläsningen skulle underlättas. Det är viktigt att undersöka vilka primerkombinationer som skall användas i analysarbetet. Problemet är emellertid att antalet möjliga kombinationer är mycket stort, vilket leder till höga kostnader då det dels är tidskrävande och dels att kostnaden för varje primer är hög.

Den basparsstege (DNA Ladder 30-300 bp AFLP) som var tänkt att användas som referensband vid avläsningen av plattorna, var inte till så stor hjälp, eftersom de band den gav upphov till huvudsakligen inte låg i det område på gelen där narcissernas band gick att avläsa (Figur 8). Därför borde olika typer av basparsstegar provas ut för att få band på mer lämpliga områden. Just i detta fall var det inte något stort problem eftersom banden vandrade mycket rakt så de var lätta att följa mellan de olika kollektorna. Dessutom kördes alla kollektorna på samma gelplatta. Om, däremot, flera plattor skulle behöva köras för att täcka in alla kollektorna skulle det krävas en fungerande basparsstege för att kunna identifiera identiska band på de olika gelplattorna.

AFLP-metoden för med sig risken för flera felkällor. Ett problem som kan inträffa är att restriktionsenzymerna har klippt DNA-t på ett ofullständigt sätt. Då bildas det fragment som visserligen ses som skillnader i bandmönstret men som inte återspeglar äkta DNA-polymorfism. Det enda sättet att upptäcka detta är att jämföra olika DNA-prov från samma kollekt (Vos, 1995). I detta arbete analyserades endast ett prov från varje kollekt, därför kan det inte uteslutas att detta har påverkat de erhållna resultaten. Flera DNA-prover från samma kollekt borde därför ha analyserats för att jämföras vid samma tillfälle, för att konstatera metodens tillförlitlighet.

Då det laborativa arbetet innehåller många steg finns alltid risken att prover sammanblandas. Ett annat moment där fel kan uppkomma är vid avläsningen, dels då det skall avgöras om ett band finns eller saknas men även det stora antalet band, av vilka en del låg mycket tätt, ger en risk för att band på olika nivåer bedöms ligga på samma nivå. Risken för det senare skulle möjligen kunna minska om antalet band minskades.

Det största problemet som noterades under arbetets gång var färgningen av plattorna. De blev starkt gulfärgade och banden blev mycket svaga, så svaga att de inte kunde läsas av. Olika modifieringar av färgningsmetoden provades därför. En trolig orsak var att gammal kylförvarad formaldehyd användes, eftersom kvaliteten på banden förbättrades när färsk formaldehyd som förvarades i rumstemperatur användes. Mot bakgrund av dessa observationer borde andra färgningsmetoder samt färdiga silverfärgningskit provas, för att få en så bra kvalitet på färgningen av banden som möjligt. Detta skulle förutom att förenkla avläsningen även göra resultaten säkrare. Ett annat problem som uppmärksammades var att de små DNA-fragmenten (de fragment som vandrat längst) inte gick att läsa av då de blev mycket otydliga. Här skulle det vara intressant att se hur det skulle se ut om elektroforesen kördes kortare tid än den rekommenderade.

Sammanfattningsvis kan konstateras att om AFLP skall användas i framtiden på exempelvis narcisser borde flera prov av samma kollekt analyseras för att undersöka om några skillnader kan ses samt om restriktionsenzymerna brutit ned DNA ordentligt. Dessutom bör fler kollektorer från samma population analyseras för att kunna bestämma hur stor inompopulationsvariationen är. Det vore även intressant att köra samma prover med både RAPD och AFLP för att jämföra resultaten samt att jämföra RAPD med den morfologiska variationen. Då färgningen av gelplattorna var ett problem borde färgningsmetodikerna om möjligt förbättras för att få tydliga band över hela gelplattan.

Genetiska dendrogrammet

Det erhållna medelvärdet för H_{sp} (0,146) (Tabell 8), kan användas för att bedöma den genetiska variationen med andra arter. Fram till idag har ingen gjort AFLP-analys på narcisser, varför inget referensmaterial finns att jämföra med. När det gäller den genetiska variationen verkar de flesta kollekterna vara mycket lika. Hur lika de i verkligheten är borde undersökas genom att utöka försöken enligt diskussionen ovan. Kollekt Sm 52 som avvek mest från de övriga, och som visade sig vara *N. x incomparabilis*, är intressant eftersom det visar att AFLP-metoden klarade att skilja ut den från *N. pseudonarcissus*. Även de rena arterna *N. pseudonarcissus* och *N. lobularis* som var med som jämförelse skildes genetiskt ut från de övriga kollekterna.

Morfologiska dendrogrammet

En förklaring till att ingen geografisk gruppering efter landskap kunde beläggas kan vara att folk delar med sig av sina lökar till släkt och vänner eller att man tar med sig några lökar när man flyttar. Vad gäller *N. lobularis* morfologiska gruppering tillsammans med Sm 52 (*N. x incomparabilis*) kan detta resultat vara tveksamt eftersom *N. lobularis* plantan var liten och därmed möjligtvis inte representativ för sin art. Dock var distanskoefficienten endast 0,43 vilket visar på att de inte är särskilt lika varandra.

Om det är den genetiska variationens påverkan på morfologin som skall undersökas är det viktigt att alla kollekterna växer under samma förhållanden. Under dessa premisser kan det morfologiska dendrogrammets resultat ha påverkats av att en del av de ingående kollekterna växer i bänkgård i Göteborg och att andra växer på friland i Lund samt att de är insamlade på olika platser där ståndortsförhållandena är olika. Det är känt att färgen på en kultivar kan variera beroende på klimat, väder och växtförhållanden (www.rhs.org, 011217). Det är vidare känt att plantans storlek/längd är kopplad till tillväxttid. Ju längre rotningstid de fått desto bättre växer lökarna. De stjälklängder som sågs vid den första blomningen året efter de var planterade kan därför bero på när de blev planterade. Ju senare de har planterats desto större

är risken att stjäklängd och blommans storlek minskar (Jefferson-Brown, 1991). Skall däremot undersökningen visa på den morfologiska variationen som ett resultat av deras anpassning till växtplatsen borde den morfologiska bedömningen ha gjorts på insamlingsplatsen.

Jämförelse mellan det genetiska och det morfologiska dendrogrammet

De mest genetiskt lika kollekterna N 223, H 220 och H 177 visar även på morfologisk likhet. De tillhör alla samma huvudgrupp (I) men olika undergrupper i det morfologiska dendrogrammet. Sm 52, som visade sig vara *N. x incomparabilis*, är den som genetiskt avviker mest. Den avviker även mest morfologiskt även om den grupperar sig med *N. lobularis*. Denna morfologiska gruppering är möjligtvis inte helt tillförlitlig eftersom *N. lobularis* visade sig vara en mycket liten planta, och möjligtvis inte representativ för sin art. Då den morfologiska likheten inte är särskilt stor (distanskoeficient 0,43) så överensstämmer det genetiska och det morfologiska dendrogrammens resultat, eftersom kollekterna skiljs ut från de övriga kollekterna. För de övriga kollekterna verkar det inte finnas någon säker korrelation mellan den genetiska och den morfologiska likheten. För att skilja de små, enkla påskliljorna åt, görs det bäst med de morfologiska karaktärerna, eftersom det morfologiska dendrogrammet visade på större skillnader mellan kollekterna än vad det genetiska dendrogrammet gjorde.

Bevarande av narcisslökar

När en art skall bevaras vore det optimala att bevara alla individer. Tyvärr är det ohållbart då det kräver stora utrymmen samt är förenat med höga kostnader. Det som är acceptabelt och genomförbart är att bevara ett fåtal individer som tillsammans genetiskt bär på så stor variation som finns inom arten, som möjligt. När det gäller ett bevarande av dessa små enkla påskliljor bör de kollekt som visar på stor avvikelse från de övriga bevaras samt någon kollekt från grupp I. De som då kommer i fråga är Sm 51, 126, 55 och H 208, samt någon i den stora gruppen (I) exempelvis Sm 172, vilken var den mest genetiskt variabla kollekten (H_{pop} -värde 0,160) inom den gruppen. En stor del av den genetiska variationen bevaras därmed hos dessa få kollekt. För att bestämma hur många lökar per kollekt som bör sparas, måste variationen inom de olika kollekterna undersökas, något som inte har gjorts i detta arbete. Valet av vilka individer i en population som skall väljas ut för bestämning av inomvariationen är viktigt. Om individer som växer nära varandra väljs ut är chansen stor att de är dotterlökar, det vill säga vegetativt förökade och från samma klon, och därmed genetiskt lika. Insamlas däremot individer i en population som växer långt ifrån varandra är chansen större att de är fröförökade och därmed genetiskt olika. Är variationen inom kollekterna liten behöver bara ett fåtal lökar bevaras men är variationen stor måste ett större antal lökar bevaras. För att bevarandeprojektet skall bli framgångsrikt borde fler individer från de i undersökningen ingående kollekterna analyseras och variationen inom arten beräknas. Detta för att verkligen bevara en så stor genetisk variation som möjligt för framtiden.

Tack

Jag vill tacka Roland von Bothmer, min handledare och examinator, för all hjälp jag fått vid skrivandet av mitt examensarbete. Ett speciellt tack vill jag rikta till Karin Persson. Tack snälla Karin för all hjälp och all tid som Du lagt ner. Du har varit till stor hjälp och stöd under hela arbetets gång. Jag kommer att minnas allt labbande, våra diskussioner och Göteborgsresan som en rolig tid i mitt liv. Jag vill tacka Ann-Sofie Fält för allt arbete som hon lade ner på mig och oxbären men som tyvärr inte ledde till något färdigt examensarbete samt för hjälpen jag fått med påskliljorna. Trots alla motgångar i arbetet med oxbären var det tre roliga sommarveckor. Jag vill även tacka Jens Weibull och Eva Jansson på POM, Marie Widén, Lunds botaniska trädgård för att jag fick använda mig av hennes fina narcisstreckning. Till sist vill jag tacka de botaniska trädgårdarna i Lund och Göteborg, Britt Green samt K-A Olsson.

KÄLL- OCH LITTERATURFÖRTECKNING

Litteratur

- Aldén, B., Engstrand, L., Iwarsson, M., Jonsson, L., Nilsson, Ö. & Ryman, S. (1998). *Kulturväxtlexikon*. Natur och Kultur / LTs förlag. ISBN: 91-27-33907-6
- Baker, J.G. (1888). *Handbook of the Amaryllideae including the Alstroemerieae and Agaveae*. George Bell. London.
- Blanchard, J. (1990). *Narcissus a guide to wild daffodils*. Alpine Garden Society, Lye End Link, St John's, Woking, Surrey. ISBN: 0-900048-53-0
- Bothmer, R. von. (1996). Biologisk mångfald och genetiska resurser. *Sveriges Utsädesförenings Tidskrift*. 106:121
- Bryan, J.E. (1989). *Bulbs*. Timber Press. Portland, Oregon. Vol II. ISBN: 07470-0231-2
- Brändén, H. (1997). *Molekylär biologi*. Studentlitteratur. Lund. ISBN: 91-44-49381-9
- Capon, B. (1997). *Botany for Gardeners*. B. T. Batsford Ltd. London. ISBN: 0-7134-7252-9
- Dahlgren, G., Björkqvist, I., Dahlgren, R., Nilsson, Ö., Runemark, H., Snogerup, S. & Weimarck, G. (1983). *Systematisk botanik*. Kristianstads Boktryckeri AB. Kristianstad. ISBN: 91-38-61207-0
- Georgson, K., Johansson, B., Johansson, Y., Kuylenstierna, J., Lenfors, I. & Nilsson, N-G. (1997). *Hallands flora*. Ekblads, Västervik. ISBN: 91-972863-0-3
- Hartmann, H., Kester, D., Davier, Jr, D. & Geneve, R. (1997). *Plant Propagation Principles and Practices*. Prentice Hall. Upper Saddle River, New Jersey, USA. ISBN: 0-13-206103-1
- Hasselrot, K. (1967). *Västergötlands flora*. Berlingska Boktryckeriet, Lund.
- Hutchenson, A. (1970). A test for comparing diversities based on the Shannon formula. *Journal of Theoretical Biology*. 29:151-154.
- Jefferson-Brown, M. (1991). *Narcissus*. B. T. Publisher. London. ISBN: 0-7134-6102-0
- Karp, A., Seberg, O. & Buiatti, M. (1996). Molecular Techniques in the Assessment of Botanical Diversity. *Annals of Botany* 78: 143-149.
- Karp, A., Kresovich, S., Bhat, K.V., Ayad, W.G. & Hodgkin, T. (1997). Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. *IPGRI Technical Bulletin no. 2*
- Lange, J. (1994). *Kulturplanternes indførselhistorie i Danmark – indtil midten af 1900-tallet*. Jordbrugsforlaget, Frederiksberg, Danmark. ISBN: 87-7432-404-7
- Larousse de poche (1954). Librairie Larousse. Paris.
- Lehninger, A., Nelson, D. & Cox, M. (1993). *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers. New York. USA. ISBN: 0-87901-711-2
- Månsson, L. & Johanson, B. (2000). *Lökar och knölar som blommor från vår till höst*. ICA bokförlag. Västerås. ISBN: 91-534-1748-8
- Pettersson, M-L. & Åkesson, I. (1998). *Växtskydd i trädgården*. Bokförlaget Natur och Kultur/LT. ISBN: 91-27-34622-6

Rohlf, F.J. (2000). *Numerical taxonomy and multivariate analysis system*. Exeter Software. Setauket, New York, USA.

Scheutz, N. J. (1977). *Smålands flora*. Bokförlaget Rediviva, Stockholm. Facsimilutgåva. Originalutgåva 1864. ISBN: 91-7120-094-0

Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M. & Webb, D.A. (1980). *Flora Europaea*. Cambridge University Press. Cambridge. Vol. 5.

Wallenquist, I. (2000). Har du en gyllene antikvit i din trädgård? *Natur och trädgård*. Nr.1

Wallin, K. (2002). Genetic diversity in Daffodils (*Narcissus*) from southern Sweden. Sveriges Lantbruksuniversitet. Institutionen för växtvetenskap, Alnarp. Examensarbete.

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

Winter, P.C., Hickey, G.I. & Fletcher, H.L. (1998). *Instant Notes in Genetics*. BIOS Scientific Publishers Limited. Oxford. England. ISBN: 1-85996-166-5

Internet

www.rhs.org - RHS (Royal Horticultural Society) hemsida

www.biodiv.org/convention/articles.asp

Fotografier och teckningar

Omslagsbild: Burbidge, FW. & Baker, JG. (1875). *The Narcissus its history and culture*. London.

Alla bilder är tagna av Karin Persson

Figur 1. Teckning av Marie Widén

BILAGA 1

Stamlösningar för DNA-extraktion

1 M Tris-HCl pH 8,0

121,1 g Tris-ultrapur $C_4H_{11}NO_3$ 121,1 g/mol löses och spädes till 1 l med milliporfiltrerat H_2O . pH justeras.

0,5 M EDTA (pH 8,0)

186,1 g Dinatrium etylendiomintetraacetat x 2 H_2O

~800 ml H_2O

~20 g NaOH

pH ställes till 8,0 och spädes till 1000 ml.

5 M NaCl för 1 liter lösning

292,2 g NaCl

800 ml H_2O

10% SDS för 1 liter lösning

100 g SDS (natriumdodecylsulfat) $C_{12}H_{25}O_4SNa$

900 ml H_2O

Värm till 68°C och ställ pH till 7,2. Behöver ej steriliseras.

5 M Kaliumacetat pH 7,5

490,75 g Kaliumacetat, CH_3COOK , spädes med H_2O till en liter lösning. Ställ pH med 100% ättiksyra.

3 M Natriumacetat, steril, pH 5,2

408,24 g Natriumacetat, $C_2H_3NaO_2 \cdot 3 H_2O$, spädes med H_2O till en liter lösning. Ställ pH med 100% ättiksyra.

Autoklavera lösningen.

RNAse

Stamlösning 10 mg/ml: 10 mg RNAse löses i 1 ml milliporvatten. Koka i 10 min och låt svalna sakta. Fördela i små rör och frys -20 °C.

Brukslösning 1 µg/ml: Späd 1 µl av stamlösningen med 10 ml 1xTE ! Fördela i rör och frys -20 °C.

50 x TEA 1000 ml

242 g Tris ultrapur, $C_4H_{11}NO_3$, 121,1 g/mol

57,1 ml 100% isättika, $C_2H_4O_2$

100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0

Späd med H_2O till 1000 ml.

(1x TEA = 10 ml 50 x TEA spädes till 500 ml med H_2O)

Loading buffert (0,12% bromfenolblått, 30% glycerol)

3,45 ml 87% glycerol, $C_3H_8O_3$

0,012 g bromfenolblått

Späd till 10 ml med H_2O

500 ml agarosgel

7 g agaros

500 ml 1x TEA

Koka i mikrovågsugn tills agarosen är fullständigt löst. (~4 min, full effekt, locket löst)

Låt svalna till 65°C.

Tillsätt 10 droppar Ethidiumbromid . CANCEROGENT, ANVÄND DRAGSKÅP!

Lösningen kan förvaras i värmeskåp.

Stamlösningar för AFLP

10 ml Loading buffert

9.8 ml formamid (avjonat)
200 µl 0.5 M EDTA pH 8.0
5 mg bromfenolblått
5 mg Xylen cyanol

Till formamiden tillsätts EDTA, därefter tillsätts bromfenolblått och Xylen cyanol.
Blanda, fördela i Eppendorfrör, förvara -20 °C.

10 x TBE

121.1 g Tris Ultrapur, C₄H₁₁NO₃
61.8 g Borsyra, H₃BO₃
9.3 g EDTA, C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂ * 2 H₂O
spädes till 1 l med milliporfiltrerat vatten. Autoklaveras.

10% APS lösning

5g Ammoniumpersulfat löses i 50 ml milliporfiltrerat vatten.

Bind-silane brukslösning

50 ml 95% etanol
1.5 ml 100% ättiksyra
120 µl Bind-silane
Denna lösning är hållbar 1-2 månader.

60 ml 5 % Gelstock

21,6 g Urea, CH₄N₂O
6 ml 10x TBE
7,8 ml 40% akrylamid/BIS lösning 19:1
Löses och spädes med milliporfiltrerat vatten till 60 ml.

TEMED

N,N,N',N'- tetrametyletylendiamin, C₆H₁₆N₂

DNA Ladder 30-300 bp AFLP

5 µl DNA ladder
5 µl TE-buffert
25 µl AFLP loading buffert
Blanda och inkubera 5 minuter i 70 °C.

10 mg/ml Natriumtiosulfat

10 mg Na₂S₂O₃ löses i 1 ml milliporfiltrerat vatten.

2 l Fixeringslösning

250 ml 80% ättiksyra spädes till 2 l med milliporfiltrerat vatten.

1,5 l Silverfärglösning

1,5 g AgNO₃
löses och spädes till 1,5 l med milliporfiltrerat vatten
2,25 ml 37% formaldehyd, CH₂O, tillsättes omedelbart före användning.

1,5 l Framkallningslösning

45 g Natriumkarbonat, Na₂CO₃
löses och spädes till 1,5 l med milliporfiltrerat vatten
Förvaras i kylskåp tills den ska användas. Omedelbart innan användning tillsättes 2,25 ml 37% formaldehyd och 300 µl 10mg/ml Na₂S₂O₃.

Kemikalier/reagens

Tris Ultrapur, $C_4H_{11}NO_3$
EDTA, $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2 H_2O$
Natriumhydroxid, NaOH
Natriumklorid, NaCl
2-Merkaptoetanol, C_2H_6OS
SDS (Natriumdodecylsulfat), $C_{12}H_{25}O_4SNa$
Kaliumacetat, CH_3COOK
Fenol, C_6H_5OH
Kloroform, $CHCl_3$
Isopropanol, C_3H_8O
Etanol 95%, C_2H_5OH
RNase, Ribonukleas A
Natriumacetat, $CH_3COONa \cdot 3 H_2O$
Agaros
Ethidiumbromid, $C_{21}H_{20}N_3Br$
Bromfenolblått
Glycerol, 87%, $C_3H_8O_3$
Lambda DNA
Taq DNA-polymeras
AFLP Core Reagent Kit
AFLP™ Primer, EcoR och Mse
Formamid 98% (avjonat), CH_3NO
DNA Ladder 30-300 bp AFLP
Repel-Silane ES
Bind-silane
Urea, CH_4N_2O
40% akrylamid/BIS lösning 19:1
 N_1, N_1, N', N' -tetrametyletylendiamin, $C_6H_{16}N_2$
Ammoniumpersulfat, $(NH_4)_2S_2O_8$
Borsyra, H_3BO_3
Isättika, 100%, $C_2H_4O_2$
Silvernitrat, $AgNO_3$
Xylen cyanol
Natriumkarbonat, Na_2CO_3
Formaldehyd 37%, CH_2O
Natriumtiosulfat, $Na_2S_2O_3 \cdot 5 H_2O$

Maskinell utrustning

RE 16 (roterande homogenisator)

Mini-sub® cell GT (elektroforeskär för agarosgel)
EC 150 (spänningskälla)

Gene Amp® PCR System 9700

MicroAmp® Optical 96 Well Reaction Plate

Adjustable nucleic acid sequencing kit SG-600-33
(elektroforeskär för polyakrylamidgel)
EC 650 (spänningskälla)

företag

Duchefa
Saveen
Duchefa
Duchefa
Sigma
Sigma
Merck
Labkemi
Sigma
AppliChem
Solveco Chemicals AB
Sigma
Merck
Sigma
Sigma
Fluka
Merck
Promega, USA
Merck
Gibco BRL, Life Technologies
Gibco BRL, Life Technologies
Sigma
Invitrogen, Life Technologies
Pharmacia Biotech
LKB-Produkter AB
Saveen
BIO-RAD
Sigma
Sigma
Riedel-de Haën
Merck
Sigma
Chroma-Gesellschaft
Sigma
Sigma
Merck

leverantör

Janke & Kunkel
IKA® Labortechnik

Biorad
E-C Apparatus Corporation

Applied Biosystems

Applied Biosystems

CBS Scientific Co.
Techtum instrument AB
E-C Apparatus Corporation

