

KONSTRUKTION AF RHODODENDRONFAMILIENS STAMTRÆ I

FRA RHODO-NYT 1996(4)

Forskning indenfor rhododendronfamiliens stamtræ er nu gået ind i en ny æra, idet DNA teknologiens metoder indføres.

Hvis vi går ca. 80-100 år tilbage i tiden indsamledes mange nye arter i Himalaya af plantejægerne Veitch (1900-04), Forest (1910,1912-4,1917-9,1924-5...), Kingdon-Ward (1913-..), Rock (1923-..) osv. Der blev herved hjembragt enorme mængder frø, som blev indført til England og sået. Desuden blev der presset herbariummaterialer til senere studier. Disse ekspeditioner har været utroligt værdifulde for eftertidens forskere, gartnere, plantesamlere og haveejere.

Forskere har siden forsøgt at artsbestemme materialet ved at konstruere bestemmelsesnøgler til at gruppere arterne til forskellige familier, slægter, serier og underserier. Dette arbejde har været særdeles vanskeligt, især fordi det indsamlede materiale indeholdt planter der kun varierede lidt fra hinanden, men dog med enkelte karakteristiske forskelle. Desuden var der planter, som siden hen viste sig at være hybrider.

For at karakterisere en art vil det ideelle være at finde et enkelt 100% sikkert kriterium, men af mangel på dette opstillede botanikerne måske ca. 8-10 kriterier efter bedste evne. Hvis en plante så har ca. 80% af disse karakteristika vil bestemmelsen sikkert i orden. Imidlertid er nogle "arter" kun karakteriseret med få usikre kendetegn såsom "fordeling af hår" eller bladets form og vægtningen af disse er usikre og lidet undersøgte.

Linné, fandt ud af at især blomstens opbygning (kurv-, ærte-, maske-, læbe- osv.) var særdeles anvendelig som kendetegn for en art der skal henføres til en familie. Dette skyldes at især blomstens opbygning og udseende konstant har haft betydning for plantens overlevelsessevne, på grund af samspillet/specialisering der er mellem planter og insekter/fugle mht. bestøvningen og nektar/pollen. For at kunne lave denne specialiserede og komplicerede blomst har det været nødvendigt at mange gener har kunnet samarbejde indbyrdes for at opnå disse forhold.

Andre komplicerede egenskaber betyder måske mindre når en plante skal artsbestemmes f.eks. egenskaben som regulering af vækst og vandbalance. Dette skyldes at mange arter fra forskellige slægter allerede har løst problemerne på samme måde, idet det har været en forudsætning for liv hurtigt at kunne tilpasse sig varierende omgivelser f.eks. til at modstå frost og skadedyr. Disse egenskaber er desuden svære at bruge i en bestemmelsesnøgle.

Gode kendetegn indenfor Rhododendron til at adskille familierne har netop vist sig at være de strukturer der er komplicerede opbyggede (styret af mange gener), medens underfamilier/serier adskilles af træk der er mindre sammensatte, medens egenskaber der kun styres af et gen er ofte helt ubrugelige til andet end beskrivelse af en variant indenfor en art.

Eksempler på komplicerede egenskaber har været svære at finde hvis de ikke undersøges med genetiske metoder dvs. (nedarvningsundersøgelser) og alt andet er kun gætteri: blomstens placering på stilken, udformning af bæger og kronblade, støvvej, indument og hårtype.

Eksempler på egenskaber der er styret af et eller få gener: klistrede knopper, farvenuancer i knopper, blade og blomster. Længde og bredde af blade og gener der regulerer fordeling af hårbeklædning.

Disse morfologiske (bygningforskelle) usikre kendetegn har været anvendt til at gruppere planterne i arter. Arterne i underserier. Underserier i serier osv.

For at opbygge et stamtræ sættes de mest primitive familier nederst (stammen), derover serierne (hovedgrene), subserier (grene), ... arterne de yderste grene (og varianterne er bladene).

Dette stamtræ håber man på svarer til udviklingen af Rhododendron slægten gennem tiderne fra de simpleste former (med få komplicerede træk, *R. camtschaticum* ?) til de mere komplicerede former (Falkoneri serien ?).

Forskerne har endnu ikke kunnet lavet dette stamtræ og de har endnu ikke været enige om hvilke arter, der skal indgå i serierne eller om en plantegruppe tilhører en art, hybrid eller variant.

Nu er der imidlertid hjælp at hente gennem den moderne genteknologi, som svarer til kulstof-14 metoden for arkæologer. Ved at betragte sikre kendetegn som forskelle i DNA sekvensen (bogstavombytninger) kan man bestemme slægtskab og aldersforskelle mellem arter og familier indbyrdes (phylogenetik).

DNA molekylet er det arvelige materiale, der indeholder 4 forskellige kemiske bogstaver kaldet A, T, G, C. De 4 bogstaver sidder i forskellig rækkefølge. Et DNA-molekyle består ofte af måske 1000.000.000 bogstaver og er spiraliseret, op til et kromosom. Et sådant kromosom kan også opdeles i måske 10.000 gener på hver ca. 500-50.000 bogstaver (5% af bogstaverne ligger i generne)

Molekulærgenetikere er nu blevet enige om på internationalt plan at undersøge specielle variable DNA-områder for at finde ligheder og forskelle mellem plantefamilier og deres tilknyttede arter for at lave et stamtræ over planternes udviklingshistorie.

Det har vist sig de stykker af et DNA-molekyle der ligger imellem kodende områder (gener/gen-dele) variere mest fra art til art. For hver 500 bogstaver i disse områder vil der ca. ske en bogstavsombygning (mutation) for hver 4 millioner år. Hvorimod ombytninger i et gen observeres 10 gange sjældent, idet mutationen i et gen oftest er skadelig og vil forsvinde hurtigt.

Hvis man er interesseret i at se DNA sekvensen (rækkefølgen af C, T, A, G) imellem generne der koder for bestanddele af et ribosom (28SrRNA og 5SrRNA) kan man finde DNA-sekvensen på foreningens HOMEPAGE på internettet (under Taxonomi). Ca. 660 bogstaver er bestemt på 28 forskellige arter indenfor lepidote og elepidote arter. Også mange andre planters DNA-sekvenser i dette område er offentliggjort.

Det viser sig at *R. ponticum* og *R. argyrophyllum*s DNA er 99% ens i bogstavfølgen (-5 bogstaver), medens mellem *ponticum* og *ferrugineum* er ligheden kun på ca. 96%, men mellem *argyrophyllum* og *ferrugineum* kun ca. 95%. Deraf kan man slutte at *argyrophyllum* og *ponticum* er tættest beslægtet med hinanden og *argyrophyllum* er mindre beslægtet med *ferrugineum* end *ponticum*. Man kan yderligere slutte at alle de arter der har præcis samme bogstavsombytninger må være meget tæt beslægtede. Der er desuden forskelle i længden af genet, idet *ferrugineum* har mistet et bogstav i forhold til de to andre lepidote. Interessant er at *Ledum groenlandicum* er næsten identisk (-1 bogstav) med *R. ferrugineum*,

hvilket medfører at *Ledum groenlandicum* bør ændres til *Rhododendron groenlandicum*. Arter som *R. anthopogon*, *R. molle* og især *R. camtschaticum* varierer mest fra f.eks. *R. ponticum*.

Hans Eiberg

RHODODENDRONFAMILIENS STAMTRÆ 2

FRA RHODO-NYT 1997(1)

(Ovenfor) gennemgik jeg lidt basisorientering mht. opbygningen af *Rhododendron* familiens stamtræ. Jeg har nu analyseret DNA sekvensen nøjere fra flere arter og derved kunne lave et udbygget stamtræ (se andetsteds på HOMEPAGEN). Sekvenserne er hentet over internettet fra en database over DNA-sekvenser, og kan nu ses på foreningens HOMEPAGE adresse: ([html://rclink.imbg.ku.dk/~he/rhodo.html](http://rclink.imbg.ku.dk/~he/rhodo.html))

Det er et forskerhold, hvor bl.a. D. Chamberlain (Edinburgh) indgår. De har tænkt sig at analysere mindst 50 arter. Der er Ph.D. Roger Hyam der står for arbejdet. Det er ikke en let opgave at konstruere et stamtræ i hånden og der er da også lavet adskillige EDB-programpakker (PHYLIP, PAUP mm.) til dette formål, hvilket jeg godt kan forstå. De fleste programmer kan dog kun analysere få arter og korte sekvenser, hvis ganske almindelige IBM-PC (pentium) anvendes og indenfor en rimelig tid. Jeg har derfor prøvet at analysere sekvenserne fra 29 arter ved hjælp af computerpakken PHYLIP på en "stor" SUN-Sparc 20 (det tog ca 2½ time). Sekvenserne for alle arter er alignet (sat under hinanden og ordnet med evt. mellemrum, hvis der er fjernet nogle bogstaver). Da jeg i første omgang kun analyserede 21 arter kunne bl.a. *R. albiflorum* og *R. schlippenbachii* ikke sættes ind i stamtræet med bestemthed alt efter hvilket program der anvendtes. *R. camtschaticum* blev efter begge programmer nært beslægtede med *R. canadense* og *R. luteum*. Efter jeg analyserede 28 arter og indlemmede *Daboecia*, blev langt flere arter sat rigtig på plads (figur 2) og nu er kun *R. moultmainense* og *R. albiflorum* forskelligt placerede i de to figurer.

688 bogstavets rækkefølge (kombinationer af ATCG) er bestemt omkring genet for 5.8S rRNA. Jeg har indlemmet 24 arter på figur 1 (der er ikke plads til de øvrige). Numrene i figuren betegner mutationer (bogstavombytninger, fjernelser eller tilføjelser når 29 arter anvendes). Numrene er afhængig af det alignmentsystem der er anvendt og ændres hele tiden når nye arter indlemmes. Begge stamtræer er konstrueret efter det princip at for ca. 100-200 millioner år siden havde forfædrene til *rhododendron* familien en bestemt rækkefølge af bogstaver omkring genet for 5.8S rRNA. Der kan ske mutationer/ændringer i rækkefølgen og nogle af disse ændringer nedarves fra generation til generation. Hvis nye arter opstår ud fra få/enkelte planter ved en tilfældig isolation, kan alle dens efterkommere få den pågældende mutation.

Eksempel på alignede DNA-sekvenser (1-30) fra 5 arter.

	1	5	15	16	30
<i>R.ponticum</i>			TCGA-AACCTGCCAA	CAAGCAGAAA	ACTTG

R.ferrugineum TTGA-AACCTGCCAA CAAGCAGAAAAGTAG
L.groenlandicum TTGA-AACCTGCCAA CAAGCAGAAAAGTAG
R.camtschaticum TCGA-AACCTGCCAA CAAGCAGAAAAGTTG
Daboecia TCGATAACCTG---A CGATCAGAAAAGTTG

De fremhævede bogstaver viser mutationerne. R.ferrugineum og L.groenlandicum er helt ens og derfor tættest beslægtede.

Som det ses på figur 1, er der bevaret/overlevet ca. 7-20 mutationer per art siden rhododendronfamilien er opstået. For at være sikker på slægtskabet i den første periode må flere analyser dog udføres. Hvor der kun er 1-2 mutation der adskiller to grene fra hinanden, er der stor usikkerhed og der er flere af sådanne i stamtræet. R. vaseyi som i øjeblikket er klassificeret i familie med R. canadense er på figurene sammen med R. albrechtii. Er R. camtschaticum en rhododendron? den er efter DNA sekvensen tættere beslægtet med Irsk lyng (Daboecia).

Hvad kan vi bruge stamtræet til?

1) Viden er altid rart at være i besiddelse af og denne kan være med til at forklare evolutionen dvs. hvilke planter der er nært beslægtede. 2) Kan forklare selve artsdannelsesprocessen. 3) Kan give en tommelfingerregel mht. hvilke arter der kan krydses og hvis de er langt fra hinanden, vil mange af hybridene (hvis de kan laves) nok være svagelige. 4) Analysemetoden kan bruges til artsbestemmelse, idet to planter der har væsentligt forskellig DNA-sekvens må tilhøre to forskellige arter. 5) DNA-sekventering kan bruges til faderskabsundersøgelse dvs. skelne mellem en hybrid og en art. Hybriden vil have både faderens og moderens sekvens, som vil være forskellig. 6) Der kan analyseres på et enkelt tørret blad og ud fra DNA-profilen kan planten placeres i systematikken.

2) Artsdannelsesprocessen: Der er forskellige meninger om dannelsen af nye arter. Nogle mener at nye arter dannes ved hybridisering mellem to forskellige arter og efterkommerne herfra vil stabilisere sig til en art ved selektion. Andre mener (inkl. undertegnede, som ikke er ekspert) at nye arter dannes ud fra nye variationer indenfor samme art. Få planter er ophav til en ny art der siden opformerer kraftigt under stadig selektion. Artsdannelsen er en gradvis proces og en art er ikke konstant gennem tiden. Hvis "hybridteorien" er den almindelige metode ved artsdannelsen, vil det ikke være muligt at konstruere et stamtræ ud fra variationen i et lille gen, der svarer til systematikken skabt ud fra mange morfologiske karakterer. Fra andre stamtræundersøgelser fra andre plantegrupper er der i få tilfælde fundet uoverensstemmelser (som måske ikke er det alligevel), men "hybridteorien" er ikke den almindelige metode til artsdannelse. Der er ingen fordel for to arter der har specialiseret sig til hvert sit miljø at danne en hybrid. Hybrider og hybridsværme findes hyppigt i naturen, men de overlever meget sjældent på lang sigt, også fordi de sætter færre frø end arterne og derfor vil blive udkonkurreret. Under den danske ekspedition til Sikkim så jeg eksempler på hybridsværme, som var ved at gå tilgrunde.

Områder med den gule R. thomsonii (R. thomsonii x R. campylocarpum F2), R. decipiens (her R. wightii x R. hodgsonii) og R. sikkimensis (R. arboreum x R. thomsonii F2-?) blev kun holdt oppe ved omhyggelig pleje. 3) Hvis to arter adskiller sig fra hinanden med mange mutationer så slægtskabet indbyrdes er fjernt, så vil de ikke eller vanskeligt kunne krydses indbyrdes, da arterne har nået at danne

krydsningsbarrierer. Der kan dog også ske een enkelt større kromosommutation (ombytning af større mængde materiale mellem to kromosomer), dvs. en hurtig artsdannelse, som besværliggør en hybridisering som folk mellem de meget tæt beslægtede arter *Ledum/R. groenlandicum* og *R. ferrugineum*.

Usikkerheden mht. opbygningen af et stamtræ skyldes mange årsager. En af dem er at der ofte er flere muligheder, der er lige sandsynlige, og der er specielle bogstavkombinationer, der hyppigt muterer. En enkelt mutation, hvor der er tilføjet 3 ekstra baser, kan opfattes som een, to eller tre ændringer. En anden usikkerhed er at der er flere muligheder for at aligne sekvenserne, som kan resultere i forskellige placeringer af enkelte arter i træet.

Som konklusion vil denne form for analyse revolutionere taxonomien og sikre stamtræer vil blive konstrueret når der er analyseret 3-5 genområder på måske 200 arter som repræsenterer alle serier. Især bliver det interessant når flere af de problematiske arter indgår i analyserne.

Hans Eiberg