

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Jolanta Patamsytė

**PAPRASTOSIOS AVIETĖS (*Rubus idaeus* L.)
GENETINĖS ĮVAIROVĖS TYRIMAI LIETUVOJE**

Daktaro disertacija
Biomedicinos mokslai, biologija (01 B)

Vilnius, 2009

Disertacija rengta 2002 – 2009 metais Vilniaus universitete

MOKSLINIS VADOVAS:

doc. dr. Donatas Žvingila (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B)

KONSULTANTAS:

dr. Laimutė Balčiūnienė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B)

TURINYS

SANTRUMPOS	5
ĮVADAS	6
I. LITERATŪROS APŽVALGA	11
1. Genetiniai žymenys ir jų tipai.....	11
1.1. RAPD metodas, jo privalumai ir trūkumai	16
2. Molekulinių žymenų taikymas genetinių išteklių įvertinimui	22
2.1. Genetiniai ištekliai, jų saugojimo būdai	22
2.1.1. Genotipų identifikavimas.....	27
2.2. Genetinės įvairovės tyrimai RAPD metodu	29
2.2.1 RAPD metodo taikymas augalų populiacijoms tirti	30
2.2.2. Dauginimosi būdo įtaka populiacijų genetinei įvairovei	33
2.2.3. Erdvinės izoliacijos ir gamtinių barjerų įtaka populiacijų genetinei įvairovei	36
3. Molekulinių žymenų taikymas adaptyvumui tirti.....	37
3.1. RAPD metodo taikymas augalų adaptyvumui tirti	38
3.2. Abiotinių veiksnių poveikis superoksido dismutazės (SOD) polimorfizmui	39
4. Paprastoji avietė – modelinis Rosaceae šeimos augalų molekulinės genetikos organizmas.....	41
II. TYRIMŲ OBJEKTAS IR METODAI	50
1. Tyrimų objektas – paprastoji avietė.....	50
1.1. Paprastosios avietės genetinė kolekcija	55
1.1.1. Kolekcijos surinkimas	56
1.2. Medžiaga paprastosios avietės populiacijų tyrimams.....	59
2. Tyrimų metodai	62
2.1. Morfologijos tyrimas paprastosios avietės genetinės kolekcijos pavyzdžiuose	62
2.2. DNR polimorfizmo tyrimas RAPD metodu	64
2.3. SOD polimorfizmo tyrimas	70
III. REZULTATAI	71
1. Paprastosios avietės kolekcijos tyrimai	71
1.1. Genetinės įvairovės tyrimas RAPD metodu.....	71
1.1.1. Pradmenų, tinkamų genotipavimui, atranka ir PGR optimizacija	71
1.1.2. Paprastosios avietės kolekcijos pavyzdžių genotipavimas ir genetinės įvairovės įvertinimas.....	76
1.1.3. Paprastosios avietės kolekcijos pavyzdžių genetinio tapatumo patikrinimas	79
1.2. Paprastosios avietės kolekcijos morfologijos tyrimas	80
1.2.1. Augavietės edafinių savybių įtaka morfologiniams požymiams ir RAPD polimorfizmui	88
1.3. Radavietės geografinės padėties įtaka paprastosios avietės genetinei ir morfologinei įvairovei	93
1.4. Molekulinių (RAPD) žymenų ir morfologinių požymių priklausomybės tyrimas paprastosios avietės kolekcijos pavyzdžiuose	95
1.5. Superoksido dismutazės polimorfizmo tyrimai	96
2. Paprastosios avietės populiacijų tyrimai.....	98
2.1. Paprastosios avietės populiacijų individų genetinės įvairovės ir panašumo tyrimas	98

2.2. Paprastosios avietės populiacijų genetinė struktūra ir diferenciacija	103
2.3. Geografinių veiksnių įtaka populiacijų genetinei įvairovei.....	109
2.4. Skirtingų klimato sąlygų įtaka paprastosios avietės genetinei įvairovei	111
2.5. Genetinės įvairovės populiacijose priklausomybė nuo atstumo tarp rinktų augalų ir imties dydžio.....	113
2.6. Skirtingomis ekologinėmis sąlygomis augančių paprastosios avietės populiacijų genetinės įvairovės palyginimas	115
IV. REZULTATŲ APITARIMAS	123
1. Genetinės įvairovės tyrimas paprastosios avietės kolekcijoje.....	123
2. Genetinės įvairovės tyrimas gamtinėse paprastosios avietės populiacijose	134
IŠVADOS	145
MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS	146
PADEKA	148
LITERATŪROS SĄRAŠAS	149
PRIEDAI	166

SANTRUMPOS

AFLP – amplifikuotų fragmentų ilgio polimorfizmas (angl. *Amplified Fragment Length Polymorphism*)
AMOVA – molekulinės genetinės įvairovės (variacijos) analizė (angl. *Analysis of MOlecular VAriance*)
bp – bazių poros
cM – centimorgana
DNR – deoksiribonukleorūgštis
EDTA – etilendiamintetraacetatas
 F_{ST} – fiksacijos indeksas
 Φ_{PT} – tarppopuliacinė genetinė įvairovė
 GD_L – genetinis atstumas pagal Link (Link, 1995)
 GD_{NL} – genetinis atstumas pagal Nei ir Li (Nei, Li, 1979)
 GD_{SM} – genetinis atstumas pagal Sokal ir Michener (Sokal, Michener, 1958)
 GD_{xy} – genetinis atstumas tarp individų (angl. *Genetic Distance*)
 G_{ST} – genetinės diferenciacijos koeficientas (Nei, 1973)
h – Nei (1973) genų įvairovė
 H_e – vidutinis tikėtinas heterozigotiškumas
I – Šenono (Shannon'o) informacinis indeksas
ISSR – paprastų pasikartojančių sekų intarpai (angl. *InterSimple Sequence Repeats*)
Kb – kilobazė
Mb – megabazė
 n_a – vidutinis stebimas alelių skaičius lokuse
 n_e – efektyvių alelių skaičius lokuse
P – polimorfinių lokusų nuošimtis
PCA – principinių komponentų analizė (angl. *Principal Components Analysis*)
PCO – principinių koordinačių analizė (angl. *Principal Coordinate Analysis*)
PGR – Polimerazinė Grandininė Reakcija
RAPD – atsitiktinai pagausinta polimorfinė DNR (angl. *Random Amplified Polymorphic DNA*)
RFLP – restrikcijos fragmentų ilgio polimorfizmas (angl. *Restriction Fragment Length Polymorphism*)
SOD – superoksido dismutazė
SSR – paprastosios kartotinės sekos (angl. *Simple Sequence Repeat*)
TE – TRIS–EDTA buferis
TRIS – tris(hidroksimetil)aminometanas
UPGMA – (angl. *Unweighted Pair-Group Method of arithmetic Averages*)
VNTR – variabilių tandeminių pasikartojimų skaičius (angl. *Variable Number Tandem Repeats*)

ĮVADAS

Augalų genetiniai resursai yra svarbi gamtos išteklių dalis. Nuo senų laikų žmonės kaupė gamtoje randamus, vienokiu ar kitokiu pažiūriu naudingus augalus, kuriuos dauginė ir tobulino vertingąsias jų savybes. Dabartiniiais laikais, kai yra sukurta gausybė ekonomiškai ir ūkiškai vertingų augalų veislių, vis dažniau atsigręžiama į gamtoje aptinkamus jų laukinius giminaičius. Selekcijos procese kultūriniai augalai praranda daugelį vertingų požymių, nes selekcininkai dirba su ribotu skaičiumi genotipų ir požymių, naujoms veislėms išvesti naudoja gerai užsirekomendavusias, tačiau giminingas veisles. Dėl to dažnai prarandami kai kurie naudingi genai, pavyzdžiui, lemiantys atsparumą biotiniam ir abiotiniam stresui. Laukiniai augalai pasižymi žymiai didesne genetinė įvairove, atsparumu abiotiniams ir biotiniams veiksniams. Tai stebima tiriant ir paprastosios avietės genetinius išteklius (Jennings, 1988; Graham, McNicol, 1995). Įvairiais tyrimais įrodyta, kad paprastosios avietės veislėse genetinė įvairovė yra sumažėjusi (Graham, McNicol, 1995; Badjakov ir kt., 2006). Dėl to laukinės paprastosios avietės pavyzdžiai gali būti svarbūs genų donorai, kuriant naujas avietės veisles.

Paprastoji avietė (*Rubus idaeus* L.) yra plačiai paplitusi Šiaurės pusrutulyje, pasižymi didele morfologine, fenologine bei genetinė įvairove (Marshall ir kt., 2001; Ryabova, 2007). *Rubus* genties augalai priklauso Rosaceae šeimai, kuri jungia daug ekonomiškai svarbių augalų (Alice, Campbell, 1999; Marshall ir kt., 2001).

Paprastosios avietės genetiniai ištekliai tiriami, naudojant morfologinius, biocheminius bei molekulinis žymenis (Jennings, 1988; Graham ir kt., 1997; Marshall ir kt., 2001; Graham ir kt., 2003; Badjakov ir kt., 2006; Ryabova, 2007). Nors morfologiniai žymenys jau seniai naudojami genetiniams ištekliams įsigyti, tvarkyti ir saugoti, tačiau jie atspindi tik nedidelę augalo genomo dalį – koduojančius genus. Morfologinių požymių raiška labai priklauso nuo aplinkos sąlygų ir nuo augalo vystymosi stadijos.

Morfologinių žymenų trūkumus, atsirandančius vertinant ir tiriant genetinius išteklius, gali padėti įveikti molekuliniai žymenys. Dėl to vis dažniau atliekami kompleksiniai genetinių išteklių tyrimo darbai, kuriuose greta morfologinių žymenų naudojami ir molekuliniai žymenys (Wang ir kt., 2006, Sensoy ir kt., 2007).

Gamtinių populiacijų genetinės įvairovės tyrimas – svarbus žingsnis genetinių išteklių programose. Paprastoji avietė plačiai paplitusi Lietuvoje ir auga ekologiškai skirtingomis sąlygomis. Įvairių autorių tyrimai rodo, kad paprastosios avietės populiacijos yra prisitaikiusios prie lokalių aplinkos sąlygų ir reprodukcinio požiūriu gana izoliuotos, todėl į tai reikia atsižvelgti saugant šios rūšies genetinius išteklius (Marshall ir kt., 2001; Graham ir kt., 2003).

Lietuvoje paprastosios avietės genetiniai ištekliai pradėti tirti 2001 metais. VU Botanikos sode sukurta pirmoji paprastosios avietės gamtinių pavyzdžių kolekcija, kurią šiuo metu sudaro daugiau kaip šimtas skirtingų pavyzdžių iš visos Lietuvos. Norint racionaliai tvarkyti ir saugoti paprastosios avietės kolekciją, būtina įvertinti jos genetinę įvairovę molekuliniais metodais bei palyginti gautus rezultatus su vizualiai stebima morfologine įvairove. Be to, svarbu įvertinti, kiek kolekcijos pavyzdžiuose stebima genetinė įvairovė atspindi gamtinėse populiacijose nustatytą genetinę įvairovę.

DARBO TIKSLAS

Įvertinti paprastosios avietės genetinę įvairovę VU Botanikos sodo kolekcijoje ir Lietuvos gamtinėse populiacijose.

PAGRINDINIAI TYRIMŲ UŽDAVINIAI

1. Ištirti VU Botanikos sodo paprastosios avietės genetinę kolekciją, įvertinti jos genetinę įvairovę molekuliniais (RAPD) ir morfologinių žymenų metodais.
2. Įvertinti augavietės dirvožemio savybių įtaką avietės kolekcijos pavyzdžių DNR polimorfizmui.

3. Ištirti paprastosios avietės DNR polimorfizmą RAPD metodu gamtinėse Lietuvos populiacijose ir įvertinti jų genetinę įvairovę.
4. Įvertinti ekologinių ir geografinių veiksnių įtaką genetinės įvairovės pasiskirstymui paprastosios avietės populiacijose.

DARBO NAUJUMAS

Lietuvoje iki šiol buvo tirtos tik kultūrinių aviečių veislių biologinės ir ūkinės savybės, cheminė sudėtis bei morfologiniai požymiai. Paprastosios avietės gamtinių populiacijų struktūra ir genetinė įvairovė dar nebuvo tirta molekuliniais žymenų metodais.

Šis darbas – tai bandymas įvertinti VU Botanikos sodo paprastosios avietės gamtinių pavyzdžių kolekcijos genetinę įvairovę molekuliniais ir morfologiniais žymenų metodais, palyginti ją su gamtinėse populiacijose aptinkama genetinė įvairove. Pirmąkart Lietuvos paprastosios avietės populiacijose įvertintas genetinės įvairovės lygis ir nustatytas genetinės įvairovės pasiskirstymas jose. Nustatyta, kad paprastosios avietės, kaip ir kitų kryžmadulkių augalų, populiacijose didžiausia genetinės įvairovės dalis tenka vidupopuliacinei įvairovei, tačiau kartu stebimas ir didelis genetinės diferenciacijos lygis tarp populiacijų. Tai gali būti susiję su šių populiacijų prisitaikymu prie lokalių augimo sąlygų ir gamtinės atrankos sąlygotais kai kurių RAPD alelių dažnio pokyčiais.

Nustatytas paprastosios avietės kolekcijos genetinės įvairovės lygis buvo panašus į tirtų gamtinių populiacijų DNR polimorfizmo lygį. Tai leidžia manyti, kad VU Botanikos sodo paprastosios avietės kolekcija gerai reprezentuoja DNR polimorfizmą, kuris stebimas Lietuvos paprastosios avietės populiacijose.

Pirmąkart Lietuvoje įvertintas paprastosios avietės kolekcijos pavyzdžių morfologinių požymių įvairovės ryšys su DNR polimorfizmu.

Buvo parodyta, kad kai kurie aplinkos veiksniai (dirvožemio rūgštumas, vidutinis metinis kritulių kiekis) gali turėti įtakos paprastosios avietės RAPD lokusų polimorfizmui.

DARBO PRAKTINĖ REIKŠMĖ

Laukinė avietė yra potencialus genų donoras avietės veislių selekcijoje. Kolekcijos pavyzdžių genetinės įvairovės įvertinimas bei dalies pavyzdžių genotipavimas, pradmenų derinių RAPD polimorfizmui tirti parinkimas gali būti pritaikyta efektyviam kolekcijos tvarkymui, paprastosios avietės genetinių išteklių saugojimui ir panaudojimui molekulinei selekcijai. 9 kolekcijos pavyzdžiai iš mūsų 49 tirtų (JL01, JL09, JL10, JL34, JL40, JL41, JL44, JL64, JL65) bus rekomenduojami įtraukti į Lietuvos genetinių išteklių sąrašą ir toliau saugomi VU Botanikos sode.

Paprastosios avietės populiacijų tyrimai suteikia naujos informacijos apie šio Lietuvoje paplitusio ir ekologiniu požiūriu svarbaus augalo biologinius ir genetinius savitumus.

GYNIMUI PRISTATOMI TEIGINIAI

1. Paprastosios avietės kolekcija ir gamtinės populiacijos pasižymi dideliu DNR polimorfizmu.
2. Kai kurių tirtų morfologinių požymių įvairovė kolekcijoje nėra susijusi su RAPD lokusų polimorfizmu.
3. Paprastosios avietės populiacijose didžioji genetinės įvairovės dalis tenka individualių genotipų skirtumams esant akivaizdžiai genetinei diferenciacijai tarp populiacijų.
4. Paprastosios avietės kolekcijos molekulinė genetinė įvairovė gerai atspindi gamtinėse populiacijose stebimą molekulinę genetinę įvairovę.

DARBO APROBAVIMAS

Darbo tema paskelbti aštuoni moksliniai straipsniai, iš kurių trys – žurnaluose, įrašytuose į Mokslinės informacijos instituto sąrašą (ISI), penki – kituose užsienio žurnaluose.

Darbo rezultatai pristatyti mokslo visuomenei trejose tarptautinėse konferencijose Lietuvoje ir užsienyje.

DARBO APIMTIS

Darbą sudaro Santrumpos, Įvadas, Literatūros apžvalga, Tyrimų objektas ir metodai, Rezultatai, Rezultatų aptarimas, Išvados, Mokslinių darbų sąrašas, Padėka, Literatūros sąrašas ir Priedai.

Darbo apimtis – 181 puslapiai, jame pateikiamas 31 paveikslas, 31 lentelė ir Priedai, kuriuose yra 4 paveikslai ir 11 lentelių.

I. LITERATŪROS APŽVALGA

1. Genetiniai žymenys ir jų tipai

Žymenimis plačiąja prasme laikomi požymiai, kuriais remiantis galima atskirti taksonominius vienetus, populiacijas, individus tarpusavyje. Kai kurie autoriai žymenis skirsto į klasikinius genetinius ir šiuolaikinius molekulinis žymenis. Šie autoriai klasikiniams žymenims priskiria morfologinius, kurie buvo žinomi jau nuo G. Mendelio laikų ir izofermentus, kurių populiarumas išaugo 1970–1980 m. Molekulinių žymenų atsiradimas siejamas su naujų DNR tyrimo technologijų vystymosi pradžia – 1980–1990 m. (Foolad, 2007). Kiti autoriai (Lowe ir kt., 2004) išskiria dar citogenetinius (chromosomų skaičius, morfologija ir t.t.) ir biologinius (šeimininko – parazito/patogeno sąveika) žymenis. Nežiūrint įvairios žymenų klasifikacijos, jie visi yra genetiniai žymenys, kuriems galioja tie patys paveldimumo dėsniai. Genetiniai žymenys padeda aptikti ne tik atskirų individų, bet ir taksonominių vienetų genetinius skirtumus. Šiuolaikinė genetinių žymenų klasifikacija pagal Kumar (1999) pateikta pirmoje lentelėje.

1 lentelė. Genetinių žymenų tipai ir analizės lygmuo

Genetinių žymenų tipai	Analizės lygmuo
Morfologiniai	Fenotipas
Biocheminiai	Genų produktai (izofermentai, atsarginiai baltymai ir kt.)
Molekuliniai	Genotipas (DNR/ genų sekos)

Morfologiniai žymenys. Morfologiniai žymenys yra vieni pirmųjų žymenų, nuo kurių prasideda konkrečios genetinės medžiagos tyrimai. Šie žymenys jau seniai buvo naudojami rūšims, gentims ir šeimoms identifikuoti, sistematiems ryšiams (ypač homologijai) nustatyti ir išaiškinti. Jie yra svarbūs augalų selekcijai, nes padeda atskirti veisles bei linijas, augalų genetikai, ekologijai ir fiziologijai (ypač atskirų organų funkcijoms tirti). Tačiau morfologiniai žymenys turi keletą trūkumų, į kuriuos būtina atsižvelgti

naudojant juos tyrimams. Morfologiniams žymenims būdingas žemas paveldimumo ir polimorfizmo lygis, lėta požymio raiška bei didelis jautrumas aplinkai (klimato sąlygoms, augavietės ypatumams) ir jos pokyčiams (Smith, Smith, 1992). Dėl to, norint atskirti fenotipinę variaciją nuo genotipinės, kartais būtini specialūs eksperimentai ir atitinkamos dauginimo schemas. Kai kurioms augalų grupėms, pavyzdžiui, samanoms, netgi sunku surasti pakankamai morfologinių požymių, pagal kuriuos jos skirtųsi. Atsižvelgiant į morfologinių žymenų trūkumus, vis dažniau greta jų analizuojami ir molekuliniai (DNR) žymenys.

Molekuliniai žymenys. Molekuliniai žymenys – tai polimorfinės DNR sekos (polimorfinių lokusų aleliai), nustatomos naudojant įvairius molekulinės biologijos metodus (Jones ir kt., 1997; Schulman, 2007). Polimorfinių sekų atsiradimo priežastys – įvairūs mutacijų tipai (taškinės, chromosominės) arba DNR kartotinių sekų replikacijos klaidos (Paterson, 1996). Branduolio DNR polimorfizmas plačiai aptinkamas eukariotuose. Tai – praktiškai neribojama DNR savybė, kuri naudojama įvairiuose tyrimuose. Augaluose branduolio DNR evoliucionuoja greičiau palyginti su mitochondrijų ir chloroplastų DNR. Kai kuriuose organizmuose stebimas priešingas nei augaluose procesas. Pavyzdžiui, žinduolių mtDNR evoliucionuoja apie penkis kartus greičiau nei branduolio DNR, o gaubtasėklių augalų mtDNR – apie penkis kartus lėčiau nei jų branduolio DNR. Chloroplastų DNR evoliucionuoja maždaug perpus lėčiau nei branduolio DNR (Wolfe ir kt., 1987).

Powell ir kt. (1994), Weising ir kt. (2005), palyginę morfologinius ir molekulinis žymenis, nurodė pagrindines savybes, dėl kurių molekulinis žymenų taikymas vis labiau plečiasi: jie gali būti nustatomi bet kurioje augalo raidos stadijoje, yra vienodi visuose augalo organuose ir audiniuose, dažniausiai fenotipiškai neutralūs, žymiai mažiau priklauso nuo aplinkos sąlygų, neturi neigiamos įtakos augalų gyvybingumui, nesąveikauja tarpusavyje, pasižymi didele gausa ir didesniu kintamumu, molekulinis žymenų nustatymas ir darbas su jais gali būti automatizuojamas.

Atsižvelgiant į šias savybes, molekuliniai žymenys naudojami įvairiems augalų tyrimams: genomui tirti (pvz., genomams identifikuoti, genolapiams kurti, genams klonuoti, genetinių atstumų ir genetinio giminingumo patvirtinimui), genetinių išteklių įvertinimui ir saugojimui, populiacijoms tirti ir jų genetinei įvairovei įvertinti, augalų ligoms tirti, molekulinei augalų selekcijai (pvz., tiksliam veislių ir klonų testavimui), filogenetiniams ir ekologiniams tyrimams (Williams ir kt., 1990; Pašakinskienė ir kt., 2000; Weising ir kt., 2005).

Pasaulyje daugėja kompleksinių darbų, kuriuose morfologiniai žymenys tiriami kartu su molekuliniais žymenimis (Wen ir kt., 1999; Steiner ir kt., 2001; Briarda ir kt., 2002; Coleman ir kt., 2003; Labra ir kt., 2004; Wang ir kt., 2006; Sensoy ir kt., 2007).

Molekuliniai žymenys turi atitikti vis didėjančius jiems keliamus reikalavimus. Weising ir kt. (2005) nurodo, kad pagrindiniai reikalavimai, kuriuos turi atitikti molekuliniai žymenys, yra šie:

- turi būti pakankamai polimorfiški;
- dažnai ir tolygiai sutinkami genome;
- paveldimi kaip kodominuojantys požymiai (diploidiniame genome turi fenotipiškai skirtis heterozigotos ir homozigotos);
- turi būti neutralūs, t.y., kad neturėtų įtakos fenotipui;
- lengvai prieinami (perkami), nebrangūs;
- greitai ir patogiai nustatomi (tyrimo procesų automatizavimas);
- patikimai atsikartojantys;
- patogūs keičiantis informacija tarp laboratorijų.

Deja, šiandien dar nesukurti tokie universalūs molekuliniai žymenys, kurie atitiktų visus šiuos reikalavimus.

Molekuliniai žymenys skirstomi pagal jų nustatymo metodus, kurie pagrįsti DNR–DNR hibridizacija, polimerazine grandinine reakcija (PGR), DNR sekų nustatymu.

DNR sekoskaita – pats tiksliausias metodas, leidžiantis lyginti tarpusavyje besiskiriančius organizmus nukleotidų lygyje, nustatyti jų giminiškumą tam tikruose lokusuose. Tačiau šis metodas palyginti brangus ir užima daug laiko, todėl nelabai tinka tokiuose tyrimuose, kuriuose tiriama iškart daug individų (populiacijų genetikoje, molekulinėje selekcijoje). DNR sekoskaita plačiai taikoma molekulinėje sistematikoje, palyginamojoje genetikoje ir molekulinės evoliucijos tyrimuose. Tam naudojami lėtai evoliucionuojantys DNR regionai, pvz., chloroplastų *rbcL*, branduolio 18S ir 26S rRNR genai (Soltis, Soltis, 2000).

Šiuo metu sukurta daug molekulinių žymenų, tačiau pagrindiniai, dažniau naudojami, yra šie:

- DNR sekoskaita ar kitais būdais nustatomas vieno nukleotido polimorfizmas (angl. *Single Nucleotide Polymorphism* – SNP);
- restrikcijos fragmentų ilgio polimorfizmas (angl. *Restriction Fragment Length Polymorphism* – RFLP);
- amplifikuotų fragmentų ilgio polimorfizmas (angl. *Amplified Fragment Length Polymorphism* – AFLP);
- atsitiktinai pagausinta polimorfinė DNR (angl. *Random Amplified Polymorphic DNA* – RAPD);
- paprastųjų kartotinių sekų polimorfizmas (angl. *Simple Sequence Repeat* – SSR);
- paprastų pasikartojančių sekų intarpai (angl. *Inter-Simple Sequence Repeat* – ISSR).

Biocheminiai žymenys. Pirmieji biocheminiai žymenys buvo sukurti dar praeito amžiaus 6–ajame dešimtmetyje. Nors konservatyvių baltymų aminorūgščių seka išlieka evoliucijoje nepakitusi, aptiktas daugelio baltyminių sistemų (pradedant fermentais ir baigiant atsarginiais baltymais) polimorfizmas.

1966 m. buvo įrodytas biocheminis polimorfizmas populiacijose (Harris, 1966). Kadangi baltymai – vieni pirmųjų genų ekspresijos produktų, tai jų polimorfinės sistemos yra žymenys, kurie suteikia išsamią informaciją

apie genų raišką ir genotipą. Dauguma biocheminių žymenų – tai izofermentai, kurie pagal Tarptautinės biochemikų sąjungos Fermentų nomenklatūros komisijos rekomendacijas yra to paties fermento genetiškai determinuotos dauginės molekulinės formos, pasižyminčios tokiu pačiu substratiniu specifiškumu, esančios tame pačiame organizme, bet besiskiriančios kiekybiškai savo katalizinėmis ir kinetinėmis savybėmis. Augalų tyrimuose dažniausiai naudojami žymenys – alozimai – tai to paties geno skirtingų alelių koduojami izofermentai. Esant aktyviam lokusui abu aleliai veikia kodominuojančiai: homozigotose vyksta vieno tipo subvienetų sintezė, heterozigotose – dviejų. Tokių subvienetų struktūros skirtumai nedideli, nes jie skiriasi tik atskiromis aminorūgštimis. Tam tikros rūšies atskiro individo aleliai negali užtikrinti didelės fermentų įvairovės, tačiau visame rūšies genofonde alelių skaičius pakankamai didelis. Tai atspindi individualių organizmų biocheminį kintamumą ir variabilumą. Izofermentai, kaip vieni iš biocheminių žymenų, vertinami dėl to, kad:

- dauguma alozimų paveldimi kodominantiškai pagal Mendelio dėsnius;
- daugumos lokusų, koduojančių alozimus, raiška stebima įvairiuose audiniuose, o taip pat tame pačiame audinyje ontogenezės eigoje, visose augimo ir vystymosi stadijose;
- izofermentai dažnai atspindi audinio ar ląstelės specifiškumą;
- izofermentų nustatymo metodai yra lengvai prieinami, palyginti nebrangūs.

Nepaisant biocheminių žymenų populiarumo, jų metodai turi trūkumų: jais nustatoma palyginti nedidelė genetinės įvairovės dalis (pavyzdžiui, tiriant izofermentus elektroforezės būdu, nustatomi tik tie aleliai, kurie sąlygoja izofermentus besiskiriančius elektroforeziniu judrumu – virš 30% taškinių ir *nonsens* mutacijų neaptinkama). Sunkumų sudaro tai, kad baltymų išskyrimui tinka tik šviežia ar staiga užšaldyta medžiaga. Be to, dar neišspręstos kai kurių baltymų tirpumo, dažymo problemos. Biocheminių žymenų metodus sunku pritaikyti poliploidiniams organizmams (Baker, 2000; Zeidler, 2000; Lowe ir kt., 2004).

Alozimai, kaip biocheminiai žymenys, svarbūs tiriant genetinius išteklius, populiacijų genetinę struktūrą ir giminiškumą tarp populiacijų, sprendžiant miškininkystės ir žemdirbystės problemas, tiriant dauginimosi sistemas, kloninių augalų rūšių genetinę įvairovę, aplinkos stresų įvertinimui.

Molekuliniai žymenys yra žymiai jautresni, palyginti su biocheminiais. Jais galima aptikti genetinę variaciją nukleotidų lygyje. Biocheminių ir kai kurių molekulinų žymenų palyginimas pateiktas antroje lentelėje (pagal <http://www.fao.org/DOCREP/003/X6884E/x6884e03.htm>, Weising ir kt., 2005).

1.1. RAPD metodas, jo privalumai ir trūkumai

Polimerazinės grandininės reakcijos (PGR, angl. PCR – *Polymerase Chain Reaction*) atradimas ir pritaikymas praktikoje sąlygojo naujų molekulinų žymenų metodų sukūrimą. PGR buvo tinkamai įvertintas mokslo pasaulyje ir šiuo metu yra daugelio molekulinų metodų pagrindas. Atsitiktinai pagausintos polimorfinės DNR (RAPD) metodas buvo sukurtas išsiaiškinus, kad PGR kartu su atsitiktinės sekos pradmenimis gali būti naudojama atsitiktiniams DNR lokusams pagausinti, ir kad tie lokusai gali būti labai polimorfiški. 1990 metais dvi tyrėjų grupės, nepriklausomai viena nuo kitos, pasiūlė PGR naudoti atsitiktinių DNR sekų pagausinimui. Tokiu būdu gauti polimorfiniai DNR fragmentai gali būti naudojami kaip molekuliniai žymenys (Welsh, McClelland, 1990; Williams ir kt., 1990).

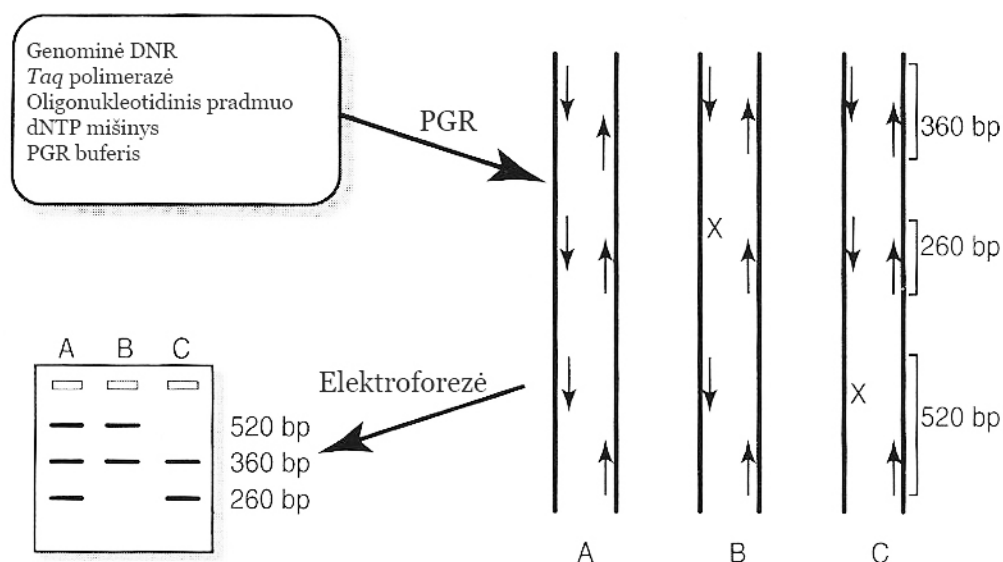
2 lentelė. Biocheminių žymenų (alozimų) ir pagrindinių molekulinų žymenų metodų palyginimas

Metodas Požymis	Alozimai	RFLP	SSR	RAPD	AFLP	Sekoskaita
Atradimo metai	1966	1980	1996	1990	1995	1975
Metodo principas	Baltymo pirminės sekos polimorfizmas	Restrikcijos saitų įvairovės nustatymas	Paprastųjų kartotinių sekų pagausinimas	Atsitiktinai išsibarsčiusių genomo sekų įvairovė	PGR arba restrikcijos saitų įvairovė, naudojant modifikuotus pradmenis	PGR produktų tiesioginė sekoskaita, nukleotidų polimorfizmo nustatymas
Tyrimui reikalingas medžiagos kiekis	~0,1 g	2–10 µg/takeliui	25–50 ng	2–10 ng	0,2–1 µg	10–25 ng
Būtinumas žinoti tiriamos DNR seką	Nebūtina	Nebūtina	Būtina	Nebūtina	Nebūtina	Priklausomai nuo metodikos
Radioaktyvus žymėjimas	–	–/+	–/+	–	–/+	–/+
Polimorfizmo lygis	Žemas	Vidutinis	Aukštas	Vidutinis	Vidutinis	Vidutinis
Dominavimas	Dažniausiai dominuojantys	Kodominuojantys	Kodominuojantys	Dominuojantys	Dominuojantys/kodominuojantys	Kodominuojantys
Atsikartojamumas	Vidutinis/aukštas	Aukštas	Aukštas	Vidutinis	Vidutinis	Aukštas
Teorinis galimų lokusų skaičius genome	Nedidelis	Apribotas restrikcijos saitų polimorfizmo (dešimtys–tūkstančiai)	Apribotas genomo dydžio ir paprastųjų kartotinių sekų kiekio (dešimtys–tūkstančiai)	Apribotas genomo dydžio ir nukleotidų polimorfizmo (dešimtys–tūkstančiai)	Apribotas restrikcijos saitų polimorfizmo (dešimtys–tūkstančiai)	Didelis

2 lentelės tęsinys

Metodas		Alozimai	RFLP	SSR	RAPD	AFLP	Sekoskaita
Požymis							
Metodo sudėtingumas		Paprastas	Sudėtingas	Sudėtingas	Paprastas	Vidutinis	Sudėtingas
Automatizavimo galimybė		–	Dalinai	+	+	+	+
Kaštai		Maži	Vidutiniai/dideli	Dideli	Maži	Dideli	Dideli
Pritaikymo galimybės	Genetinei įvairovei	Geros	Puikios	Geros	Geros	Geros	Puikios
	Populiacijų diferenciacijai	Puikios	Geros	Geros	Geros	Geros	Puikios
	Genų srautui	Geros	Geros	Puikios	Taikoma	Buvo taikoma	Puikios
	Hibridizacijai	Geros	Puikios	Vidutinės	Geros	Geros	Geros
	Filogeneti- niams ryšiams	Buvo taikoma	Vidutinės	Buvo taikoma	Retai	Netaikoma	Puikios
	Individualiam genotipavimui	Buvo taikoma	Geros	Puikios	Puikios	Puikios	Puikios

RAPD metodo pagrindai. RAPD metodas paremtas PGR, naudojami neilgi (dažniausiai 10–ies nukleotidų ilgio) pradmenys. Vykstant amplifikacijai, nuo genominės DNR susintetinami nežinomos sekos trumpi DNR amplikonai, kurie po gelio elektroforezės ir dažymo matomi kaip polimorfiniai DNR fragmentai. PGR metu padauginama DNR sekos dalis, esanti tarp pradmenų prisijungimo vietų (1 pav.).



1 pav. RAPD metodo schema (pagal Weising ir kt., 2005)

RAPD analizei atlikti reikalinga tiriamojo organizmo DNR, temperatūrai atspari *Taq* polimerazė, oligonukleotidinis pradmuo(-ens), $MgCl_2$, keturių deoksiribonukleotidų mišinys ir atitinkamas reakcijos buferis. Pradmuo prisitvirtina prie tam tikrų DNR sekų ir, jei du pradmenys prisitvirtina tinkamu atstumu vienas priešais kitą, tada DNR seka tarp jų yra pagausinama. PGR produktai atskiriami agarozės ar poliakrilamido gelyje ir vizualizuojami dažant etidžio bromidu.

RAPD polimorfizmas atsiranda dėl įvairių priežasčių:

- didelio DNR segmento įsiterpimas tarp pradmenų prisijungimo prie DNR vietų gali pernelyg nutolinti juos vieną nuo kito ir *Taq* polimerazė nebeatpažins užbaigti DNR sintezės nuo vieno pradmens iki kito, tai gali sąlygoti fragmento praradimą;

- mažo DNR segmento įsiterpimas arba iškritimas lemia fragmento dydžio pokyčius;
- vieno iš dviejų pradmenų prisijungimo vietų iškrita lemia fragmento praradimą arba jo dydžio pokyčius;
- mutacijos vieno ar abiejų pradmenų prijungimo vietose taip pat gali sukelti PGR produkto išnykimą arba jo dydžio pokyčius.

Williams ir kt. (1993) pasiūlė formulę, pagal kurią galima teoriškai apskaičiuoti, kiek PGR produktų galima tikėtis tam tikro dydžio genome, kai pradmenų prijungimas prie DNR matricos įmanomas tik esant 100% homologijai:

$$b = (2000 \times 4^{-2n}) \times C$$

b – laukiamų PGR produktų konkrečiam pradmeniui skaičius, n – pradmens ilgis nukleotidais, C – haploidinio genomo dydis bazių poromis.

Tačiau tyrimų rezultatai rodo, kad PGR produktų skaičius dažniausiai nepriklauso nuo genomo dydžio. Taip pat nustatyta, kad RAPD fragmentų skaičius, tenkantis vienam pradmeniui, nepriklauso ir nuo tiriamo genomo ploidiškumo.

Literatūros šaltiniai nurodo, kad dauguma RAPD lokusų nustatomi branduolio DNR (Lu ir kt., 1997). Tačiau taip pat yra duomenų, kad nemažai RAPD lokusų nustatomi ir mitochondrijų DNR (Aagaard ir kt., 1998). Vieni autoriai nurodo, kad dažniausiai RAPD gaunami iš kartotinių genomo sekų (Williams ir kt., 1990; Devos, Gale, 1992), kiti – kad jie amplifikuojami iš unikalių arba mažakopijinių DNR sekų (Bodenes ir kt., 1997; Lu ir kt., 1997).

PGR metodui tobulėjant ir ieškant vis platesnių pritaikymo sričių, atsirado kelios jo variacijos, kuomet, panašiai, kaip ir RAPD, naudojami atsitiktinės sekos pradmenys:

- AP–PGR (angl. *Arbitrarily Primed PCR*) metodas, kurį 1990 m. pasiūlė Welsh ir McClelland. Naudojami 20–ies ir daugiau nukleotidų ilgio pradmenys ir radioaktyvūs nukleotidai, PGR produktai atskiriami poliakrilamido gelyje. Galimi ir paprastesni AP–PGR variantai, kai

dažoma sidabru arba etidžio bromidu, fragmentai atskiriami agarozės gelyje.

- DAF (angl. *DNA Amplification Fingerprinting*) metodas, kurį 1991 m. pasiūlė Caetano–Anolles su bendradarbiais. DAF naudojami trumpi pradmenys (5–8 nukleotidai) palyginti didelėmis koncentracijomis (~3 μ M), pagausinti DNR fragmentai atskiriami poliakrilamido gelyje, dažomi sidabru.

Iš visų šių PGR variacijų RAPD naudojamas dažniausiai. Tai lėmė jo paprastumas ir plačios pritaikymo galimybės. 1990–2006 metais paskelbta apie 9000 mokslinių darbų, kuriuose buvo panaudotas šis metodas ir artimiausias jam, modifikuotas AP–PGR metodas (Atienzar ir kt., 2006).

RAPD metodo privalumai:

- nereikia iš anksto žinoti tiriamojo objekto DNR sekos;
- tyrimui nesunaudojamas/nesunaikinamas visas individas, nes pakanka nedidelio kiekio DNR;
- nenaudojamas žymėjimas radioaktyviomis žymėmis;
- techniškai nesudėtingas metodas, kurį galima automatizuoti;
- pigus ir palyginti greitas metodas;
- pradmenys lengvai prieinami – juos galima nusipirkti arba susintetinti pagal tyrėjo pageidavimą.

Kaip ir kiekvienas metodas, RAPD turi savų trūkumų. Jis gana jautrus eksperimento sąlygoms, todėl nukenčia rezultatų atsikartojamumas. Rezultatų vertinimą apsunkina ir tai, kad RAPD fragmentai yra dominuojantys žymenys, vienodai matomi tiek homozigotinėje, tiek heterozigotinėje būsenoje. RAPD fragmentų buvimo/nebuvimo vertinimas taip pat labai priklauso nuo tyrėjo patyrimo. RAPD juostos ne visada yra to paties lokuso aleliai. Tačiau yra įrodyta RAPD juostų homologija tos pačios rūšies ribose (Williams ir kt., 1990; Tingey, Del Tufo, 1993). To paties dydžio juostų homologija skirtingose rūšyse kelia abejonių (Van de Zande, Bijlsma, 1995). Įsitikinti fragmentų homologija galima šiais būdais:

- klonuotų fragmentų hibridizacija;
- iš gelio išpjautų fragmentų RFLP;
- lokusų palyginimu genolapiuose.

RAPD metodo taikymas. Dėl savo paprastumo, patogumo ir greitumo šis metodas plačiai taikomas įvairiose genetikos šakose: evoliucinėje genetikoje, populiacijų genetikoje, filogenetikoje ir sistematikoje, lyties genetikoje, imunogenetikoje, genotoksikologijoje ir karcinogenezės tyrimams.

RAPD gali būti ir kaip pagrindinis tyrimo metodas, ir kaip gretutinis, kai reikia palyginti keliais metodais gautus rezultatus:

- genetinės įvairovės tyrimams;
- genolapių sudarymui;
- veislių identifikavimui;
- giminiškumo nustatymui;
- atsparumui ligoms ir kenkėjams tirti;
- taksonomijos ir biosistematikos problemoms spręsti.

2. Molekulinių žymenų taikymas genetinių išteklių įvertinimui

2.1. Genetiniai ištekliai, jų saugojimo būdai

Nuo senų laikų žmonės rinko bei naudojo laukinius augalus maistui, vaistams, būsto statybai ir kitoms reikmėms. Natūralioje aplinkoje rastus vertingiausias egzempliorius išmoko pasidauginti, tobulino jų savybes, taip išvesdami naujas veisles, sukurdami hibridus. Taigi, kiekvienos veislės pradininkė yra atitinkama laukinė rūšis. Neretai tik laukinės rūšys turi daug savybių, padedančių joms prisitaikyti prie kintančių aplinkos sąlygų, apsisaugoti nuo kenkėjų, o veislėse yra išryškėjusios tik viena ar kelios ūkiniu požiūriu svarbios savybės: ankstyvesnis derėjimo laikas, didesnis derlius, atsparumas kokiam nors biotiniam ar abiotiniam veiksniai, ar geresnė cheminė sudėtis. Todėl laukinės rūšys buvo, yra ir bus vertingas genų šaltinis augalų selekcijoje. Genetinių kolekcijų prasmė ir yra kaupti jose natūraliai augančius augalus su svarbiomis savybėmis, juos genetiškai identifikuoti ir išsaugoti

ateities kartoms. Kitos aplinkybės, verčiančios kaupti genetinius išteklius, yra nuolat kintančios klimato sąlygos, beatodairiška žmonių ūkinė veikla, miškų kirtimas, vietovių apgyvendinimas. Dėl šių veiksnių didėja genetinė erozija – prarandama genetinė įvairovė, rūšys, atsidūrusios nepalankiose sąlygose, išnyksta. Domestikacija – laukinių augalų sukultūrinimas, naujų veislių išvedimas, sąlygoja morfologinių požymių ir bendrai genetinės įvairovės praradimą (Graham ir kt., 2004; Zhou ir kt., 2005; Sensoy ir kt., 2007). Tai savo ruožtu mažina kultivuojamų veislių plastiškumą kintančios aplinkos sąlygomis, mažina jų atsparumą kenkėjams. Tokiems augalams gali būti sunku pritaikyti šiuolaikines agrotechnikos priemones (Asins, Carbonell, 1989).

Šiuolaikiniu požiūriu genetiniai ištekliai – tai anksčiau žmogaus sukurtos veislės, moderniosios komercinės veislės, hibridai, laukiniai giminaičiai, įvairi genetinė medžiaga (Cohen ir kt., 1999). Kaupiamų genetinių išteklių genetika bando apibendrinti tai, ką mes turime vertingo ir sukurti strategijas tai įvairovei įvertinti bei išsaugoti. Augalų genetinių išteklių kaupimas pradėtas kartu su augalų selekcija, kai atsirado praktinis poreikis žinoti augalų vertingas savybes, kad būtų galima jas panaudoti vertingoms veislėms ir hibridams gauti. Šiuo metu pasaulyje aktyviai saugoma palyginti nedaug augalų rūšių ir veislių. Augalų augintojai visada renkasi auginti tas augalų rūšis ar veisles, kurios yra įprastos vietinėmis aplinkos sąlygomis.

Augalų genetiniai ištekliai saugomi *ex situ* ir *in situ*. Saugojimas *ex situ* – tai arba augalų, perkeltų iš natūralių, dažnai pažeistų, augaviečių į naujas ar į žmogaus prižiūrimas augavietes, auginimas, arba sėklų saugojimas specialiose saugyklose. Kad sėklos neprarastų gyvybingumo, reikalinga regeneracija, t.y. pakeitimas naujomis sėklomis. Tinkamai paruoštos daugelio augalų sėklos (sveikos, išdžiovintos) gali būti ilgai saugomos genų bankuose. Kai kurių augalų sėkloms (jos vadinamos rekalitrantinėmis) reikalingos specialios saugojimo *ex situ* sąlygos, nes sėklos labai jautrios drėgmei ir temperatūros pokyčiams. Tokių augalų sėklos ir vegetatyviškai dauginamų augalų genetinė medžiaga dažnai saugoma *in vitro* kultūrose. Tačiau saugant tokiu būdu, iškyla genetinio nestabilumo pavojus, kai pasireiškia somakloninis kintamumas.

Augalų (pvz., bulvių, vaismedžių), kurių sėklos negali būti saugomos sėklų bankuose, genetinė medžiaga yra saugoma lauko kolekcijose (Pons ir kt., 1998). Genetinius išteklius aktyviai kaupti *ex situ* pradėta apie 1970 metus (Wright, 1997). Genetinės medžiagos kolekcijų steigimas (saugojimas *ex situ*) yra daugelį metų trukusių pastangų išsaugoti augalų įvairovę rezultatas. Tokiose kolekcijose saugomų augalų genetinė ir fenotipinė įvairovė gali būti plačiai naudojama ne tik selekcijoje, bet ir fundamentaliuose tyrimuose, tiriant augalų evoliuciją, atsparumą įvairiems veiksniams, genų ekspresiją. Yra keletas genetinių išteklių genetinėse kolekcijose tyrimo kryptių. Daugiausia paskelbtų mokslinių darbų yra susiję su genetinės įvairovės įvertinimu kolekcijos pavyzdžiuose, taikant morfologinius, biocheminius ir molekulinis žymenis. Gana plačiai yra tiriamas genetinių kolekcijų atsparumas ligoms ir kenkėjams. Dažnai genetinėse kolekcijose yra tiriamos selekcinės augalų ypatybės: kryžminimosi galimybės, tarprūšinė hibridizacija, somatinių hibridų gavimo perspektyvos (Dudnik ir kt., 2001).

Genetinių išteklių saugojimas *in situ* – tai augalų saugojimas augimo vietoje. Šis genetinės medžiagos saugojimo būdas yra mažiausiai nutolęs nuo natūralių aplinkos sąlygų. Augalai *in situ* gali būti saugomi dviem būdais: natūraliose augavietėse, nekeičiant įprastinės aplinkos, ir dirbtinai žmogaus sukurtose augavietėse, kuriose jie yra prižiūrimi, auginami taikant jiems būdingą agrotechniką.

Molekuliniai žymenys labai plačiai taikomi genetinių kolekcijų tvarkymui ir įvertinimui:

1) kolekcijos pavyzdžiams įsigyti – svarbu tinkamai pasirinkti genetinę medžiagą, kurią reikia įtraukti į genetines kolekcijas. Molekuliniai žymenys gali būti vartojami genetinei įvairovei tarp turimų ir numatomų įsigyti genų banko pavyzdžių įvertinti. Jie gali suteikti vertingos informacijos, kaip teisingai sudaryti genetines kolekcijas, kad jos optimaliai atspindėtų genetinę įvairovę;

2) medžiagai išlaikyti – genetiniai pavyzdžiai, kurie saugomi genų bankuose, turi būti tinkamai palaikomi. Periodiškai tikrinamas jų

gyvybingumas, jei jis sumažėja, pavyzdžiai atnaujinami. Atnaujinimo metu būtina kontroliuoti, ar neįvyko genetinės įvairovės pokyčių, nepakito alelių dažniai dėl nevienodo sėklų gyvybingumo, daigumo, derlingumo ir kitų priežasčių. Norint nustatyti genetinės įvairovės lygį prieš ir po šios procedūros, naudojami molekuliniai žymenys (Chebotar ir kt., 2002). Molekuliniai žymenys taip pat gali būti naudojami ir tinkamų genetinės medžiagos laikymo/saugojimo sąlygų parinkimui, patikrinti, ar saugomi pavyzdžiai nėra užkrėsti;

3) genetinės medžiagos apibūdinimui ir utilizavimui – genetinė medžiaga, saugoma genų bankuose, turi būti tiksliai identifikuota. Molekuliniiais žymenimis įvertinama genetinė įvairovė kolekcijose, ypač tai svarbu sudarant bazines (angl. *core collection*) kolekcijas. Dublikatai, jei tokių yra randama, yra pašalinami ir tokiu būdu sumažinamos genų bankų saugojimo išlaidos (Van Hintum, Van Treuren, 2002).

Genetinių išteklių įvertinimui naudojami įvairūs biocheminių ir molekulinų žymenų metodai (izozimų analizė, RAPD, AFLP, RFLP, ISSR) arba jų deriniai. Šie metodai padeda:

1) įvertinti bendrą giminiškumą pagal pasirinktą grupavimo sistemą (pagal tiriamų pavyzdžių panašumą ar genetinius atstumus nubraižomos dendrogramos);

2) nustatyti genetinės įvairovės rodiklius (vidutinį heterozigotiškumą, efektyvių alelių skaičių, vidutinę genetinę įvairovę) tarp tiriamų genetinių pavyzdžių;

3) apskaičiuoti molekulinę variaciją (AMOVA), tuo atveju, jei genetinius pavyzdžius galima suskirstyti į mažesnes grupes pagal kokį nors pasirinktą kriterijų (Virk ir kt., 2000).

Genetinės įvairovės nustatymas senosiose ir naujosiose veislėse leidžia palyginti genetinę įvairovę kultūrinėse ir laukinėse giminingose rūšyse. Labai svarbu žinoti, kokios priežastys ir veiksniai nulėmė didesnę ar mažesnę tiriamojo objekto genetinę įvairovę, kokiomis ekologinėmis ir geografinėmis sąlygomis ši įvairovė yra optimali.

Molekulinių žymenų metodai plačiai taikomi rengiant nykstančių rūšių išsaugojimo strategijas. Naudojant šiuos metodus, genetinei analizei atlikti pakanka nedidelės augalo dalies, iš kurios, išskyrus genomine DNR, galima įvertinti genetinę įvairovę vienos ar kitos rūšies pavyzdžiuose. Pavyzdžiui, buvo tirta šilingė (*Lysimachia minoricensis*), kuri neaptinkama natūraliai gamtoje Balerų salose nuo XX a. pradžios, tačiau plačiai auginama botanikos soduose. Kadangi ši rūšis jau buvo tirta pagal 22 izozimų lokusus ir jokios įvairovės nebuvo nustatyta, tai buvo pabandyta įvertinti 8–ių Europos botanikos sodų kolekcinių augalų genetinę įvairovę pagal RAPD žymenis. Panaudojus 4 pradmenis, polimorfinių juostų nebuvo gauta, tai parodo augalų identiškumą ir genetinės įvairovės nebuvimą pradinėje sėjamojoje medžiagoje (Calero ir kt., 1999). Kaip parodė genealoginiai duomenys, visi tirti pavyzdžiai buvo kilę iš sėklų, gautų iš vieno šaltinio – Barselonos botanikos sodo. Taigi, tokie rezultatai rodo, kad saugant retas ir nykstančias rūšis, būtina atsižvelgti į jų vidurūšinę įvairovę ir stengtis ją išsaugoti.

Molekuliniai žymenys svarbūs genetinių išteklių įvertinimui, ypač nustatant veislių, hibridų, linijų identiškumą. Mokslinėje literatūroje yra daug pavyzdžių, kai molekulinių žymenų metodais yra tiriamos genetinės kolekcijos, vertinami tam tikrų geografinių regionų genetiniai ištekliai. Pavyzdžiui, tiriant RAPD metodu nuo sausros nykstančias akacijų *Acacia raddiana* populiacijas, išsibarsčiusias didelėje Izraelio Negev dykumos teritorijoje, paaiškėjo, kad tarp jų yra žymi genetinė diferenciacija. Buvo patvirtintos dvi šio augalo invazijos bangos ir parodyta, kad norint išsaugoti šios rūšies genetinę įvairovę, būtina įtraukti į genetinių išteklių apsaugos programą visas besiskiriančias populiacijas (Shrestha ir kt., 2002). Molekulinių žymenų metodai taip pat naudojami, kai reikia nuspręsti, koks optimalus pavyzdžių skaičius turi būti įtraukiamas į genetinę kolekciją, kad būtų išlaikyta pakankama genetinė įvairovė. Garkava–Gustavsson ir kt. (2005), tirdami RAPD metodu bruknės (*Vaccinium vitis-idaea*) 15 populiacijų genetinę įvairovę ir *ex situ* išsaugojimo galimybę, pastebėjo, kad būtina atsižvelgti į Nėjaus (Nei) genetinę įvairovę, Shannon'o informacinį indeksą ir retas RAPD

juostas. Pastarosios gali būti susiję su retais genais ar genetiniais lokusais. Molekulinių žymenų pagalba galima nustatyti, kiek ir kokius genetinius rodiklius turinčių pavyzdžių galima įtraukti į bazines kolekcijas, kurios atspindi visą tam tikros rūšies genetinę įvairovę.

Norint tinkamai rūpintis savo šalies genetiniais ištekliais, reikia tiksliai žinoti, ką mes turime, ką norime ir privalome išsaugoti.

2.1.1. Genotipų identifikavimas

Vieno genotipo atskyrimas nuo kito molekulinės biologijos metodais vadinamas genotipavimu. Augalų genotipavimas gali būti pritaikomas labai įvairiose srityse. Kaip žmogaus pirštų antspaudų ir DNR genotipavimo metodai plačiai taikomi kriminalistikoje, taip ir augalų DNR genotipavimas gali būti taikomas teisinėje praktikoje. Kriminalistinėje botanikoje molekulinių žymenų metodai naudojami nustatant augalinių narkotinių preparatų kilmę. Pavyzdžiui, jei nustatoma, kad visi augalai genetiškai identiški, daroma išvada, kad jie buvo padauginti auginiais ir galbūt išauginti pagrindinėje laboratorijoje, t.y., tokį faktą galima panaudoti, kaip įkaltį (Miller Coyle ir kt., 2001). Augalų dalys, kaip daiktiniai įrodymai, panaudojami išaiškinant įvairius nusikaltimus, identifikuojant nelegaliai auginamas ir platinamas patentuotas augalų rūšis ir veisles, retų, draudžiamų įvežti iš užsienio, augalų rūšių aptikimui. Pavyzdžiui, RAPD metodu ištyrus rinkoje platinamus braškių sodinukus, paaiškėjo, kad tai buvo nelegaliai, nusižengiant autorinėms teisėms, platinami patentuotos braškių veislės 'Marmolada'® augalai (Congiu ir kt., 2000). Šiuo požiūriu, DNR molekuliniai žymenys yra labai patogūs ir vertinami, nes analizei atlikti pakanka labai mažo medžiagos kiekio.

Genotipų identifikavimas svarbus ir farmakologijoje norint atskirti vaistinius augalus nuo morfologiškai panašių vaistinėmis savybėmis nepasižyminčių giminiškų rūšių. Dnyaneshwar ir kt. (2006) parodė, kad RAPD–SCAR metodu nustatčius rūšiai specifinį žymenį, galima identifikuoti vaistinio augalo pėdsakus milteliuose, sumaišytuose iš kelių rūšių augalų.

Kultivuojant augalus, vykdant jų selekciją, keičiantis genetinė medžiaga tarp augintojų, kaupiant genetinius išteklius ir saugant autorines teises, reikia tiksliai identifikuoti auginamas veisles. Tradiciniai veislių identifikavimo metodai dažniausiai paremti morfologija (Lisek ir kt., 2005). Morfologinių žymenų metodai yra palyginti pigūs, tačiau jų taikymas yra ribotas:

- sunku atskirti giminingas veisles;
- dažnai neįvertinama aplinkos ir taikomos agrotechnikos įtaka, dėl to gali žymiai pasikeisti auginamų augalų morfologiniai požymiai, kurie, nors ir nebus paveldimi pokyčiai, tačiau apsunkins veislės identifikaciją;
- įvairūs morfologiniai požymiai, kuriais remiamasi identifikuojant veislę, išryškėja tik tam tikrose, dažniausiai vėlyvose, augalo raidos stadijose.

Taigi, pastaraisiais metais veislėms identifikuoti šalia morfologinių vis dažniau naudojami ir molekuliniai žymenų metodai.

Tiriant įvairias brokolių ir žiedinių kopūstų veisles RAPD metodu, buvo pastebėta, kad brokolių veislės pasižymi žymiai mažesniu polimorfizmu, palyginus su žiedinių kopūstų veislėmis. Tai rodo tam tikrą konservatyvumą, atsirandantį kuriant brokolių veisles. Buvo aptikta ir heterogenišku veislių, pvz., žiedinių kopūstų veislė 'Snowball'. Tiek brokolių, tiek žiedinių kopūstų veislių RAPD fenotipuose aptikta ir monomorfinių juostų, kurios įrodo bendrą šių augalų kilmę iš kopūsto *Brassica oleracea* (Hu, Quiros, 1991).

RAPD metodas taip pat naudojamas aptikti somakloninį kintamumą genetinėse kolekcijose. Augalų dauginimui ir vertingų genotipų saugojimui plačiai naudojamas augalų kultūrų metodas. Reiškiny, kai regenerantai skiriasi nuo tėvų, vadinamas somakloniniu kintamumu. Dažniausiai tai būna fenotipiniai skirtumai. Somakloninis kintamumas yra bendras auginimo *in vitro* ląstelių ir audinių dėsningumas (Sliesaravičius, Stanys, 2005). Pokyčius lemia įvairios priežastys: eksplanto prigimtis, ontogenezinis eksplanto amžius, maitinamosios terpės sudėtis ir kultūros amžius.

Tiriant orchidėjos *Phalaenopsis* regenerantus RAPD metodu, buvo įrodyta, kad normalių ir pakitusių regenerantų DNR skiriasi. Morfologiškai tiek normalių, tiek pakitusių regenerantų lapai buvo vienodi, tačiau skyrėsi

žiedų morfologija. *Phalaenopsis* pražysta tik ketvirtaisiais metais, todėl RAPD metodu galima daug greičiau aptikti somakloninius pokyčius, nelaukiant, kol augalas pradės žydėti (Chen ir kt., 1998). Tyrimai, atlikti su valgomuoju česnaku (*Allium sativum*), parodė, kad regenerantams būdinga fenotipinė, molekulinė ir citologinė įvairovė (Al-Zahim ir kt., 1999). RAPD metodu neaptikta somakloninio kintamumo gvėnėjinių alyvpalmių (*Elaeis guineensis*) regenerantuose, galbūt todėl, kad šiuose augaluose fenotipinis kintamumas aptinkamas gana retai – tik 5% visų regenerantų skiriasi savo žiedo sandara nuo motininio augalo (Rival ir kt., 1998). Be to, ne visada morfologiškai skirtinguose regenerantuose pavyksta nustatyti DNR polimorfizmą. Pavyzdžiui, tiriant morfologiškai ir citogenetiškai skirtingus paprastosios eglės (*Picea abies*) to paties individo klonus, RAPD polimorfizmo juose nenustatyta (Fourré ir kt., 1997). Taigi, RAPD lokusų polimorfizmo nebuvimas negali būti vieninteliu genetinio stabilumo kriterijumi.

Nustatyta, kad tarp klonų dažnai egzistuoja ir epigenetiniai skirtumai (Fraga ir kt., 2002), kurie gali turėti įtakos fenotipui. Nors kai kurie mokslininkai mano, kad DNR metilinimo pokyčiai veikia RAPD lokusų polimorfizmą (Olmos ir kt., 2002), tačiau šiam teiginiui pagrįsti dar trūksta eksperimentinių įrodymų.

2.2. Genetinės įvairovės tyrimai RAPD metodu

Genetinė įvairovė, pagal vieną iš daugelio apibrėžimų, suprantama kaip individų, populiacijų bei rūšių kintamumas. Pastaruoju metu žmogus vis labiau atsigręžia į gamtą, kaip į natūraliai egzistuojantį vertingų genų šaltinį. Genetinė įvairovė yra svarbi laukinių rūšių išgyvenimui ir kaip genetinės variacijos šaltinis kultūriniam augalams. 95% Žemės sausumos plotų užima žmogaus gyvenvietės ir dirbtinės bei pusiau dirbtinės ekosistemos, skirtos tenkinti žmogaus poreikius. Dėl žmogaus vykdomos ūkinės veiklos natūralios ekosistemos suskaidomos arba sunaikinamos, rūšys žūva arba staigiai sumažėja individų skaičius jose, vietinės rūšis pakeičia atneštinės, žemės ūkyje

naudojamos cheminės augalų apsaugos priemonės skatina atsparių piktžolių atsiradimą.

Augalų genetinė įvairovė yra svarbi mūsų planetos natūralių resursų dalis. Ji priklauso nuo rūšies dauginimosi būdo ir evoliucijos, ekologinių ir geografinių veiksnių, daugeliu atvejų – nuo konkrečios žmogaus veiklos (Rao, Hodgkin, 2002).

2.2.1 RAPD metodo taikymas augalų populiacijoms tirti

Populiacijų genetinė analizė remiasi neutralios molekulinės evoliucijos teorija, kurią 1968 metais sukūrė japonų biologas M. Kimura. Ši teorija teigia, kad genetinės įvairovės lygis populiacijose yra per didelis, kad jį būtų galima paaiškinti gamtinės atrankos veikimu. Didžioji šio polimorfizmo dalis yra neutrali atrankos atžvilgiu. Jį palaiko mutacijos ir genų dreifas. Vis dėl to neutralumo teorija neneigia natūralios atrankos. Atranka veikia tik nedidelį skaičių mutacijų. Didžioji dalis fiksuotų mutacijų yra neutralios prisitaikymo požiūriu (Baker, 2000; Nordborg ir kt., 2002).

Populiacijų genetiniai tyrimai leidžia geriau suprasti evoliucinius procesus, populiacijų ir atskirų rūšių istoriją (Zhang ir kt., 2003). Genetiniai metodai, taikomi populiacijų tyrimuose, turi padėti geriau suprasti genetinį kintamumą, kuris aptinkamas tarp skirtingų tos pačios rūšies populiacijų ir pačios tiriamosios populiacijos viduje tarp skirtingų individų. Genetinį rūšies kintamumą lemia daug veiksnių: dauginimosi sistemų ypatumai, istorinė rūšies raida, augavietės ekologija. Nauji DNR analizės metodai leidžia žymiai efektyviau įvertinti populiacijų genetinę variaciją palyginti su izofermentų analize. Augalų populiacijų tyrimuose ypač išpopuliarėjo polimerazinės grandininės reakcijos pagrindu sukurti metodai, vienas kurių – RAPD. Šis metodas ypač patogus pradiniuose populiacijų tyrimuose, kai apie tiriamąjį objektą turima nedaug genetinės informacijos. Pradžioje šis metodas buvo taikomas veislėms tirti, tačiau pastaraisiais metais vis plačiau naudojamas natūralioms augalų populiacijoms tirti.

Turint atitinkamus duomenis, galima įvertinti pagrindinius populiacijų genetinius rodiklius:

- DNR polimorfizmo lygį (P);
- alelių įvairovę – alelių skaičių lokusui;
- Nėjaus (Nei) genų įvairovę;
- Šenono (Shannon'o) įvairovės indeksą.

Nybom ir Bartish (2000) apžvalginiam darbe apie RAPD metodo taikymą augalų populiacijoms tirti apibendrina 108–ių mokslinių darbų rezultatus ir, atsižvelgdami į augalų gyvenimo formų, taksonomijos ir geografinio paplitimo įtaką įvairių rūšių augalų genetinės įvairovės rodikliams, nustatė tam tikrus dėsningumus:

1) populiacijų viduje:

- plikasėklių augalų populiacijų genetinė variacija žymiai didesnė už gaubtasėklių. Manoma, kad taip yra dėl to, kad plikasėkliai augalai ilgaamžiai, kryžmadulkiai, apdulkinami vėjo, vėlai dera;
- gyvenimo forma neturi didelės įtakos vidupopuliacinei įvairovei, tačiau vienmečiai augalai pasižymi mažesne genetinė įvairove nei daugiamečiai;
- saavidulkiai augalai pasižymi mažesne genetinė įvairove, palyginti su kryžmadulkiais;

2) tarp populiacijų:

- genetinė diferenciacija tarp plikasėklių augalų populiacijų mažesnė nei tarp gaubtasėklių augalų populiacijų;
- skirtinga gyvenimo trukmė pasižymintys augalai gana žymiai skiriasi: vienmečių augalų populiacijų genetinė diferenciacija žymiai didesnė už trumpaamžių daugiamečių bei ilgaamžių daugiamečių augalų populiacijų;
- plataus geografinio paplitimo augalų populiacijos pasižymi didesne genetinė diferenciacija palyginus su endeminių augalų populiacijomis;
- saavidulkių augalų populiacijų genetinė diferenciacija didesnė nei kryžmadulkių;

- augalų populiacijos, kurių sėklas platina vėjas, vanduo ar gyvūnai, pasižymi mažesne genetinė diferenciacija, palyginus su augalais, kurių sėklos išplinta savaime;
- jaunos ir vidutinio amžiaus populiacijos pasižymi didesne genetinė diferenciacija nei senesnės.

Molekuliniai žymenys, kurie remiasi lėtai evoliucionuojančiomis DNR sekomis, tinkamesni analizuoti istorinius įvykius laiko atžvilgiu, o žymenys, kurie remiasi greitai evoliucionuojančiomis DNR sekomis – neseniai susikūrusioms populiacijoms tirti. Populiacijų tyrimams naudojami tiek dominuojantys žymenys (ISSR, AFLP, RAPD), tiek ir kodominuojantys (alozimai, mikrosatelitai). Lyginant įvairiais molekuliniiais žymenimis tirtų augalų populiacijų struktūrą, gaunami panašūs rezultatai. Populiacijų įvairovė, nustatyta alozimų ir RAPD metodais, dažnai koreliuoja, nors skaitinės reikšmės, gautos RAPD metodu, paprastai yra didesnės (Virk ir kt., 2000). Kai kuriuose darbuose reikšmės, gautos RAPD metodu, yra mažesnės (Jenczewski ir kt., 1999). Teigiama koreliacija tarp geografinių atstumų ir RAPD metodu gautų genetinių atstumų dažnai nustatoma kryžmadulkiams augalams (Ayres, Ryan, 1997; Gabrielsen ir kt., 1997; Bartish ir kt., 1999), o savidulkiams – tokios koreliacijos negaunama (Tollefsrud ir kt., 1998, Fahima ir kt., 1999).

Genetinė įvairovė labiausiai atspindi populiacijų ekologinę ir geografinę adaptaciją. Dauguma gamtinių populiacijų yra regioninės ir pasižymi skirtingais morfologiniais požymiais. Šiuos skirtumus dažnai lemia geografiniai barjerai, dideli atstumai tarp atskirų subpopuliacijų. Mažas populiacijas dažniau pažeidžia inbred–depresija, kuri sumažina jose genetinės įvairovės ir heterozigotiškumo lygį. Pasitaiko populiacijų, kuriose augalų fenotipinės savybės yra ekologiškai vertingos, jos puikiai atspindi genotipų įvairovę ir parodo vietinę populiacijos diferenciaciją. Tačiau visada reikia prisiminti, kad augalams būdingas fenotipinis plastiškumas ir kartais reikalingi papildomi tyrimai, kurie patvirtina populiacijos unikalumą arba jį paneigia (Pons ir kt., 1998). Kai kuriose augalų rūšyse morfologinės variacijos beveik

nebūna arba ji pasireiškia vėlyvose augalo raidos stadijose, pavyzdžiui augalui žydint ar mezgant vaisius.

Naudojant 44 morfologinius ir 36 molekulinis (RAPD) žymenis, buvo tirtos 37 oktaploidinių virgininių braškių (*Fragaria virginiana*) ir *Fragaria chiliensis* populiacijos Šiaurės Amerikoje. Pagal morfologinius žymenis buvo išskirtos penkios grupės, pagal molekulinis – trys. Morfologinė diferenciacija buvo artimai susijusi su skirtingomis klimato sąlygomis. RAPD metodu nustatyta, kad Vakarinės ir Rytinės pakrantės žemuogių populiacijos skiriasi, tačiau tarp jų vyksta genų srautas, įrodyta bendra tyrinėtų taksonų kilmė (Harrison ir kt., 1997).

2.2.2. Dauginimosi būdo įtaka populiacijų genetinei įvairovei

Augalų dauginimosi būdas turi didelės įtakos populiacijų struktūrai ir genetinei įvairovei. Kadangi dauguma augalų yra sėslūs, jų žiedadulkės ir sėklos neplinta be galo toli, todėl jų populiacijos turėtų būti apibrėžtos, pasižymėti tam tikra, tai populiacijai savita, genetinė struktūra.

Vegetatyvinis dauginimasis yra gana paplitęs augalų pasaulyje. Vegetatyviškai besidauginančių augalų populiacijose labai svarbu nustatyti atskirus individus, nes tokiu būdu besidauginantys augalai produkuoja genetiškai identiškus individus, kurie gali pasklisti nuo motininio augalo dideliais atstumais, formuodami genetiškai vientisą populiaciją. Populiacijų genetinė struktūra ir dinamikai taip pat labai svarbus jas sudarančių individų amžius, dydis ir kiekis. Individų dydis dažnai lemia nevienodą jų dauginimosi potencialą – didesnis individas paprastai palieka daugiau palikuonių. Ilgai gyvenantys individai taip pat gali palikti neproporcingai didelį palikuonių skaičių, palyginus su kitais, trumpiau gyvenančiais, tos pačios populiacijos individais. Augalo dydis ir amžius dažnai koreliuoja. Naudojant modernius molekulinis metodus, galima nustatyti ir augalą – populiacijos pradininką (Ayres, Ryan, 1997).

RAPD metodu galima atskirti pavienius individus, nustatyti svarbiausias populiacijos charakteristikas, palyginti subpopuliacijas tarpusavyje, todėl jis plačiai naudojamas vegetatyviškai besidauginančių augalų populiacijoms tirti. Atsiranda vis daugiau darbų, kuriuose nagrinėjamas toks genetiškai vientisas „milžiniškas“ organizmas.

Reto augalo *Wyethia reticulata* populiacijose dominuoja keli individai. Šiam augalui būdinga tai, kad jo žydėjimą skatina gaisrai, sėklos nenutolsta toliau kaip 1,5 metro nuo motininio augalo. Šie augalai intensyviai dauginasi požeminiais šakniastiebiais, kurie taip pat pakenčia gaisrą. *W. reticulata* populiacijos buvo tiriamos alozimų ir RAPD metodais. Rezultatai, gauti abiem metodais, koreliavo, tačiau alozimai parodė didesnę geografinę ryšį tarp populiacijų nei su RAPD (Ayres, Ryan, 1997).

Daugelis augalų rūšių, augančių atšiauriomis sąlygomis, taip pat pasižymi gerai išsivysčiusiu vegetatyviniu dauginimusi. Šių rūšių augalai plinta šakniastiebiais, svogūnais, atlankomis, atžalomis. Tokie kloniniai augalai užkariauja didelius plotus ir sėkmingai įsitvirtina aplinkoje. Kloniniai augalai dažniausiai nesidaugina sėklomis, todėl jų populiacijos turėtų pasižymėti žymiai mažesne genetinė įvairove. Vis dėlto yra duomenų, kad šių populiacijų genetinė įvairovė yra pakankamai didelė. Tai gali būti dėl somatinių mutacijų, dėl savaiminių sėjinukų ar skirtingų pradininkų, kurie davė pradžią tai populiacijai. Šiuo metu nustatyti tokie identiškų augalų klonai, kurių amžius yra keli tūkstantmečiai (uolabruknė *Gaylussacia brachycerinum*, smulkiadantė tuopa (*Populus tremuloides*)) (Persson, Gustavsson, 2001). Atšiauriomis sąlygomis paplitusi pasviroji uolaskėlė (*Saxifraga cernua*), manoma, taip pat sudaro monoklonines populiacijas, kurios užima didelius plotus. Tokia prielaida padaryta žinant, kad šie augalai dauginasi svogūnėliais ir beveik visai nesubrandina sėklų. Mokslininkai, ištyrę keturias šios uolaskėlės populiacijas RAPD ir AFLP metodais, padarė išvadas, kad netgi reti įvykiai, kai šis augalas pasidaugina sėklomis, populiacijai yra labai reikšmingi, nes padeda išlaikyti genetinę įvairovę. Buvo nustatyta didelė genetinė diferenciacija tarp šių populiacijų. Tai rodo, kad populiacijų pradininkai buvo

genetiškai skirtingi augalai. Rezultatai, gauti abiem metodais, koreliavo tarpusavyje. Koreliacija buvo stebima tiek identifikuojant augalų klonus bei jų tarpusavio ryšius, tiek nustatant genetinės įvairovės lygį (Gabrielsen, Brochmann, 1998; Kjølnner ir kt., 2004). Persson ir Gustavsson (2001) RAPD metodu tyrė bruknės (*Vaccinium vitis-idaea*), kuri dauginasi klonais, populiacijos genetinę struktūrą. Kartu buvo atliekama ir bruknių lapų morfometrinių analizė. RAPD metodas tiko genetiškai identiškiems individams tirtoje populiacijoje identifikuoti: panaudojus 6 pradmenis, gautos 43 polimorfinės DNR juostos, kurios leido atskirti 29 skirtingus genotipus tarp 129-ių tirtų individų. Pastebėta koreliacija tarp morfometrinių duomenų ir molekulinė žymenų (Persson, Gustavsson, 2001). Ištyrus RAPD metodu *Vaccinium stamineum* populiacijos 99 individus, kurie taip pat linke daugintis klonais, buvo nustatyti 67 RAPD profiliai, iš kurių net 51 buvo būdingas pavieniams augalams, kurie, matyt, atsirado iš skirtingų sėklų (Kreher ir kt., 2000).

Tiriant bugienio *Ilex leucoclada* subpopuliacijas Japonijoje, nustatyta gana didelė šio augalo klonų įvairovė. Manoma, kad tokiai įvairovei įtakos galėjo turėti nors ir retas, bet kartais pasitaikantis, sėjinukų išplitimas. Kitas paaiškinimas – populiacijos pradininkai galėjo būti keli augalai, kurie skyrėsi genetiškai tarpusavyje (Torimaru ir kt., 2003). Panašūs rezultatai buvo gauti tiriant fragmentuotą keturlapės vilkauogės (*Paris quadrifolia*) populiaciją (Jogaitė ir kt., 2005).

Augalų plitimas klonais gali turėti ir lemtingų populiacijai pasekmių, nes praradus genetinę įvairovę populiacijos viduje, sumažėja efektyvus populiacijos dydis, kloniniuose augaluose greičiau plinta ligos, kurios gali pažeisti daug populiacijų individų. Dėl to populiacijų atsinaujinimas sėjinukais yra labai pageidaujamas įvykis (Pluess, Stöcklin, 2004).

2.2.3. Erdvinės izoliacijos ir gamtinių barjerų įtaka populiacijų genetinei įvairovei

Natūrali aplinka, kurioje auga augalai, retai kada būna vienalytė dideliame plote. Dažniausiai augavietės yra labai suskaidytos. Tai lemia nelygus reljefas ir kiti pasitaikantys gamtiniai barjerai. Augaviečių susiskaidymas ir vis didėjanti izoliacija tarp atskirų subpopuliacijų yra svarbi priežastis, dėl kurios gali atsirasti genetinė diferenciacija tarp jų ir kuri gali sąlygoti genetinės įvairovės sumažėjimą populiacijų viduje. Genetinę diferenciaciją lemia tai, kad tarp atskirų subpopuliacijų nebevyksta genų mainai (atsiranda barjerai sėkloms ir žiedadulkėms išplisti). Be to, tai, kas vienoms augalų rūšims ir populiacijoms yra natūrali aplinka, kitoms gali būti gamtinis barjeras (Pluess, Stöcklin, 2004).

Kalnuose augantys augalai yra puikus pavyzdys, kaip populiacijos, išnaudodamos įvairias augavietes, fragmentuojasi veikiamos gamtinių barjerų. Alpinės augalų rūšys dažniausiai išikuria vietovėse, kur subpopuliacijos yra atskirtos. Buvo tirta Šveicarijos Alpių žiogmagė (*Geum reptans*) genetinė įvairovė. Šis augalas pasižymi ir vegetatyviniu dauginimusi, kuris kalnų vietovėse labai naudingas. Darbo pradžioje buvo tikimasi, kad fragmentuotos žiogmagės populiacijos skirsis genetiškai ir, kad populiacijos, esančios vidutiniuose aukščiuose, pasižymės didesne genetinė įvairove, nei žemiau ir aukščiau augantys augalai. Autoriai įvertino ir žiogmagės klonų plitimo diametrą, todėl augalus rinko taip, kad jie nebūtų genetiškai vienodi (atstumas tarp jų buvo apie 4 m). Nustatyta gana didelė genotipų įvairovė. Nepaisant natūralios fragmentacijos ir riboto genų srauto, skirtingų subpopuliacijų diferenciacija nebuvo labai didelė – tik 14%, o genų srautas vyko priklausomai nuo atstumo tarp augalų (Pluess, Stöcklin, 2004).

RAPD metodu tiriant Šiaurės Alpeose skirtinguose aukščiuose augančias raktažolės pelenėlės (*Primula farinosa*) populiacijas, rasta diferenciacija tarp populiacijų, augusių aukštesnėse ir žemesnėse vietose (Reisch ir kt., 2005). Manoma, kad tai gali būti susiję su skirtingu augalų žydėjimo laiku, kuris

riboja genų srautą. Aukščiau įsikūrusiose populiacijos pasižymėjo didesne genetinė įvairove, buvo aptikta koreliacija tarp altitudžių ir genetinių atstumų.

Jordano ir Godoy (2000) tyrė kvapiosios kryklės (*Prunus mahaleb*) populiacijas, kurios Ispanijoje yra negausios, sudarytos iš pavienių individų, o kalnuose dar ir fragmentuotos dėl praslinkusių ledynų poveikio. Šių augalų vaisiais minta įvairūs gyvūnai, kurie, įveikdami gamtinius barjerus, išnešioja sėklas dideliais atstumais, todėl tarp populiacijų buvo aptikta palyginti nedidelė diferenciacija – 16,5%.

Tiriant ilgažiedės lelijos *Lilium longiflorum* genetinę diferenciaciją Taivanyje RAPD metodu, nustatyta genetinių atstumų priklausomybė nuo geografinių atstumų penkiose tirtose populiacijose. Nors populiacijų augalai skyrėsi morfologiškai tarpusavyje, negauta morfologinių požymių koreliacijos su geografiniais atstumais (Wen, Hsiao, 1999).

3. Molekulinių žymenų taikymas adaptyvumui tirti

Adaptacija – tai organizmų prisitaikymas prie tam tikrų aplinkos sąlygų, įgyjant naujus, tomis sąlygomis vertingus, požymius. Adaptacijų genetika sudėtinga, genetinei adaptyvumo teorijai sukurti dar trūksta eksperimentinių duomenų. Tiriant konkretaus požymio prisitaikymo atvejį, pirmiausia stebimas fenotipas, palaipsniui gilinantis į genus. Ateityje, kai bus nustatyta daugiau įvairių organizmų genomų sekų, bus lengviau susieti fenotipinius požymius su konkrečiais genais. Vienu autorių nuomone, adaptaciją lemia pavieniai genai, kitų – sukibusių genų grupės. Norint suprasti ir įvertinti pavienio požymio svarbą prisitaikymui, vis dažniau remiamasi ir molekuliniiais žymenimis. Augalai pasižymi didele morfologine ir funkcinė įvairove, kuri dažniausiai yra adaptyvi. Fenotipiniai požymiai dažnai varijuoja natūraliose augalų populiacijose. Kartais tam tikrų požymių įvairovės skirtingose populiacijose ekologinė prasmė labai aiški ir tiesiogiai susijusi su konkrečiomis aplinkos sąlygomis ar geografine padėtimi. Tiriant trikertės žvaginės (*Capsella bursa-pastoris*) fenotipinę įvairovę Kalifornijoje, išskirti ekotipai pagal žydėjimo

laiką. Nustatyta, kad augalai, augantys kalnuotose vietovėse, žydi vėliau negu žemumose. Šiame darbe buvo nustatyti žydėjimo laiką kontroliuojantys kiekybinių požymių lokusai QTL (angl. *Quantitative Trait Loci*) (Linde ir kt., 2001). Panašūs rezultatai buvo gauti su morfologiškai skirtingomis ilgaziedžių lelijų (*Lilium longiflorum*) populiacijomis, kuriose genetinė diferenciacija susijusi su geografine izoliacija (Wen ir kt., 1999).

3.1. RAPD metodo taikymas augalų adaptyvumui tirti

Nepaisant to, kad dauguma DNR mutacijų yra fenotipiškai neutralios ir jų pagrindu sukurti RAPD žymenys taip pat laikomi neutraliais, dalį tokių DNR polimorfinių lokusų neabejotinai veikia atranka. Tą parodė daugelio mokslininkų tyrimai. Kinijos mokslininkai RAPD metodu tyrė labai plačiai Centrinės Azijos stepėse paplitusios ašuočių *Stipa krylovii* genetinę įvairovę ir populiacijų struktūrą (Zhao ir kt., 2006). Tirtų populiacijų augavietės pasižymėjo skirtingomis klimato sąlygomis – metiniu kritulių kiekiu ir temperatūra. Gauti rezultatai parodė, kad genetinė įvairovė populiacijose didėjo, mažėjant metiniam kritulių kiekiui ir kylant temperatūrai, todėl augalai, augantys stresinėmis sąlygomis, pasižymėjo didesne genetinė įvairove.

Ypač daug dėmesio nekoduojančios genomo dalies vaidmeniui rūšies prisitaikymui prie aplinkos sąlygų skyrė Izraelio mokslininkai iš Haifos universiteto Evoliucijos instituto (Nevo, 2001). Jie tyrė adaptacijų atsiradimą įvairiose augalų (kviečio *Triticum dicoccoides*, miežio *Hordeum spontaneum*) ir kitų organizmų (cianobakterijų, grybų, vaisinės muselės, graužikų) rūšyse. Tirdami *T. dicoccoides* ir *H. spontaneum* populiacijas skirtingose ekologinėse nišose trimis žymenų metodais (RAPD, SSR ir alozimų), jie nustatė neatsitiktinį genetinės įvairovės pasiskirstymą augaluose iš skirtingų ekologinių nišų. Visais šiais atvejais buvo nustatyti nišai specifiški bei unikalūs RAPD, SSR ir alozimų aleliai. Didesnė genetinė įvairovė šiais metodais nustatyta sausros sukeliama stresą patiriančiose *T. dicoccoides* ir *H. spontaneum* populiacijose.

Kad DNR yra būtina sąlyga adaptacijai atsirasti, rodo kviečių *T. dicoccoides* populiacijų Izraelyje ir Turkijoje tyrimai. Šios populiacijos buvo iš geografiškai nutolusių regionų, kurie skyrėsi dirvožemio savybėmis ir klimato sąlygomis. Padaryta išvada, kad RAPD polimorfizmas dalinai adaptyvus ir populiacijų savitumą apsprendžia specifinės augaviečių bei klimato sąlygos (Fahima ir kt., 1999).

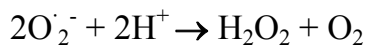
Tačiau didesnė dalis autorių laikosi nuomonės, kad molekuliniai žymenys, kurių lokusai yra nekoduojančiose DNR sekose, yra neutralūs fenotipo atžvilgiu. Tokių žymenų neveikia atranka, todėl jie neturi adaptacinės reikšmės. Pavyzdžiui, tiriant laukinius miežius (*H. spontaneum*) iš keturių skirtingų specifinių augaviečių RAPD metodu, buvo nustatyta, kad genetiniai atstumai nepriklauso nuo aplinkos sąlygų: RAPD žymenys neparodė jokio dėsningo pasiskirstymo populiacijose (Volis ir kt., 2001). Vėliau šie autoriai, dirbdami su ta pačia miežių rūšimi, palygino genetinę diferenciaciją, nustatytą su kiekybiniais požymiais ir molekuliniiais žymenimis (RAPD ir alozimis). Buvo nustatyta, kad kiekybiniai požymiai žymiai geriau atspindi regioninę pasiskirstymą nei molekuliniai žymenys, nors kai kurie RAPD ir alozimų žymenys rodė nedidelę variaciją (Volis ir kt., 2005).

3.2. Abiotinių veiksnių poveikis superoksido dismutazės (SOD) polimorfizmui

Tiek biotinis (pvz. įvairūs patogenai), tiek abiotinis stresas, kurį sukelia sausra, šaltis, sunkieji metalai, padidėjęs dirvožemio rūgštumas, oro tarša, šiluminis šokas ir t.t., gali indukuoti laisvųjų deguonies radikalų susidarymą (Bowler ir kt., 1992). Aktyvusis deguonis (superoksido, H_2O_2 ar hidroksilo radikalo ir kt. formoje) susidaro ląstelėje kaip normalaus metabolizmo (fotosintezės, kvėpavimo ir kt.) produktas. Kai kurios aktyvaus deguonies formos funkcionuoja kaip labai svarbios signalinės molekulės, kurios keičia genų ekspresiją ir kai kurių specifinių apsauginių baltymų aktyvumą. Normaliomis augalo augimo sąlygomis reaktyvių deguonies radikalų ląstelėse

susidaro santykinai mažai (pvz., chloroplastuose pastoviai yra $240\mu\text{M s}^{-1} \text{O}_2^-$ ir apie $0,5 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$), tačiau, kai suardoma ląstelių homeostazė, reaktyvių deguonies radikalų kiekis labai padidėja ($240\text{--}720 \mu\text{M s}^{-1} \text{O}_2^-$ ir $5\text{--}15 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$) (Mittler, 2002).

Aktyvių deguonies radikalų kiekio padidėjimas – signalas apie stresą, kuris gali sukelti membranų lipidų peroksidaciją, baltymų oksidaciją, fermentų inhibiciją (Fucci ir kt., 1983), DNR (Brawn, Fridovich, 1981) ir RNR pažaidas, ir netgi ląstelių žūtį. Ląsteleje yra du pagrindiniai (nefermentinis ir fermentinis) mechanizmai, padedantys išlaikyti šių radikalų susidarymo ir pašalinimo balansą. Vienas iš svarbiausių antioksidacinių fermentų yra superoksido dismutazė (SOD, EC 1.15.1.1.). Jis katalizuoja laisvo deguonies radikalo (O_2^-) dismutaciją (Scandalios, 1993):



SOD generuoja H_2O_2 susidarymą, o kooperatyviai ląstelėje funkcionuojančios katalazė ir peroksidazė galutinai redukuoja laisvuosius deguonies radikalus iki vandens. Šis fermentas apsaugo ląstelę nuo deguonies radikalų, kurie gali sąveikauti su ląstelių membranų lipidų neprisotintomis riebiųjų rūgščių liekanomis ir keisti membranų pralaidumą. Augalų ląstelės nuo kitų skiriasi tuo, kad jose yra aptinkamos visos trys SOD formos: CuZnSOD, MnSOD ir FeSOD (Бараненко, 2006). Augalų superoksido dismutazei būdinga tai, kad visos jos formos turi daug izoformų. Pavyzdžiui, kukurūzų lapų citoplazmoje aptikti 4 CuZnSOD izofermentai, chloroplastuose – 1 CuZnSOD ir 4 MnSOD – mitochondrijose (Zhu, Scandalios, 1994). Esant nepalankioms sąlygoms, padaugėja aktyvių deguonies formų susidarymas, dėl to įvairiai keičiasi SOD aktyvumas: vienais atvejais stebimas jo padidėjimas, kitais – sumažėjimas. Tai priklauso nuo stresą sukeliančio veiksnio intensyvumo ir veikimo laiko, nuo augalo jautrumo, vystymosi stadijos, pavyzdžiui, fermento aktyvumas padidėja esant sausrui ar per didelei drėgmei (Pukacki, Kamińska–Rożek, 2004), esant šiluminiam ar šalčio šokui (Kang, Saltveit, 2001), ar sunkiųjų metalų pertekliui (Kleizaitė ir kt., 2004). Tiriant

SOD izofermentinio spektro priklausomybę nuo augalo augimo aukščio virš jūros lygio nustatyta, kad didėjant aukščiui plačialapio gysločio (*Plantago major*) šaknyse inhibuojamos SOD izoformos ir sumažėja fermento aktyvumas (Ren ir kt., 1999). Dėl rūgštaus lietaus didėjant rūgščių dirvų plotams vis didesnis dėmesys kreipiamas mechanizmams, kurie padeda augalams išvengti oksidacinio streso esant dirvožemio pH<5,5. Pagal SOD aktyvumo ir polimorfizmo pokyčius galima spręsti apie augalų tolerantiškumą rūgščioms dirvoms (Vitarello ir kt., 2005). Literatūros duomenys rodo, kad yra tamprus ryšys tarp augalo atsparumo vienam ar kitam aplinkos poveikiui ir apsauginės sistemos komponentų, tarp jų ir SOD, aktyvumo (Бараненко, 2006).

4. Paprastoji avietė – modelinis Rosaceae šeimos augalų molekulinės genetikos organizmas

Paprastoji avietė (*Rubus idaeus* L.) priklauso Rosaceae šeimai, *Rubus* genčiai. Šiai genčiai priklauso daug ekonomiškai svarbių augalų. Nemažai jų (avietės, gervuogės, katuogės, tekšės, šiaurinės avietės bei jų hibridai) domestikuotos ir pasaulyje plačiai auginamos pramoniniu būdu. Literatūros šaltiniai nurodo, kad paprastoji avietė kilo iš Turkijoje esančio Idos kalno vietovės, iš čia kilo ir augalo lotyniškas rūšies pavadinimas (Ercisli, 2004). *Rubus* genties taksonomija yra gana problematiška, nes jos atstovai gali kryžmintis tarpusavyje, kai kuriems būdinga poliploidija ir agamospermija. Šiai genčiai priklauso apie 750 rūšių, kurios paplitusios visuose žemynuose, išskyrus Antarktidą. Šios taksonominės grupės augalai morfologiškai labai skiriasi: vieni jų sumedėję, statūs, kiti – pusiau sumedėję, besidriekiantys, tarp jų yra ir vijoklinių, stipriai redukuotais lapalakščiais augalų (Alice, Campbell, 1999).

Paprastoji avietė yra puikus modelinis augalas, atstovaujantis Rosaceae šeimai, nes:

- 1) viena iš geriausiai genetiškai ištirtų šios šeimos atstovų;
- 2) diploidinė rūšis ($2n=2x=14$);

- 3) jos genomas palyginti nedidelis (275 Mb);
- 4) plačiai paplitusi pasaulyje;
- 5) pasižymi laukinių formų įvairove ir plačiomis prisitaikymo prie aplinkos savybėmis.

Laukinė avietė, kaip vertingas augalas, Europoje buvo domestikuota dar IV–ajame amžiuje (Roach, 1987). Norėdami pagerinti jos maistines savybes, žmonės augino vertingesnius laukinių formų klonus (Jennings, 1988). Paprastosios avietės veislių kūrimo istorija nėra ilga – šiek tiek daugiau kaip 100 metų. Pagrindiniai aviečių kultivavimo regionai yra Šiaurės ir Centrinė Europa (Rusija, Lenkija, Vengrija, Serbija, Vokietija, Didžioji Britanija), Šiaurės Amerikos Ramiojo vandenyno pakrantės valstijos. Aviečių pramoniniu auginimu domisi ir Pietų Europos valstybės: Ispanija, Italija, Graikija, Portugalija (Ramdane, 2005). Metinė aviečių vaisių produkcija pasaulyje yra apie 400000 t (www.fruit.cornell.edu).

Aviečių, kaip ir kitų ūkiškai svarbių kultūrų, veislėms tirti plačiai naudojami biocheminių ir molekulinų žymenų metodai – alozimai, RAPD, AFLP, SSR, RFLP. Molekuliniai žymenys plačiai taikomi aviečių tyrimams: genotipavimui, genolapių sudarymui, molekulinei selekcijai (Atila, Aġaoġlu, 2006).

Genetinės medžiagos (*R. idaeus* veislių, *R. idaeus* × *R. neglectus* ir *R. occidentalis* hibridų) identiškumo patikrinimui buvo naudojami alozimai: izocitrato dehidrogenazė, malato dehidrogenazė, fosfogliukoizomerazė, fosfoglukomutazė ir triozės fosfato izomerazė (Cousineau, Donnelly, 1992). Toks patikrinimas, neidentifikavo visų pavyzdžių, tačiau buvo svarbus kolekcijos genetinei medžiagai įvertinti.

Kadangi paprastoji avietė yra populiarus vaisinis ir vaistinis augalas, jos vertingų savybių genetinės determinacijos išsiaiškinimas duotų ūkinės naudos. Avietės yra dvimečiai augalai, jų vaisiai paprastai pasirodo tik antraisiais metais, todėl, norint paspartinti modernių veislių kūrimą ir pritaikymą vietinėms sąlygoms, labai naudinga turėti genolapį, kuris padėtų lokalizuoti genus, lemiančius kompleksinį fenotipą. Genolapis padeda nustatyti

poligeninių požymių diagnostinius žymenis. Pirmasis paprastosios avietės genolapis buvo sukurtas, išanalizavus molekulinį žymenų pasiskirstymą palikuonyse, gautuose sukryžminus dvi fenotipiškai skirtingas aviečių veisles: palyginti neseniai išvestą europietišką veislę 'Glen Moy' ir seną, iš Šiaurės Amerikos kilusią veislę 'Latham' (Graham ir kt., 1997; Graham ir kt., 2004). Buvo kreipiamas dėmesys į šiuos komerciškai svarbius požymius: vaisių prinokimą, tekstūrą, skonį ir aromatą, atsparumą kenkėjams ir ligoms, krūmo išvaizdą (architektūrą). Genolapiui sukurti buvo panaudoti AFLP, SSR ir EST–SSR molekuliniai žymenys (pradmenys, tinkami SSR analizei buvo atrinkti eksperimente, kuriame tirta ne tik paprastoji avietė, bet ir keletas kitų *Rubus* genties rūšių) (Graham ir kt., 2002). Aviečių veislei 'Latham' (auginamai nuo 1930 metų) būdingi šie požymiai: atsparumas šaknų puviniai ir įvairioms stiebų ligoms, ištvermingumas nepalankiomis sąlygomis, labai spygliuoti rudi stiebai, nedideli vaisiai. Europietiškos veislės 'Glen Moy' (išvestos 1981 metais) avietėms, priešingai, būdinga didelės, skanios ir išvaizdžios uogos, bespygliai žali stiebai, didelis jautrumas žemoms temperatūroms, jautrumas ligoms ir kenkėjams. Buvo ištirti tėvai (pradinės veislės) ir 94 palikuonys. Identifikuoti 66 SSR ir 8 EST–SSR žymenys. AFLP metodu buvo patikrinta 17 *PstI/MseI* ir 14 *EcoRI/MseI* pradmenų, su kuriais buvo gauti 358 produktai. Taigi, kuriant genolapį iš viso buvo nustatyti 432 lokusai, vėlesniame etape dalis jų atmesta ir likę 273 lokusai sudarė 9 sukibimo grupes. Šie rezultatai parodė ir tai, kad aviečių stiebo dygliuotumas susijęs su stiebo spalva (dygliuoti stiebai yra rudi, nedygliuoti – žali). Taip pat buvo įvertintas abiejų veislių heterozigotiškumas: senesnės veislės 'Latham' heterozigotiškumas buvo dukart didesnis už 'Glen Moy'. Taigi, domestikacija sumažino aviečių morfologinę ir genetinę įvairovę, nes šiuolaikinės veislės yra genetiškai panašios, o kuriant naujas veisles, atrankai naudojami tik keli, ūkiškai vertingi požymiai (Graham, McNicol, 1995, Graham ir kt., 2004).

Papildytas paprastosios avietės genolapis buvo paskelbtas 2006 metais, kai buvo nustatyta daug naujų lokusų ir išsiaiškinta, kad atsparumas tam tikroms ligoms yra susijęs su kai kuriais morfologiniais požymiais (pvz., stiebo

plaukuotumu). Aviečių veislės, kurių stiebams būdingi ploni plaukeliai (nedygliai), atsparios stiebų pilkajam kekerui (*Botrytis cinerea*), avietiniam dvyngrypiui (*Dydimella applanata*), kuris sukelia žievėplaišą, tačiau mažiau atsparios avietiniam svylagrybiui (*Elsinoe veneta*), kuris sukelia degulius, miltligei (*Sphaerotheca macularis*) ir aviečių rūdimis (*Phragmidium rubi-idaei*). Naujasis genolapis padidėjo iki 669 cM. Taip pat buvo nustatyta geno *H*, lemiančio stiebo plaukuotumą, vieta genolapyje antroje sukibimo grupėje. Žymenys, kurie sąlygoja atsparumą pilkajam kekerui ir avietiniam dvyngrypiui, taip pat buvo toje pačioje sukibimo grupėje (Graham ir kt., 2006).

Kultūrinių aviečių plantacijos paprastai būna genetiškai homogeniškos, nes augalai padauginami vegetatyviškai. Jau seniai domimasi paprastosios avietės gamtinėmis populiacijomis, jų heterogeniškumu ir plastiškumu. Natūraliomis sąlygomis augantys augalai pasižymi atsparumu nepalankioms sąlygoms, todėl gali būti naudojami paprastosios avietės ūkinių savybių gerinimui ir kaip vertingų savybių donorai (Ryabova, 2007).

Škotų mokslininkė Jennings tyrė vietines aviečių populiacijas, augančias skirtingomis sąlygomis: vienos jų augo slėniuose, o kitos – aukštumose (Jennings, 1964). Buvo stebimi šie augalų morfologiniai ir fenologiniai požymiai: stiebų aukštis ir jo bamblių skaičius, pumpurų sprogo, pažaliavimo, žiedų atsidarymo ir vaisių nokimo pradžia, pažastinių pumpurų skaičius ant stiebų, sėklų dygimo greitis, stiebų plaukuotumas ir dygliuotumas. Tik dvi tirtos morfologinės ypatybės (pumpurų sprogo pradžios laikas ir stiebų aukštis) koreliavo su aviečių pradinų augaviečių altitudėmis. Taip pat buvo nustatyta, kad gamtoje egzistuoja gana didelis genų alelių (*H* ir *h*), lemiančių stiebų plaukuotumą, polimorfizmas. Ištyrus 78 pavyzdžius, rasti du individai, vedantys geltonus vaisius (požymį lemia genas *t*), du – vien tik vyriški augalai (genas *f*), du individai, kurių žiedai buvo sudaryti vien iš taurėlapių (sepaloidai, genas *d*); nerasta aviečių plikais, nedygliuotais stiebais (genas *s*) ir neturinčių vaškinio apnašo (genas *b*). Jennings pažymėjo, kad paprastoji avietė yra fiziologiškai plastiškas augalas ir pasižymi tokiomis reprodukcinėmis savybėmis, kaip išėstas žydėjimo

periodas, intensyvus vegetatyvinis dauginimasis, ilgas sėklų dygimo laikas (3–4 mėnesiai).

Dar 1995 m. Graham ir McNicol pradėjo *Rubus* genties tyrimus RAPD metodu. Buvo tirta trylikos *Rubus* genčių atstovų panašumas. Gauti tyrimo rezultatai patvirtino anksčiau nusistovėjusią šios genties klasifikaciją. Vėlesniuose darbuose škotų mokslininkai tyrinėjo, ar natūraliai augančių aviečių populiacijų augalai nesąveikauja su plantacijose auginamomis kultūrinėmis avietėmis (Graham ir kt., 1997). Tayside regione (Škotija) kultūrinės avietės užima didelius plotus, o tarp auginamų avietynų pasitaiko ir laukinių aviečių populiacijų. Avietės (pagrindinė veislė 'Glen Clova') avietynuose dauginamos vegetatyviškai, todėl jos auginamos kaip monokultūra. Šešių pradmenų pagalba buvo išaiškinti 62 polimorfiniai šių aviečių RAPD lokusai. Veislėje 'Glen Clova' buvo nustatytas 21 polimorfinis DNR fragmentas, iš kurių tik vienas buvo unikalus, o likę 20 buvo aptinkami ir aplink kultivuojamus avietynus išsibarsčiusiose aviečių populiacijose. Laukinėse avietėse buvo aptikti 42 žymenys, nebūdingi kultūrinei avietei. Principinių koordinacių metodu (PCO) nubraižytame grafike ši veislė buvo centre tarp keturių tirtų paprastosios avietės populiacijų. Šiame darbe buvo tiriamas ir augalų panašumas pačiose populiacijose priklausomai nuo atstumo tarp augalų. Pastebėta, kad tose populiacijose, iš kurių pavyzdžiai buvo renkami mažesniais nei 2 metrų atstumais, genetinis panašumas buvo 80–100%; esant 20 m atstumui – 60–100%, o esant 20 km – 40–70%. Autoriai neneigia, kad panaudojus didesnę pradmenų skaičių, būtų rasti didesni skirtumai tarp artimai augančių augalų. Todėl negalima teigti, kad šie augalai yra pasidauginę vegetatyviniu būdu. Jeigu tirtieji augalai, pasižymėję identiškais DNR fragmentų spektrais, priklausytų tam pačiam klonui, tai būtų galima teigti, kad paprastoji avietė gali vegetatyviškai išplisti iki 20 metrų. Vis dėlto kiti autoriai nenustatė tokio didelio aviečių klonų išplitimo. Pavyzdžiui, ištyrę 24–ių vienos aviečių populiacijos augalų molekulinis RAPD fenotipus, švedų mokslininkai neaptiko tarp jų genetiškai identišku individų (Antonius, Nybom, 1994). Jau anksčiau buvo nustatytas $\leq 10\%$ skirtumas tarp motininio

augalo ir sėjinukų. Taigi ir šiuo atveju tirtos avietės gali būti sudygusios iš vieno motininio augalo sėklų (Graham ir kt., 1997).

Buvo tiriamas ir laukinių aviečių populiacijų fenotipinės įvairovės erdvinis pasiskirstymas (Marshall ir kt., 2001). Norėta išsiaiškinti, ar suskaidytos paprastosios avietės populiacijos yra prisitaikiusios prie vietinių sąlygų. Vėl buvo tiriamos laukinių aviečių populiacijos, išsidėsčiusios tarp kultūrinių aviečių plotų. Gamtoje surinkti pavyzdžiai buvo pasodinti vienodomis sąlygomis šiltnamyje ir atskirai natūraliomis sąlygomis, buvo apsaugoti nailono tinklu nuo kenkėjų, auginami be papildomo apšvietimo. Buvo tiriama aviečių morfologija (stiebų aukščiai, šakojimosi intensyvumas, stiebų skaičius, diametras, lapų plotas, dyglių tankis) ir fenologiniai skirtumai. Tyrimai parodė, kad avietės, kilusios iš šiaurinių rajonų ir didesnių altitudžių, išaugo žemesnės, tankesnės (išaugino daug primokanų – pirmamečių stiebų), pasižymėjo silpnesniu šakojimusi ir sukrovė mažiau žiedų, negu piečiau augančios avietės. Pastarosios išaugino žymiai mažiau stiebų, bet jie buvo aukštesni ir stambesni, o antraisiais metais ant jų sukrovė daugiau žiedų. Palyginus augalų, augintų šiltnamyje ir natūraliomis sąlygomis, fenotipinių požymių variaciją, pasirodė, kad žiedų skaičius, augalo aukštis, šakojimasis buvo didesni šiltnamyje, o primokanų skaičius – natūraliomis sąlygomis. Temperatūros skirtumai šiltnamyje ir lauke turėjo įtakos augalų aukščiui, šakojimuisi, žiedų skaičiui, tačiau į tai buvo atsižvelgta vertinant rezultatus. Buvo įrodyta, kad fenotipiniai skirtumai, aptikti tarp augalų, nulemti genetiškai. Tai paneigia Haskell (1960) teiginį, kad fenotipinius skirtumus galima aptikti tik tuomet, kai tiriami augalai auga didelėse teritorijose (didesnėse nei Didžioji Britanija), ir patvirtina Jennings (1964) prielaidą, kad morfologiniai požymiai varijuoja ir augaluose, augančiuose nedideliais atstumais vienas nuo kito, ir kad šie požymiai susiję su aplinkos gradientu. Vienas šio darbo (Marshall ir kt., 2001) tikslų buvo išsiaiškinti, kiek ir kokie morfologiniai požymiai yra patikimi, sprendžiant apie jų variavimą tarp skirtingų augaviečių augalų. Tai, kad gamtinėse populiacijose rasta bespyglių aviečių, nėra vertintinas požymis, nes tai gali būti susiję su kultūrinių aviečių

„pabėgimu” į gamtines populiacijas. Taigi šiuo darbu atkreiptas dėmesys į tai, kad pasirenkant fenotipinį požymį stebėjimui, reikia dar įvertinti ir jo naudingumą augalui, augančiam natūralioje aplinkoje.

Graham ir kt. (2003) įvertino erdviškai nutolusių aviečių populiacijų genetinę įvairovę. Įvertinimui buvo panaudotas RAPD metodas bei RAPD–PGR produktų frakcionavimas poliakrilamido gelyje. Dėl šios modifikacijos buvo pasiektas dvigubai didesnis informatyvumas, nei dirbant su agarozės geliais. Nei ir Li metodu sudaryta genetinių atstumų dendrograma parodė, kad avietės veislė 'Glen Moy' sudarė atskirą grupę. Iš 179 žymenų, nustatytų populiacijose, tik 23 buvo sutinkami šioje veislėje. Be to, ji pasižymėjo ir unikaliomis RAPD juostomis. Populiacijos, kurios augo teritorijoje tarp kultūrinių aviečių laukų, pasirodė genetiškai artimesnės kultūrinėms avietėms nei labiau nuo jų nutolusios populiacijos. Stebint laukinių ir kultūrinių aviečių įvairius vegetacijos tarpsnius (lapų išsiskleidimą, žiedpumpurių formavimąsi, žiedų išsiskleidimą, vaisių nokimą), paaiškėjo, kad kultūrinėse avietėse tai įvyksta žymiai anksčiau, jų žydėjimo laikas nepersidengia su laukinių aviečių žydėjimu. Šio darbo rezultatai parodė, kad visos tirtos aviečių populiacijos ryškiai skyrėsi nuo 'Glen Moy' veislės. Gamtinių populiacijų skirtumus lėmė ir asinchroniškas žydėjimas. Netgi arti (1 km atstumu) nuo kultivuojamų avietynų esančios populiacijos pasižymėjo savitu žydėjimo laiku ir genetiškai skyrėsi.

Yra darbų, kuriuose VNTR metodu bandyta tirti paprastosios avietės populiacijas iš organinėmis medžiagomis užterštų dirvožemių ir lyginti jas su populiacijomis iš neužterštų dirvožemių (Keane ir kt., 1998). Šis augalas pasirinktas atsižvelgiant į jo gausų paplitimą įvairiose teritorijose. Patikimų skirtumų tarp užterštų ir neužterštų vietovių populiacijų heterozigotiškumo galbūt nebuvo dėl to, kad tarp populiacijų vyksta genų mainai. Tačiau populiacijose, augusiuose taršos zonoje, aptikta unikalių alelių, jose nustatyta ir mažesnė genetinė įvairovė.

Trečioje lentelėje apibendrintos pagrindinės publikacijos, kuriose pateikiami paprastosios avietės tyrimų morfologiniais ir molekuliniais žymenų metodais rezultatai.

3 lentelė. Pagrindiniai literatūros šaltiniai apie paprastosios avietės tyrimus morfologiniais ir molekuliniais žymenų metodais

Autorius, publikacijos metai	Naudoti metodai	Pagrindiniai tyrimo uždaviniai	Gauti rezultatai
Jennings, 1964	Morfologinių požymių tyrimas	Ekologiškai skirtingų avietės populiacijų tyrimai	1. Nustatyta stiebo aukščio priklausomybė nuo augavietės tipo 2. Rasta didelė morfologinių požymių įvairovė
Graham, McNicol, 1995	RAPD	<i>Rubus</i> g. atstovų genetinio panašumo tyrimas	1. Parodyta, kad RAPD metodas tinka genetiniam panašumui tirti
Graham ir kt., 1997	RAPD	Avietės populiacijų genetinės diferenciacijos nustatymas, laukinių ir kultūrinių aviečių palyginimas	1. Rasti skirtumai tarp laukinių ir kultūrinių aviečių 2. Nerasta koreliacijos tarp geografinių ir genetinių atstumų
Keane ir kt., 1998	VNTR	Aviečių populiacijų iš užterštų ir neužterštų teritorijų struktūros palyginimas	1. Rasta nežymi diferenciacija tarp užterštų ir neužterštų augaviečių aviečių 2. Užterštų teritorijų augalai pasižymėjo mažesne genetinė įvairove
Alice, Campbell, 1999	ITS sekų palyginimas	ITS sekų <i>Rubus</i> g. augaluose palyginimas	1. <i>Rubus</i> g. atstovų ITS1 ir ITS2 sekos ir GC kiekis panašus į kitų gaubtasėklių
Marshall ir kt., 2001	Morfologinių požymių tyrimas	Fenotipinių požymių gamtinėse aviečių populiacijose tyrimas	Aptikta fenotipinių požymių priklausomybė nuo augavietės Š→P kryptimi

3 lentelės tęsinys

Autorius, publikacijos metai	Naudoti metodai	Pagrindiniai tyrimo uždaviniai	Gauti rezultatai
Alice ir kt., 2001	Ribosomų DNR ITS sekoskaita	Morfologiškai nuspėjamų <i>R. caesius</i> ir <i>R. idaeus</i> hibridų ITS sekų tyrimas	1. <i>R. caesius</i> ir <i>R. idaeus</i> hibridai skyrėsi ploidiškumu 2. Įrodyti genų mainai tarp nutolusių rūšių 3. Nustatytas ITS sekų polimorfizmas
Graham ir kt., 2002	SSR	Mikrosatelitinių žymenų, tinkamų <i>Rubus</i> g. tyrimui, paieška	Atrinkta 10 mikrosatelitinių lokusų, tinkamų SSR analizei
Graham ir kt., 2003	RAPD, morfologinių ir fenologinių požymių tyrimas	Aviečių natūralių populiacijų genetinės įvairovės tyrimas, jos palyginimas su kultūrinių aviečių genetinė įvairove	1. Laukinių aviečių genetinė įvairovė buvo žymiai didesnė nei kultūrinių 2. Paprastoji avietė formuoja genetiškai skirtingas populiacijas, prisitaikiusias prie vietinių sąlygų
Graham ir kt., 2004	AFLP, SSR, EST–SSR	Genolapio kūrimas, sukryžminus dvi fenotipiškai skirtingas aviečių veisles, fenotipinių požymių ir molekulinį žymenų sąsajų nustatymas	1. Sudarytas pirmasis paprastosios avietės genolapis 2. Nustatyta aviečių stiebo dygliuotumo sąsaja su jo spalva 3. Senesnė veislė pasižymėjo didesniu heterozigotiškumu
Graham ir kt., 2006	SSR, fenotipinė analizė	Geno <i>H</i> sankibos su atsparumo kai kurioms ligoms lokusų paieška	1. Papildytas paprastosios avietės genolapis 2. Nustatyta geno <i>H</i> sankiba su atsparumu stiebų pilkajam kekerui ir avietiniam dvyngrybiui
Badjakov ir kt., 2006	SSR, RAPD	Bulgarijos vietinių ir kitų šalių aviečių veislių genetinės įvairovės įvertinimas	1. Įvertinti Bulgarijos aviečių genetiniai ištekliai 2. Nustatyta didelė genetinė įvairovė tarp tirtų veislių

II. TYRIMŲ OBJEKTAS IR METODAI

1. Tyrimų objektas – paprastoji avietė

Sisteminė padėtis. Paprastoji avietė (*Rubus idaeus* L.) priklauso magnolijūnų (Magnoliophyta) skyriui, magnolijainių (dviskilčių) (Magnoliopsida) klasei, erškėčiažiedžių (Rosidae) poklasiui, erškėtinių (Rosaceae) šeimai, *Rubus* genčiai, *Idaeobatus* pogentei (Murkaitė, 1971).

Rubus gentis yra viena iš taksonomiškai sudėtingesnių genčių. Vieni autorių nuomone, jai priklauso 500 rūšių (Graham ir kt., 1997), kitų – apie 750 (Alice, Campbell, 1999), o kai kurie šaltiniai nurodo 1200 rūšių (Tirmenstein, 1990). *Rubus* yra didelė ir kompleksinė gentis, jungianti 12 pogenčių. Svarbiausios ir gausiausios yra *Eubatus* (gervuogės) ir *Idaeobatus* (avietės) pogentės. Toks taksonominis neapibrėžtumas yra dėl to, kad *Rubus* genties atstovai pasižymi sudėtinga dauginimosi biologija: šalia lytinio ir vegetatyvinio dauginimosi stebima apomiksė, kai kuriose *Rubus* rūšyse plačiai paplitusi tarp rūšinė hibridizacija ir poliploidija (Nybom, Schaal, 1990; Abbate ir kt., 2002). Europinės *Rubus* genties atstovės dažniausiai triploidinės, diploidinės tik *R. arcticus*, *R. idaeus*, *R. incanescens* ir *R. ulmifolius* rūšys. Šiaurės Amerikos, Rytų Azijos ir Himalajų krašto *Rubus* genties atstovės dažniausiai diploidinės (Hegi, 1975). Bazinis *Rubus* chromosomų skaičius $n=7$.

Dėl sistematikos rūšies ribose taip pat nėra vieningos nuomonės. Įvairūs tyrėjai išskiria Linėjaus aprašytoje *Rubus idaeus* rūšies viduje įvairius porūšius, formas, varietetus (Давлетшина, Уланова, 1996). 1911 m. Focke išskyrė net 7 *Rubus idaeus* porūšius ir daugybę varietetų. Rusų tyrėja Rozanova 1945 m. *Rubus idaeus* išskyrė į tris atskiras rūšis: *Rubus vulgatus* Arrh. – europinė avietė, *R. sachalinensis* Leveille – sibirinė arba sachalininė avietė, *R. strigosum* Michx. – šeriuotoji avietė. *R. sachalinensis* pasirodė esanti poliploidinė. Daugelio autorių nuomone, Eurazijoje ir Š. Amerikoje sutinkama *Rubus idaeus* yra ne ta pati, todėl jie išskiria *R. idaeus* L. ssp. *vulgatus* Arrh. – paprastoji avietė Eurazijoje ir *Rubus idaeus* L. ssp. *strigosus* (Michx.) Focke. – šeriuotoji avietė Š. Amerikoje (Lukoševičius ir kt., 1996). Visos šios įvairių autorių

siūlomos prielaidos *Rubus idaeus* skaldyti į atskirus porūšius remiasi didele gamtoje stebima paprastosios avietės morfologine įvairove ir plačiu geografiniu paplitimu. Taip pat pažymima, kad gamtoje neretai aptinkami paprastosios avietės ir gervuogės hibridai (Давлетшина, Уланова, 1996).

Daugelis *Rubus* rūšių yra paplitusios Šiauriniame pusrutulyje, vidutinio ir šaltojo klimato zonose, kelios aptinkamos Pietinio pusrutulio tropiniuose rajonuose.

Morfologija. Paprastoji avietė (2 pav.) – daugiametis krūmas, turintis daugiamečių žolinių augalų požymių. Avietei būdingi dviejų tipų stiebai. Pirmamečiai stiebai vadinami primokanais, antramečiai – florikanais. Dera antramečiai stiebai, kuriems nudžiūvus, iš daugiamečių šakniastiebių išauga pirmamečiai stiebai. Paprastosios avietės žiedai formuojasi ant florikanų. Paprastai avietės primokanų užaugina dukart daugiau negu florikanų. Kartais ir primokanai žydi tais pačiais metais ir išaugina vaisius. Šiuo požymiu naudojamos išvedant remontantines aviečių veisles. Paprastosios avietės žiedpumpuriai formuojasi tuo metu, kai stiebai pereina į ramybės būseną. Bambliai išaugina pirminius, antrinius ir tretinius žiedpumpurius. Antriniai ir tretiniai žiedpumpuriai išsivysto, jeigu pirminiai pažeidžiami arba dėl kokių nors priežasčių žūva. Florikanai paprastai neauga arba auga gana nežymiai. Primokanai ir florikanai konkuruoja dėl resursų, todėl, kai dėl kokių nors priežasčių nunyksta florikanai, primokanų išauga daugiau. Šviesa ir dirvožemio savybės turi įtakos paprastosios avietės stiebo augimui (Tirmenstein, 1990).

Paprastosios avietės šaknų sistema daugiametė, paviršinė. Pagrindinė šaknis dažnai apmiršta ir greitai pakeičiama pridėtinėmis šaknimis, kurios suformuoja galingą šaknų sistemą. Pagrindinės šaknys gali nutolti nuo motininio krūmo 2–3 metrų atstumu, nors pagrindinė šaknų dalis nenutolsta toliau 50 cm. Paprastosios avietės šaknims būdingas didelis pridėtinių pumpurų ir etioliuotų stiebų skaičius, iš kurių išauga šakninės atžalos. Pridėtiniai pumpurai paprastai susiformuoja humusinguose dirvožemio sluoksniuose (Давлетшина, Уланова, 1996).



A



B

2 pav. Paprastoji avietė (*Rubus idaeus* L.). A – bendras augalo vaizdas; B – šakelės bendras vaizdas (pagal caliban.mpiz-koeln.mpg.de/~stueber/koehler/)

Stiebai statūs, kiek palinkusiomis viršūnėmis, užauga iki 1,5–2,5 m aukščio, žalsvi, žalsvai rusvi, rudi, su melsvu apnašu arba be jo, pliki ar apaugę trumpais plaukeliais bei šereliais ir rusvai rudais silpnais dygliais. Pasitaiko formų ir nedygliuotais stiebais.

Florikanų lapai sudėtiniai – trilapiai, primokanų lapai dažnai skiriasi: žemutiniai – plunksniški, sudaryti iš 5–7 lapelių, viršūniniai – trilapiai. Lapeliai rombiški, kiaušiniški, nusmailėję, viršutinėje pusėje apaugę retais plaukeliais arba pliki, apatinė pusė – veltiniška. Viršūninis lapelis stambiausias, kartais skiautėtas, kotuotas, šoniniai mažesni, stambiai ar kiek smulkiau dvigubai dantyti. Lapkotis truputį dygliuotas arba plikas; prielapiai siūliški, priaugę prie lapkočio.

Žiedai – balti, taisyklingi, dvilyčiai, penkianariai, vainiklapiai trumpesni už taurėlapius, siauri, tokio pat ilgio kaip kuokeliai, susitelkę trumpose viršūninėse arba pažastinėse plaukuotose ir šiek tiek dygliuotose negausiažiedėse kekėse.

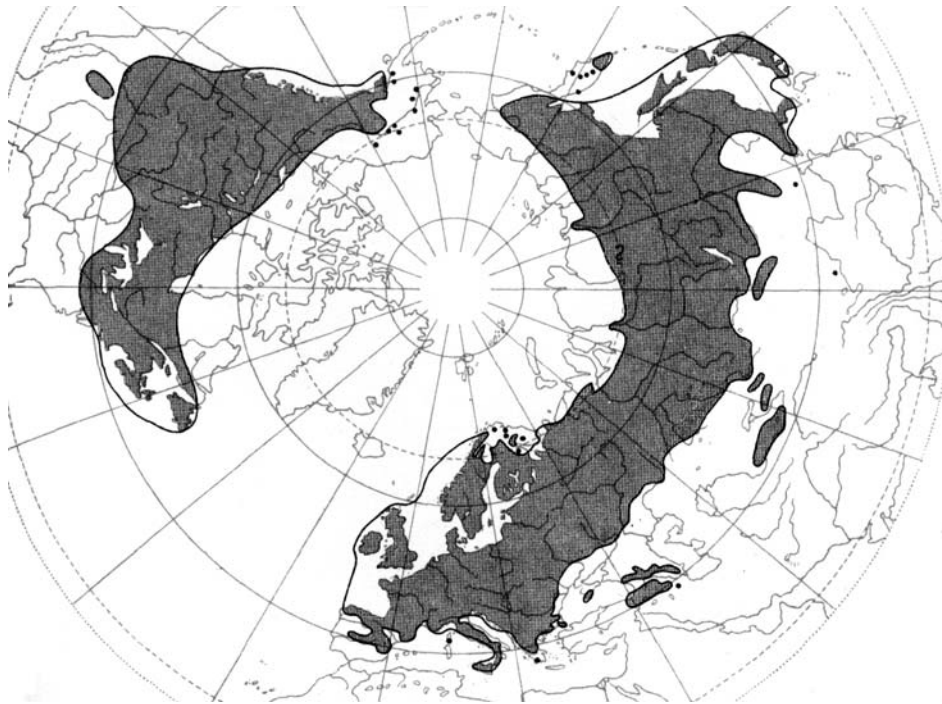
Vaisiai pusrutuliški ar kūgiški, raudoni (avietiniai), padengti trumpais plaukeliais, saldūs, kvapnūs, prinokę lengvai atsiskiria nuo kūgiško žiedsosčio (Murkaitė, 1971). Pasitaiko augalų, kurių vaisiai geltonos spalvos, tai – recesyvinė mutacija (Lukoševičius ir kt., 1996).

Kaulavaisių skaičius vaisiuje priklauso nuo mikroklimato, apdulkinimo efektyvumo. Aviečių sėklos sunkiai dygsta. Tai priklauso nuo nepralaidaus sėklos apvalkalo, jame esančių cheminių inhibitorių ir ramybės būsenoje esančio embriono. Sėklų ramybė nutrūksta dėl tam tikrų veiksnių derinimosi: užšalimo – atšilimo ciklo trukmės, paros ir metinės temperatūros kitimo, sėklos apvalkalėlio drėkinimo–išdžiūvimo, perėjimo per gyvūnų virškinimo traktą, grybų ir vabzdžių aktyvumo ant sėklos apvalkalėlio. Gamtinėse populiacijose dauguma sėklų sudygsta per pirmus 2–3 metus, nors pasitaiko nemažai tokių, kurios ramybės būsenoje dirvoje praleidžia ir dešimtį metų (Tirmenstein, 1990).

Paprastoji avietė žydi gegužės – birželio mėn. Žiedai išskiria daug nektaro. Pagrindiniai apdulkintojai – įvairūs vabzdžiai, dažniausiai – bitės. Vaisiai prinoksta liepos – rugpjūčio mėn., sėklas platina įvairūs paukščiai ir žinduoliai. Auga miškuose, skynimuose, pamiškėse, kirtimuose, ypač mėgsta azoto junginiais turtingus dirvožemius. Nereikli dirvožemio mechaninei sudėčiai – auga ir priemolyje, ir priesmėlyje, pajaurėjusiuose velėniniuose dirvožemiuose (Navasaitis ir kt., 2003). Plinta šaknų atžalomis, sudarydama tankius sąžalynus (Murkaitė, 1971).

Paplitimas Lietuvoje. Paprastoji avietė dažna visoje Lietuvos teritorijoje.

Bendras paplitimas. Paprastosios avietės arealas apima Europą (tolstant į pietus sutinkama kalnuose), Azijos vidutinio klimato juostą (3 pav.). Šiaurės Amerikoje retas, turbūt atneštinis augalas.



3 pav. Paprastosios avietės paplitimas (pagal Meusel ir kt., 1965)

Praktinė reikšmė:

- **Maistinis augalas.** Avietės ir gervuogės yra svarbiausios uoginės kultūros šiaurinėje vidutinio klimato zonoje Europoje ir Šiaurės Amerikoje. Vaisiai turi 80,0–86,9% vandens, 8–12% sausų tirpiųjų medžiagų, 2,6–7,1% angliavandenių (0,2–2,2% sacharozės, 1,8–5,0% monosacharidų), pektinų, 15,7–30,2% askorbo rūgšties, 1,0–2,2% kitų rūgščių (elaginės, benzoinės, obuolių, citrinų, salicilo, cinamono), antocianų, vitaminų B, PP. Švieži, šaldyti ir perdirbti vaisiai naudojami maistui, tinkami alaus ir vyno gamybai.

- **Medingas augalas.** Aviečių žiedai išskiria daug nektaro, kuris pritraukia įvairius vabzdžius. Iš 1 ha avietyno bitės pagamina 59–116 kg medaus (Lukoševičius ir kt., 1996).

- **Vaistinis augalas.** Paprastoji avietė – nuo senų laikų žinomas ir renkamas vaistinis augalas. Aviečių lapų arbata lietuvių liaudies medicinoje plačiai vartojama kaip prakaitavimą skatinanti priemonė (Murkaitė, 1971). Kitose šalyse augalas plačiai vartojamas ginekologijoje ir akušerijoje: menstruacijų ciklui reguliuoti, nėščiosioms nuo rytinio pykinimo, taip pat – virškinimo trakto, kvėpavimo ligų gydymui. Aviečių lapai pasižymi

sutraukiamuoju poveikiu, todėl vartojami burnos ertmės skalavimui nuo uždegimų, dantenu kraujavimo. Tiriamos aviečių vaisių antibakterinės ir priešvirusinės savybės. Aviečių vaisiai pasižymi priešvėžinėmis savybėmis, nes jose gausu elaginės rūgšties. Švieži vaisiai vertinami, nes juose yra natūralių antioksidantų: antocianinų, katechinų, flavonolių, flavonų, askorbo rūgšties. Antioksidantų kiekiu paprastoji avietė prilyginama šilauogei. Manoma, kad aviečių vaisių vartojimas turėtų didėti, nes patvirtintos jų dietinės savybės. Kosmetikoje vertinamas aviečių aliejus, kuris turi daug vitamino E, omega–3 riebiųjų rūgščių ir pasižymi apsauginėmis nuo saulės savybėmis (Beattie ir kt., 2005).

- **Ekologiškai svarbus augalas.** Paprastoji avietė, kaip ir daugelis kitų *Rubus* genties atstovų, pasižymi viena lanksčiausių dauginimosi, kolonizavimo ir rūšies išlaikymo strategijų tarp sumedėjusių augalų. Iš vienos pusės, tai gali būti nepageidaujamas augalas miško želdynuose, nes stelbia medžių sodinukus (Navasaitis ir kt., 2003), iš kitos – puikiai tinka eroduotiems plotams apželdinti, yra puiki priedanga ir maisto šaltinis įvairiems miško gyvūnams.

Šiame darbe buvo tiriama paprastosios avietės genetinė kolekcija ir gamtinės populiacijos.

1.1. Paprastosios avietės genetinė kolekcija

Vilniaus universiteto Botanikos sode, Augalų genetikos skyriuje sukaupta ir saugoma unikali Lietuvoje vegetatyvinės kilmės paprastosios avietės genetinė kolekcija. Joje auginamos laukinės avietės (šiuo metu apie 116 kolekcinių pavyzdžių) iš visų Lietuvos rajonų, taip pat yra keletas egzempliorių iš kaimyninių šalių: Baltarusijos, Latvijos bei Estijos. Ši kolekcija buvo pradėta formuoti 2001 metais (Balčiūnienė ir kt., 2005) ir iki šiol kasmet yra papildoma įdomesniais augalais.

1.1.1. Kolekcijos surinkimas

Pagrindinis kriterijus, pagal kurį buvo atrenkami augalai į genetinę kolekciją – paprastosios avietės morfologinė įvairovė (Labokas, 1998). Vasaros ekspedicijų metu buvo atrenkami augalai, kurie skyrėsi savo fenotipu: stiebų aukščiu, lapų ir stiebų spalva, lapų forma ir dydžiu, lapų pakraščių dantytumu; skirtingu žydėjimo laiku, augo skirtingose augavietėse. Taip pat buvo kreipiamas dėmesys į tai, kad kolekcijos pavyzdžių radavietės kuo tolygiau padengtų Lietuvos teritoriją. Kai kurios avietės buvo iškasamos kartu su augavietės dirvožemiu, kuris po to buvo analizuojamas (nustatomas dirvožemio rūgštumas (pH), humuso, azoto, P_2O_5 ir K_2O kiekis) Botanikos instituto Cheminės analizės laboratorijoje (1 lentelė Priede). Gauti duomenys panaudoti analizuojant aplinkos veiksnių poveikį RAPD ir SOD polimorfizmui (žr. skyriaus Rezultatai 1.2.1 ir 1.5 skyrelius).

Siekiant išsaugoti iškasto augalo genetinį identiškumą, buvo atskiriamos požeminėmis stiebo dalimis susijungusios šakninės atžalos. Jos buvo perkeltos į VU Botanikos sodo eksperimentinį lauką ir pasodintos trimis pakartojimais. Tarp tos pačios avietės trijų skirtingų augalų buvo paliekama po 1 metrą, o tarp aviečių iš skirtingų radaviečių – po 2 metrus. Kiekvienam kolekcijos pavyzdžiui suteiktas numeris. DNR polimorfizmo tyrimams buvo atrinkti 49 paprastosios avietės kolekcijos pavyzdžiai. Avietės buvo atrenkamos pagal vizualiai matomus morfologinius skirtumus. Buvo kreipiamas dėmesys į tai, kad jos būtų ir iš geografiškai skirtingų Lietuvos taškų (4 pav., 4 lentelė).

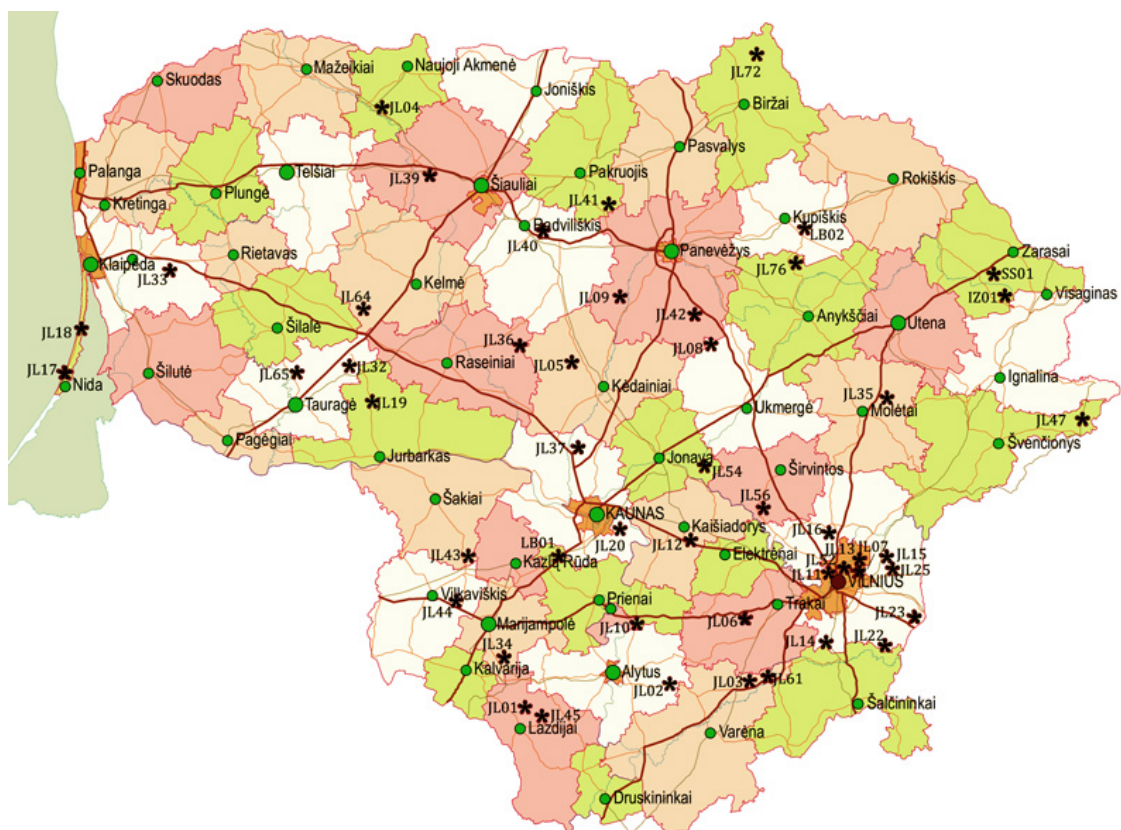
4 lentelė. Tirtos genetinės medžiagos pradinės radavietės ir augaviečių tipai

Kolekcijos pavyzdžio numeris	Radavietė	Geografinės koordinatės		Aukštis virš jūros lygio, m	Augavietės tipas
		R ilg.	Š pl.		
JL01*	Lazdijų raj., Dusia	23°40′	54°17′	110	Ežero pakrantė
JL02*	Alytaus raj., Pocelonys	24°13′	54°21′	146	Eglynų kirtimas
JL03*	Varėnos raj., Valkininkai	24°45′	54°20′	146	Brandus pušynas
JL04*	Akmenės raj., Venta	22°51′	56°06′	94	Alksnynas
JL05*	Kėdainių raj., Krakės	23°47′	55°24′	78	Ažuolynas
JL06*	Trakų raj., Spindžius	24°42′	54°33′	174	Mišrus miškas, paežerė
JL07	Vilniaus raj., Kairėnai	25°24′	54°43′	156	Krūmynai
JL08*	Ukmergės raj., Užulienis	24°32′	55°24′	84	Mišraus miško kirtimas
JL09*	Panevėžio raj., Ustronė	24°05′	55°37′	55	Upės šlaitas
JL10*	Prienų raj., Vėžionys	24°09′	54°32′	105	Mišraus miško kirtimas
JL11*	Vilniaus raj., Verkiai	25°18′	54°45′	119	Mišraus miško kirtimas
JL12*	Kaišiadorių raj., Žiezmariai	24°28′	54°48′	138	Lapuočių miško kirtimas
JL13	Vilniaus raj., Pavilniai	25°21′	54°41′	178	Upės šlaitas
JL14*	Šalčininkų raj., Baltoji Vokė	25°08′	54°28′	129	Durpynas
JL15*	Vilniaus raj., Bezdonys	25°27′	54°47′	156	Pušynas
JL16*	Vilniaus raj., Melkys	25°12′	54°51′	166	Ežero pakrantė
JL17	Klaipėdos raj., Nida	20°58′	55°17′	3	Pajūrio smėlynai
JL18*	Klaipėdos raj., Juodkrantė	21°07′	55°35′	8	Smėlėta pakrantė
JL19	Jurbarko raj., Lenkčiai	22°44′	55°18′	49	Paupio krūmynai
JL20	Kauno raj., Girionys	24°02′	54°51′	79	Marių pakrantė
JL22*	Vilniaus raj., Turgeliai	23°32′	54°28′	201	Spygliuočių kirtimas
JL23	Vilniaus raj., Mažoji Kuosinė	25°41′	54°34′	262	Mišrus miškas
JL25	Vilniaus raj., Mickūnai	25°27′	54°43′	170	Pušyno pakraštys
JL32	Tauragės raj., Liaudginai	22°33′	55°19′	58	Upės krantas
JL33	Klaipėdos raj., Girininkai	21°31′	55°39′	58	Mišrus miškas
JL34	Marijampolės raj., Bukta	23°25′	54°26′	99	Mišrus miškas
JL35	Molėtų raj., Mindūnai	25°35′	55°12′	149	Ežero sala
JL36*	Raseinių raj., Steponkaimis	23°24′	55°25′	109	Mišraus miško kirtimas
JL37	Kauno raj., Babtai	23°47′	55°02′	46	Lapuočių miškas
JL39	Šiaulių raj., Kuršėnai	23°03′	55°59′	105	Pamiškė

4 lentelės tęsinys

Kolekcijos pavyzdžio numeris	Radavietė	Geografinės koordinatės		Aukštis virš jūros lygio, m	Augavietės tipas
		R ilg.	Š pl.		
JL40	Radviliškio raj., Arimaičiai	23°40′	55°46′	110	Ežero pakrantė
JL41	Pakruojo raj., Vaitkūnai	23°57′	55°51′	65	Upės pakrantė
JL42	Panevėžio raj., Alantės	24°34′	55°31′	82	Brandus pušynas
JL43	Šakių raj., Baltrušiai	23°12′	54°44′	41	Ūkinės paskirties žemė
JL44	Vilkaviškio raj., Gurbšilis	23°12′	54°37′	64	Mišrus miškas
JL45*	Lazdijų raj., Trakas	23°46′	54°13′	155	Lapuočių miškas
JL47	Švenčionių raj., Mociškė	26°40′	55°12′	137	Pakelės krūmynai
JL52*	Vilniaus raj., Gailiūnai	25°29′	54°43′	175	Pušyno kirtimas
JL54	Jonavos raj., Upininkai	24°33′	55°03′	81	Jaunas eglynas
JL56	Širvintų raj., Pakalniškė	24°50′	54°54′	93	Pušynas
JL61	Varenos raj., Dargužiai	24°51′	54°24′	120	Ganyklos pakraštys
JL64	Kelmės raj., Raudgiris	22°38′	55°32′	148	Mišrus miškas
JL65	Šilalės raj., Pagramantis	22°13′	55°24′	98	Mišrus miškas
JL72	Biržų raj., Latveliai	24°49′	56°20′	50	Lapuočių miškas
JL76	Anykščių raj., Pelyša	25°05′	55°39′	99	Upės pakrantė
LB01	Prienų raj., Mauručiai	23°45′	54°46′	89	Mišrus miškas
LB02	Kupiškio raj., Šepeta	25°02′	55°48′	116	Mišraus miško kirtimas
IŽ01	Zarasų raj., Salakas	26°07′	55°36′	167	Pušyno kirtimas
SS01*	Zarasų raj., Puščia	26°06′	55°41′	152	Durpynas

*pažymėti pavyzdžiai, kurie buvo įtraukti į pradinį RAPD bei SOD polimorfizmo tyrimą



4 pav. 49-ių paprastosios avietės kolekcijos pavyzdžių, naudotų morfologiniuose ir molekulinuose tyrimuose, radavietės. Konkrečių kolekcijos pavyzdžių radaviečių apytikslė lokalizacija pažymėta *

1.2. Medžiaga paprastosios avietės populiacijų tyrimams

Paprastosios avietės gamtinei genetinei įvairovei tirti pasirinktos populiacijos iš įvairių Lietuvos vietų (5 pav., 5 lentelė). Kai kurias populiacijas pasirinkome dėl specifinių ekologinių sąlygų, skirtingų augaviečių tipų. Paprastoji avietė auga gana įvairiose augavietėse – pušynuose, mišriuose miškuose, krūmynuose, užželiančiuose durpynuose, pajūrio kopose, kirtimuose, pakelėse.

DNR tyrimams augalai buvo renkami 2003–2006 metais, birželio–rugpjūčio mėnesiais. Populiacijose augalai buvo renkami ne mažesniu kaip 50 metrų atstumu vienas nuo kito. Mūsų darbe tirtos populiacijos pavadintos jų radaviečių vardais. Iš viso ištirta 315 augalų iš 19-os Lietuvos populiacijų.



5 pav. Tirtos paprastosios avietės populiacijos Lietuvoje. Konkrečių populiacijų lokalizacija pažymėta ■, numeriai paašškinti penktoje lentelėje

5 lentelė. Tirtų paprastosios avietės populiacijų charakteristika

Eil. nr.	Radavietė	Tirtas augalų skaičius	Rajonas	Geografinės koordinatės		Vidutinis aukštis virš jūros lygio, m	Trumpas augavietės aprašymas
				R ilg.	Š pl.		
1.	Juodkrantė	20	Klaipėdos raj.	21°06'42"	55°33'04"	28	Pajūrio spygliuočių miškas
2.	Šėta	20	Kėdainių raj.	24°15'10"	55°15'21"	74	Mišrus miškas, izoliuota populiacija
3.	Vilkiautinis	20	Varėnos raj.	24°01'40"	54°06'13"	133	Mišrus miškas
4.	Vilnius	19	Vilniaus raj.	25°14'47"	54°40'48"	116	Mišrus miesto tipo parkas (Vingio p.)
5.	Ilgiai	10	Zarasų raj.	26°06'48"	55°48'12"	165	Mišrus miškas
6.	Salos	10	Ignalinos raj.	26°00'14"	55°21'29"	190	Mišrus miškas
7.	Prienai	19	Prienų raj.	23°55'40"	54°36'41"	130	Spygliuočių miškas
8.	Linkuva	18	Pakruojo raj.	23°56'01"	56°05'50"	54	Mišrus miškas, dalis durpyno
9.	Dieveniškės	20	Šalčininkų raj.	25°33'43"	54°11'45"	192	Drėgnas mišrus miškas
10.	Kurtuvėnai	19	Šiaulių raj.	22°59'06"	55°47'30"	143	Mišrus miškas, didelė reg. parko dalis
11.	Baltoji Vokė	19	Šalčininkų raj.	25°11'13"	54°31'31"	124	B. Vokės durpynas
12.	Melekonys	20	Šalčininkų raj.	25°11'19"	54°31'43"	142	Mišrus miškas
13.	Švarėgiris	17	Šakių raj.	22°44'40"	55°03'07"	42	Mišrus miškas
14.	Zokniai	22	Šiaulių raj.	23°23'43"	55°53'57"	130	Karinio poligono teritorija
15.	Margiai	10	Vilniaus raj.	25°43'46"	54°37'36"	165	Užauganti Margių durpyno dalis
16.	Šiulgos	10	Vilniaus raj.	25°43'45"	54°37'45"	174	Mišrus miškas
17.	Nemirseta	9	Palangos m.	21°03'40"	55°52'06"	8	Pajūrio kopų krūmynai
18.	Anaičiai	10	Palangos m.	21°04'35"	55°51'47"	9	Karinio poligono teritorija
19.	Rokai	23	Ukmergės raj.	24°33'01"	55°13'13"	88	Pieva, užauganti krūmynais

2. Tyrimų metodai

2.1. Morfologijos tyrimas paprastosios avietės genetinės kolekcijos pavyzdžiuose

Paprastosios avietės kolekciją sudaro morfologiškai besiskiriantys augalai (Labokas, 1998, Balčiūnienė ir kt., 2005). Jie buvo surinkti iš skirtingų augaviečių ir pasodinti vienodomis sąlygomis VU Botanikos sodo eksperimentiniame lauke. Remiantis *Rubus* L. genties, *Eubatus* Focke pogenčiui sudarytu morfologinių požymių ir biologinių savybių klasifikatoriumi, stebėjimui buvo pasirinkti keli pagrindiniai morfologiniai požymiai bei fenologinės fazės (Грюнер, 1993; Давлетшина, Уланова, 1996).

2003–2007 metais paprastosios avietės kolekcijoje buvo atliekami šie morfologiniai ir fenologiniai tyrimai:

- 1) morfometriniai matavimai (6, 7 lentelės);
- 2) kokybinių požymių įvertinimas (4 lentelė Priede);
- 3) fenologinių fazių stebėjimas (7 lentelė).

Lapo parametrai (ilgis, plotis, viršūninio lapelio ilgis ir plotis, lapkočio ir rachio ilgis) buvo matuojami penkis metus (2003–2007 m.), matavimui buvo skinamas antras arba trečias nuo stiebo viršaus pilnai išsiskleidęs lapas, kiekvieno kolekcijos pavyzdžio buvo matuojama po penkis lapus. Lapai matuoti švieži, nedžiovinti. Florikano aukštis ir skersmuo buvo matuojami tris metus (2005–2007 m.) anksti pavasarį, kai skleidžiasi lapai, arba rudenį, po vegetaciją baigusią stiebų pašalinimo. Kiekvieno kolekcijos pavyzdžio buvo matuojama po penkis geriausiai išsivysčiusius florikanus. Florikano aukštis matuotas nuo žemės paviršiaus iki viršūnės, skersmuo matuotas 30 cm aukštyje nuo dirvos paviršiaus. Žiedo skersmuo matuotas dvejus metus (2005 ir 2007 m.), kiekvieno kolekcijos pavyzdžio matuota po penkis žiedus. Vaisiai buvo matuoti dvejus metus (2005 ir 2007 m.). Tyrimams rinkti tik sveiki, ligų ir kenkėjų nepažeisti vaisiai. Surinkti lauko kolekcijoje, jie buvo kuo greičiau pasveriami, tada išmatuojamas jų ilgis ir pagrindo skersmuo, suskaičiuojami kaulavaisiai.

6 lentelė. Paprastosios avietės kolekcijoje tirti morfologiniai požymiai

Požymis	Požymio aprašymas
Lapo ilgis	Ilgis nuo prisisegimo prie stiebo vietos iki viršūninio lapelio galo
Lapo plotis	Matuojamas nuo sudėtinio lapo vieno šoninio lapelio viršūnės iki kito šoninio lapelio viršūnės
Viršūninio lapelio ilgis	Ilgis nuo viršūninio lapelio pagrindo iki jo viršūnės
Viršūninio lapelio plotis	Matuojamas plačiausioje viršūninio lapelio vietoje
Lapkočio ilgis	Ilgis nuo prisisegimo prie stiebo vietos iki pirmos šoninių lapelių poros
Rachio ilgis	Ilgis nuo šoninių lapelių prisisegimo pradžios iki viršūninio lapelio pagrindo
Kaulavaisių skaičius vaisiujė	Skaičiuojami pavieniai kaulavaisiai sutelktiniame vaisiujė
Vaisiaus svoris	Atskirai po vieną sveriami šviežiai surinkti vaisiai
Vaisiaus ilgis	Ilgis nuo sutelktinio vaisiaus pagrindo iki viršūnės
Vaisiaus skersmuo	Matuojamas sutelktinio vaisiaus pagrindo skersmuo
Florikano aukštis	Antramečio stiebo aukštis nuo pagrindo iki viršūnės
Florikano skersmuo	Antramečio stiebo skersmuo 30 cm aukštyje nuo žemės
Žiedo dydis	Matuojamas žiedo skersmuo

Įvairių kokybinių požymių (spalvos, blizgesio, plaukuotumo, dygliuotumo intensyvumo) stebėjimai ir matavimai paprastosios avietės kolekcijoje buvo atliekami lauko sąlygomis.

Morfologinių požymių matavimai ir fenologinių fazių stebėjimai buvo atliekami įvairiose augalų vystymosi stadijose (7 lentelė).

7 lentelė. Paprastosios avietės kolekcijos pavyzdžių morfologinių požymių ir fenologinių fazių stebėjimas įvairiais laikotarpiais

Augalo vystymosi stadija	Laikotarpis (mėn.)	Morfologija	Fenologinė fazė
Lapų sprogimas	IV–V		Stiebų apšalimas
Lapų skleidimasis	V	Florikanų aukštis, skaičius, stiebų spalva, augimo pobūdis	Lapų skleidimosi pradžia
Pilnas lapų išsiskleidimas	V–VI	Lapų morfologiniai matavimai, primokanų skaičius	
Žydėjimas	V–VI	Žiedų morfologiniai matavimai, stiebų spalva	Žydėjimo pradžia, trukmė, intensyvumas
Vaisių nokimas	VI–VII	Vaisių morfologiniai matavimai	Vaisių gausumas, derėjimo trukmė
Pakartotinis žydėjimas ir vaisių derėjimas	IX–X		Fiksuojamas įvykis
Perėjimas į ramybės periodą	X–XI	Florikanų aukštis*, skersmuo	

2.2. DNR polimorfizmo tyrimas RAPD metodu

DNR išskyrimas. Augalų DNR buvo išskiriama iš šviežių lapų. Augalai renkami pirmąją dienos pusę, kad neprarastų drėgmės. Lauke nuskinti lapai buvo laikomi ne aukštesnėje kaip +4°C temperatūroje.

DNR skyrimui buvo imamas trečias nuo stiebo viršaus sveikas (be matomų mechaninių pažeidimų, nedeformuotas vabzdžių ar grybų) pilnai išsiskleidęs lapas. Prieš DNR skyrimą lapai nuplaunami distiliuotu vandeniu ir 95% etanoliu, nusausinami. DNR buvo skiriama naudojant genomines DNR skyrimo rinkinį #K0512 (Fermentas).

Darbo eiga:

1. Paruošiamas 200 µl TE buferio ir 400 µl lizės tirpalo mišinys;
2. Maždaug 100 mg švaraus lapo audinio homogenizuojama skystu azotu, susidarę milteliai nedelsiant supilami į 1,5 ml mėgintuvėlius su TE buferio ir

lizės tirpalo mišiniu. Mėginys išmaišomas ir inkubuojamas +65°C temperatūroje termostate (Thermomixer comfort, Eppendorf);

3. Po 7–9 min į atvėsusius mėgintuvėlius įpilama 600 µl chloroformo, mėginys sumaišomas ir centrifuguojamas 4 min 11000 aps./min centrifuga Eppendorf 5415R. Viršutinė mėginio fazė perkeliama į naują mėgintuvėlį;

4. Supernatantas sumaišomas su nusodinimo tirpalu (720 µl sterilaus dejonizuoto vandens (MiliQ) ir 80 µl nusodinimo tirpalo iš DNR skyrimo rinkinio) centrifuguojamas 3 min 11000 aps./min greičiu;

5. Supernatantas pašalinamas, o nuosėdos tirpinamos maišant su 100 µl NaCl tirpalo iš DNR skyrimo rinkinio;

6. Į ištirpusias nuosėdas įpilama po 300 µl 95 % atšaldyto etanolio. Išmaišyti mėginiai 20 min laikomi –20°C temperatūroje; po to centrifuguojami 5 min 11000 aps./min greičiu esant +4°C;

7. Supernatantas pašalinamas, nuosėdos užpilamos 200 µl 70% šalto etanolio ir centrifuguojama 4 min 11000 aps./min greičiu;

8. Pašalinamas etanolis ir nuosėdos paliekamos džiūti 10–15 min steriliame bokse kambario temperatūroje;

9. Nuosėdos (DNR su RNR priemaišomis) tirpinamos 300 µl sterilaus dejonizuoto vandens +4° temperatūroje per naktį;

10. Į mėginius įpilama po 3 µl ribonuklezės A (10 mg/ml) ir inkubuojama termostate 30 min esant +37°C temperatūrai;

11. Po inkubacijos į kiekvieną mėgintuvėlį įpilama po 300 µl chloroformo, išmaišoma ir centrifuguojama 2 min 10000 aps./min greičiu;

12. Viršutinė vandeninė fazė atsargiai nusiurbiamą į 1,5 ml mėgintuvėlį, į kurį įpilama po 0,1 tūrio natrio acetato (3M) ir 2,5 tūrio 95 % šalto (–20°C) etilo alkoholio. Mėginiai sumaišomi ir laikomi 30 min –20°C temperatūroje, kad iškristų DNR;

13. Atšaldyti mėginiai centrifuguojami 5 min 10000 aps./min greičiu +4°C temperatūroje, atsargiai nupilamas supernatantas, DNR praplaunama 200 µl 70% etanolio ir centrifuguojama 5 min 10000 aps./min greičiu;

14. Pašalinami etanolio likučiai ir DNR išdžiovinama steriliame bokse;

17. Į kiekvieną mėgintuvėlį su išdžiovinta DNR pilama po 100 µl sterilaus dejonizuoto vandens (18,3 MΩ), DNR ištirpinama, atsargiai ją pamaisant.

DNR koncentracija ir švarumas buvo nustatoma biofotometru (BioPhotometer, Eppendorf, Vokietija). Tolimesnei pavyzdžių analizei bei elektroforezei agarozės gelyje tinkamos DNR, kurių optinių tankių santykis, esant 260 nm ir 280 nm ilgio bangoms, yra ~1,8. Išmatavus DNR koncentracijas, jos buvo praskiestos iki 50 ng/µl. Tolesniam saugojimui originali DNR laikoma šaldiklyje (–20°C temperatūroje), o praskiesta iki darbinės koncentracijos DNR buvo naudojama polimerazinei grandininei reakcijai vykdyti.

RAPD sąlygos. RAPD mišinys ir reakcijos sąlygos pateikta 8 ir 9 lentelėse. DNR amplifikacija buvo atliekama termocikleriuose Tpersonal (Biometra) ir Mastercycler personal (Eppendorf).

8 lentelė. PGR reakcijos mišinio komponentai vienam DNR pavyzdžiui

PGR reakcijos mišinio komponentai	µl
Dejonizuotas vanduo	13,8
10× PGR buferis (100 mM Tris–HCl, pH 8,8; 25°C, 500 mM KCl, 0,8% Nonidet P40) (Fermentas)	2,5
dNTP mišinys (2 mM kiekvieno dNTP) (Fermentas)	2,5
MgCl ₂ (Fermentas)	3,0
Oligonukleotidinis pradmuo (1 O.V.)	1
<i>Taq</i> polimerazė (5u/µl) (Fermentas)	0,2
DNR (50 ng/µl)	2
Visas reakcijos mišinio tūris	25

Į kiekvieną mėginį įpilama po 5 µl (6×) DNR užnešimo buferio (40% sacharozės, 2mM EDTA, 0,2% bromfenolio mėlio). Pavyzdžiai laikomi šaldytuve +4°C temperatūroje.

9 lentelė. DNR pagausinimo režimas

Etapas	Temperatūra	Laikas	
Pradinė DNR denatūracija	94°C	4 min.	44 ciklai
DNR denatūracija	94°C	1 min.	
Pradmenų prisijungimas	35°C	1 min.	
DNR sintezė	72°C	2 min.	
Galutinė sintezė	72°C	5 min.	

PGR produktų elektroforezė. Pagausinti DNR fragmentai buvo frakcionuojami 1,5% agarozės gelyje 1×TBE (89 mM Tris, 89 mM boro rūgštis, 2 mM EDTA) buferyje. Į gelio formavimo rėmelį su įstatytais šukomis įpilama 200 ml iš anksto paruošto ir atšaldyto iki 50–60°C agarozės tirpalo, į kurią įlašinta 20 µl etidžio bromido (5 mg/ml). Po gelio susiformavimo į šulinėlius sulašinami PGR produktai, gelis atsargiai panardinamas į elektroforezės buferį. Į kraštinius šulinėlius įlašinama po 2,5 µl DNR fragmentų dydžio standarto GeneRuler™ 1kb DNA Ladder arba GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas). Elektroforezė vykdoma esant 4 V/cm režimui (120 V įtampa, atstumas tarp elektrodų – 30 cm), kol bromfenolio dažo linija pasiekia gelio kraštą. Elektroforezės rezultatai buvo fotografuojami ir analizuojami naudojant gelių dokumentavimo sistemą BioDocAnalyse (Biometra).

Duomenų analizė. Po PGR produktų elektroforezės geliai buvo fotografuojami UV šviesoje. DNR fragmentų dydžiai buvo vertinami „BioDocAnalyse“ (Biometra) programa, naudojant GeneRuler™ 1kb DNA Ladder arba GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus kaip DNR fragmentų dydžio standartą.

Kiekvieno pavyzdžio DNR RAPD analizė buvo atliekama 2–3 kartus. Palyginę pakartotiniuose eksperimentuose gautus RAPD fenotipus, tolesnei analizei atrinkome tik aiškias, lengvai atskiriamas ir patikimai atsikartojančias RAPD juostas. Vienodo dydžio DNR fragmentai buvo laikomi identiškais (Williams, 1990). Buvo nustatytas kiekvieno individo RAPD fenotipas. Tam

tikro dydžio DNR fragmento buvimas individo RAPD produktų elektroforegramos spektre žymimas „1“, o jo nebuvimas – „0“. Neatsikartojantys, neaiškūs ar blogai gelyje elektroforezės metu atsiskyrę DNR fragmentai nebuvo vertinami. Visų individų RAPD fenotipų duomenys buvo suvedami į dvireikšmių požymių lentelę. Duomenų analizę atlikome vertindami visų tirtų avietės kolekcijos pavyzdžių mėginiuose atsikartojančius DNR fragmentus su pasirinktais oligonukleotidiniais pradmenimis. Kadangi kiekvieną RAPD lokusą sudaro du aleliai, tai polimorfiniais buvo laikomi tie lokusai, kurių labiausiai paplitusio alelio dažnis visose tirtose populiacijose buvo mažesnis arba lygus 0,95. Genetinės kolekcijos ir gamtinių populiacijų tyrimuose buvo analizuojami tik polimorfiniai lokusai.

Genetinis atstumas tarp individų (GD_{xy}) buvo apskaičiuojamas pagal Nei ir Li (1979) formulę:

$$GD_{xy} = \frac{1 - 2N_{xy}}{N_x + N_y},$$

N_{xy} – x ir y augalams bendrų DNR juostų skaičius, N_x – DNR juostų skaičius, būdingas augalui x, N_y – DNR juostų skaičius, būdingas augalui y.

Atliekant 49–ių kolekcijos pavyzdžių RAPD analizę genetiniai atstumai buvo apskaičiuoti dar dviem būdais (Sokal, Michener, 1958; Link ir kt., 1995). Koreliacija tarp šių genetinių atstumų matricų buvo nustatyta naudojant STATISTICA 7 (StatSoft Inc., 2004). Paprastosios avietės individų panašumas, remiantis genetiniais atstumais tarp jų, įvertintas UPGMA (angl. *Unweighted Pair – Group Method of arithmetic Averages*) grupavimo metodu. Genetiniai atstumai apskaičiuoti ir dendrograma nubraižyta, naudojantis kompiuterine programa TREECON v. 1.3b (Van de Peer, De Wachter, 1994).

Tiriant paprastosios avietės populiacijų genetinę struktūrą, buvo apskaičiuojami keli genetiniai rodikliai, atskleidžiantys genetinę įvairovę rūšies lygyje tarp populiacijų ir populiacijų viduje. Tai – polimorfinių lokusų skaičius (P), vidutinis stebimas alelių skaičius lokuse (n_a), efektyvių alelių skaičius lokuse (n_e), Nei (1973) genų įvairovė (h), Shannon'o fenotipinės įvairovės indeksas (I), genetinės diferenciacijos koeficientas (G_{ST}). Genetinės

diferenciacijos koeficientas G_{ST} visiems lokusams buvo apskaičiuotas pagal formulę (Nei, 1973):

$$G_{ST} = \frac{(Ht - Hs)}{Ht},$$

G_{ST} – genetinės diferenciacijos koeficientas, Ht – visa genetinė įvairovė, Hs – populiacijos genetinė įvairovė.

RAPD atveju, kai lokuse yra tik du aleliai, G_{ST} identiška Wright'o nustatytai populiacijų genetinę diferenciaciją charakterizuojančiai F_{ST} reikšmei (Nei, 1973). Genetiškai nediferencijuotose populiacijose F_{ST} vertė lygi nuliui. Kuo populiacijos labiau diferencijuotos, tuo F_{ST} vertė yra artimesnė vienetui. Jei $F_{ST}=1$, populiacijose įsitvirtinę skirtingi aleliai (Frankham ir kt., 2004).

Shannon'o fenotipinės įvairovės indeksas apskaičiuotas pagal formulę:

$$I = -\sum_i p_i \ln p_i,$$

p_i – alelio ar DNR juostos dažnis tam tikrame RAPD lokuse (Lewontin, 1972).

Shannon'o fenotipinės įvairovės indeksas naudojamas genetinei įvairovei populiacijų viduje ir tarp populiacijų įvertinimui. Apskaičiavus Shannon'o informacinį indeksą kiekvienam lokusui, jo vertės sumuojamos ir apskaičiuojama vidutinė indekso reikšmė.

Aukščiau minėtų populiacijų genetinės įvairovės rodiklių skaičiavimai buvo atliekami PopGene v.1.31 kompiuterine programa (Yeh ir kt., 1999).

Molekulinės genetinės įvairovės analizė (angl. *AMOVA*), principinių koordinačių analizė paprastosios avietės populiacijose nustatyta naudojant GenAlEx v.6 (*Genetic Analysis in Excel*) programą (Peakall, Smouse, 2006). GenAlEx programa apskaičiuota tarppopuliacinė genetinė įvairovė Φ_{PT} (Φ_{ST}) yra tapati Wright'o F_{ST} ir atspindi populiacijų diferenciaciją. GenAlEx kompiuterine programa atlikti ir Mantel'io koreliacijos testai.

Tiriant paprastosios avietės kolekcijos genetinės įvairovės sąsajas su pradinių augaviečių tipais, daugiamečiais klimato ir geografiniais rodikliais, taip pat nustatant koreliaciją tarp genetinės ir morfologinės įvairovės, buvo naudojama statistinė programa STATISTICA v.7.0 (StatSoft Inc. USA, 2004). Šia programa apskaičiuota koreliacija tarp augalų genetinės įvairovės rodiklių

populiacijose ir geografinių bei genetinių atstumų, o taip pat genetinės įvairovės populiacijose priklausomybė nuo imties dydžio bei daugiamečių klimato rodiklių.

Principinių komponentų analizė (PCA) buvo atlikta naudojant SAS V8 programų paketą (SAS Institute Inc., 1999).

Pearson'o koreliacija tarp avietės kolekcijos pavyzdžių RAPD fenotipų faktorinės analizės rezultatų ir augalų augaviečių edafinių savybių bei jos p-reikšmė apskaičiuota naudojant CORR metodą. RAPD lokusų indėlis genetinių ir edafinių savybių koreliacijai buvo įvertintas STEPDISC metodu.

2.3. SOD polimorfizmo tyrimas

Superoksido dismutazė (SOD, EC 1.15.1.1) buvo išskiriama iš antro arba trečio nuo stiebo viršaus pilnai išsiskleidusio avietės lapo. 1 g lapo buvo homogenizuojamas su 2 ml 0,05M Tris-HCl, pH 7,8 buferiu. Po homogenizacijos ekstraktas centrifuguojamas 15 min 12000 aps./min greičiu, +4°C temperatūroje. Po centrifugavimo supernatantas (grubus ekstraktas) naudojamas natyvioje gel-elektroforezėje.

SOD elektroforezė buvo vykdoma 1,5 mm storio dviejų sluoksnių (9% skiriamasis ir 4% koncentruojamasis) vertikaliame poliakrilamido gelyje, Tris-glicino buferyje, pH 8,3. Į gelio šulinėlius buvo įpilama 20 µl grubaus augalų ekstrakto, o į buferį – apie 700 µl 0,15 mM bromfenolio tirpalo.

30 min buvo vykdoma preelektroforezė, kurios metu srovės stiprumas apie 20 mA, po to apie 2 val. – 40 mA esant 200 mV įtampai. SOD frakcionavimas po bromfenolio išėjimo iš gelio vykdomas dar apie 30 min (Davis, 1964; Beauchamp ir Fridovich, 1971). Elektroforezė vykdoma +4°C temperatūroje. SOD izoformas nedenatūruojančiame gelyje buvo identifikuojamos pagal Beauchamp ir Fridovich (1971) pasiūlytą metodiką. Dažuose gelis buvo inkubuojamas +37°C temperatūroje tamsoje apie 1 val.. Po inkubacijos dažuose gelis buvo plaunamas distiliuotu vandeniu, džiovinamas ir paruošiamas analizavimui.

III. REZULTATAI

1. Paprastosios avietės kolekcijos tyrimai

1.1. Genetinės įvairovės tyrimas RAPD metodu

1.1.1. Pradmenų, tinkamų genotipavimui, atranka ir PGR optimizacija

Pradiniam tyrimų etapui pasirinkta 20 paprastosios avietės kolekcijos pavyzdžių (4 pav., 4 lentelėje pažymėti *), kurių DNR buvo analizuojama naudojant didelį skaičių pradmenų. Šių tyrimų tikslas – optimizuoti PGR sąlygas ir nustatyti molekulinis žymenis, geriausiai tinkančius avietės genetinei įvairovei tirti bei kolekcijos pavyzdžiams genotipuoti.

Pirmiausia buvo siekiama išsiaiškinti tiriamojo objekto (paprastosios avietės) DNR ir reakcijos komponentų ($MgCl_2$, *Taq* polimerazės) koncentracijas, tinkamiausias DNR pagausinimo reakcijai. Geriausios kokybės RAPD spektrai gauti, kai DNR koncentracija reakcijos mišinyje buvo 50 ng/μl, $MgCl_2$ – 3mM, o *Taq* polimerazės – 1 vnt. vienai reakcijai.

Kokybiškų paprastosios avietės pavyzdžių RAPD spektrų paieškai buvo naudojami Roth 270 (1–10), 380 (1–10), 470 (1–10) pradmenų rinkiniai ir pradmenys A3–A7, B6, B7, MP1–MP7 (Fermentas). Iš viso išbandyti 44 oligonukleotidiniai pradmenys, kurių ilgis buvo 10 nukleotidų, išskyrus MP5, kurio ilgis – 12 nukleotidų. 8 pradmenys (MP1, MP6, 270-2, 270-4, 380-5, 380-10, 470-2, 470-5) buvo neinformatyvūs: su jais arba nepavyko pagausinti DNR, arba gauti RAPD spektrai buvo nekokybiški, arba pakartojus bandymą, nebuvo atsikartojimo.

Atlikus RAPD analizę su 36 pradmenimis, gauti 284 amplifikacijos produktai, iš kurių 228 buvo polimorfiški (10 lentelė). Šių pradmenų sekos pateikiamos skyriuje „Priedas“ antroje lentelėje. DNR polimorfizmas tirtų pavyzdžių grupėje sudarė vidutiniškai $80,64 \pm 16,74\%$. Su vienu pradmeniu gauti vidutiniškai $7,89 \pm 1,95$ DNR fragmentai. Daugiausiai analizei tinkamų DNR juostų gauta su pradmeniu 380-3 (13 juostų) ir su pradmenimis A3, A4, 380-2,

470-3, 470-8 (po 11 DNR juostų). Naudojant devynis pradmenis (A7, MP2, 270-1, 270-9, 270-10, 380-8, 470-1, 470-7, 470-10), gauti tik polimorfiniai DNR fragmentai. Mažiausiai polimorfinių DNR amplifikacijos produktų (nuo 33% iki 57%) buvo gauta naudojant pradmenis A6, 270-6, 380-1, 380-6, 380-9. Analizuojamų DNR fragmentų dydis buvo nuo 190 iki 3275 bp.

10 lentelė. Paprastosios avietės 20–ies kolekcijos pavyzdžių genomines DNR RAPD analizės rezultatai, panaudojus 36 informatyvius pradmenis

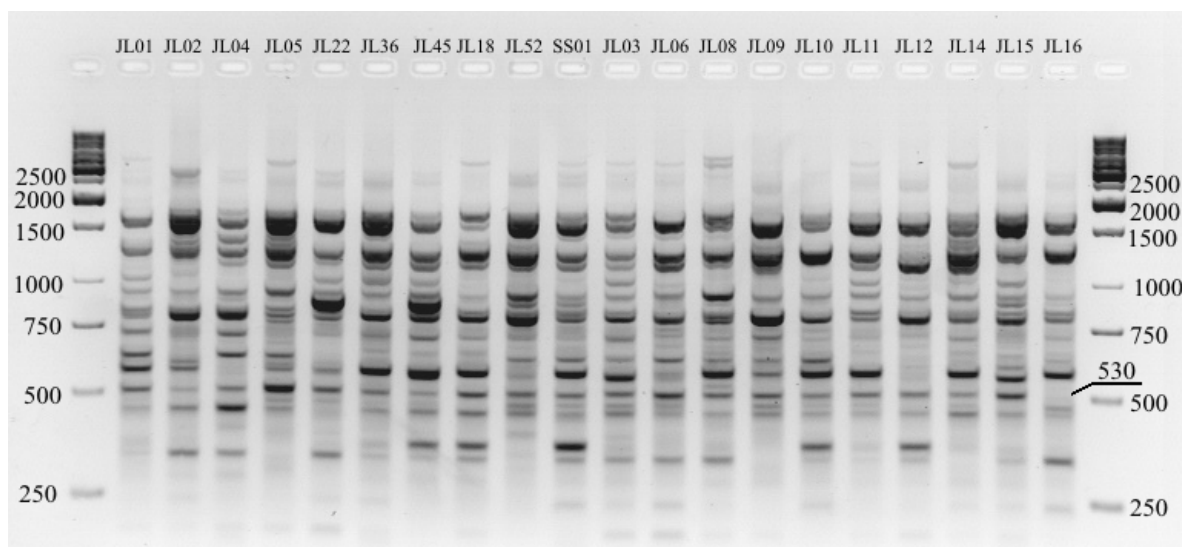
Pradmuo	Analizuotų juostų skaičius	Polimorfi- nių juostų skaičius	Polimor- fizmas, %	Analizuotų juostų dydis (bp)	Genotipui specifi- nių juostų skai- čius, dydis (bp)	Skirtingi fenotipai	
						Skaičius	%
A3	11	7	64	190–1065	0	14	70
A4	11	9	91	355–1035	1 (530 ₀)	18	90
A5	9	7	78	270–1100	1 (795 ₁)	9	45
A6	7	4	57	520–1080	0	13	65
A7	7	7	100	250–730	0	16	80
B6	6	5	83	300–1100	0	13	65
B7	8	6	75	480–1570	0	14	70
MP2	8	8	100	605–2700	0	16	80
MP3	7	6	86	380–1370	0	12	60
MP4	7	6	86	545–1125	0	13	65
MP5	5	3	60	610–1540	2 (610 ₁ , 1090 ₀)	4	20
MP7	6	5	83	700–2060	1 (910 ₁)	11	55
270-1	7	7	100	430–1155	0	11	55
270-3	8	7	88	410–3275	3 (600 ₀ , 770 ₀ , 790 ₁)	9	45
270-5	9	6	67	540–2200	0	12	60
270-6	9	5	56	515–2450	0	10	50
270-7	6	5	83	850–1800	0	6	30
270-8	8	6	75	500–1330	1 (805 ₁)	10	50
270-9	7	7	100	420–2500	2 (420 ₁ , 580 ₁)	13	65
270-10	7	7	100	780–2980	1 (2980 ₀)	13	65
380-1	6	3	50	520–2370	0	6	30
380-2	11	10	91	830–2530	0	20	100
380-3	13	10	77	400–2010	2 (700 ₀ , 820 ₀)	20	100
380-6	9	6	67	685–1100	2 (685 ₁ , 850 ₀)	6	30
380-7	7	6	86	470–1140	0	11	55
380-8	6	6	100	500–1440	1 (1000 ₁)	9	45
380-4	7	5	71	220–1720	1 (450 ₀)	10	50

10 lentelės tęsinys

Pradmuo	Analizuotų juostų skaičius	Polimorfinių juostų skaičius	Polimorfizmas, %	Analizuotų juostų dydis (bp)	Genotipui specifinių juostų skaičius, dydis (bp)	Skirtingi fenotipai	
						Skaičius	%
380-9	6	2	33	530–1300	0	4	20
470-1	6	6	100	560–1180	1 (650 ₀)	13	65
470-3	11	10	91	450–2930	0	16	80
470-4	7	6	86	630–1450	0	11	55
470-6	9	6	67	630–2370	0	10	50
470-7	6	6	100	610–2530	3 (610 ₀ , 630 ₁ , 800 ₀)	8	40
470-8	11	9	82	380–2550	1 (590 ₁)	19	95
470-9	10	7	70	670–2710	1 (670 ₁)	14	70
470-10	6	6	100	745–1860	0	11	55
Vidurkis	7,89±1,95	6,33±1,83	80,64±16,74			11,81	59,03
Iš viso	284	228					

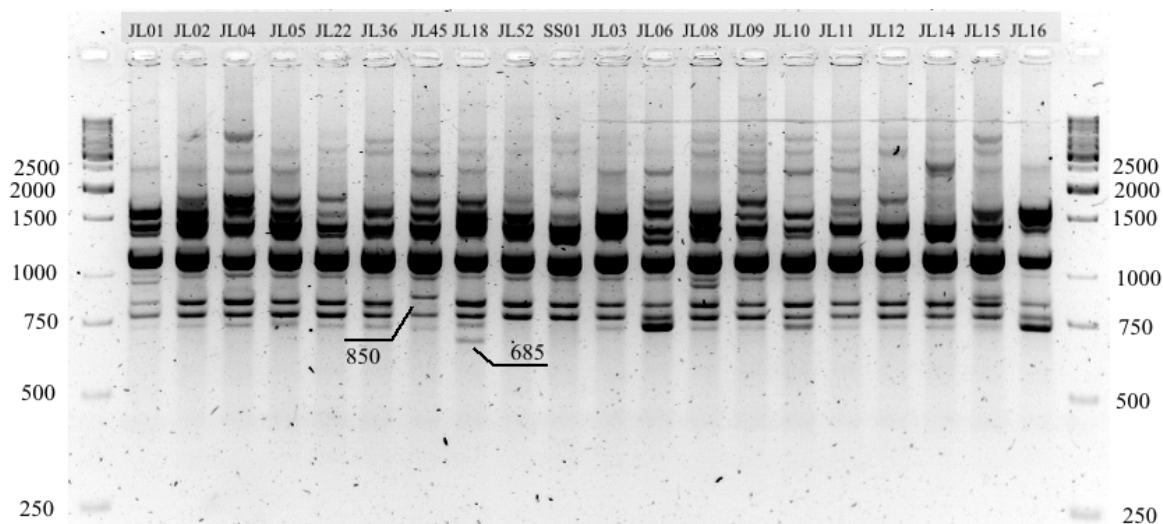
₁ genotipui specifinis tam tikro dydžio DNR fragmentas; ₀ genotipas neturi tam tikro dydžio fragmento, kurį turi kiti tirtieji genotipai (nulinis RAPD lokuso alelis)

Daugiausiai skirtingų RAPD fenotipų gauta su pradmenimis 380-2, 380-3 (po 20), 470-8, A4 (atitinkamai 19 ir 18 spektrų). Mažiausiai spektrų gauta su pradmenimis MP5 ir 380-9, 270-7, 380-1, 380-6. Su kai kuriais pradmenimis nustatyti 24 genotipui specifiniai (šio tyrimo ribose) RAPD žymenys. Pusė tokių žymenų buvo vadinamieji nuliniai aleliai, pasireiškiantys tam tikro dydžio DNR fragmento nebuvimu atitinkamo pavyzdžio RAPD spektre. Pavyzdžiui, tirtų genotipų RAPD produktų elektroforegamoje, gautoje naudojant A4 pradmenį, vieninteliame JL16 pavyzdyje nėra 530 bp dydžio DNR juostos (6 pav.), panašiai, kaip su 380-6 pradmeniu nėra 850 bp dydžio DNR fragmento JL45 genotipe (7 pav., 10 lentelė).



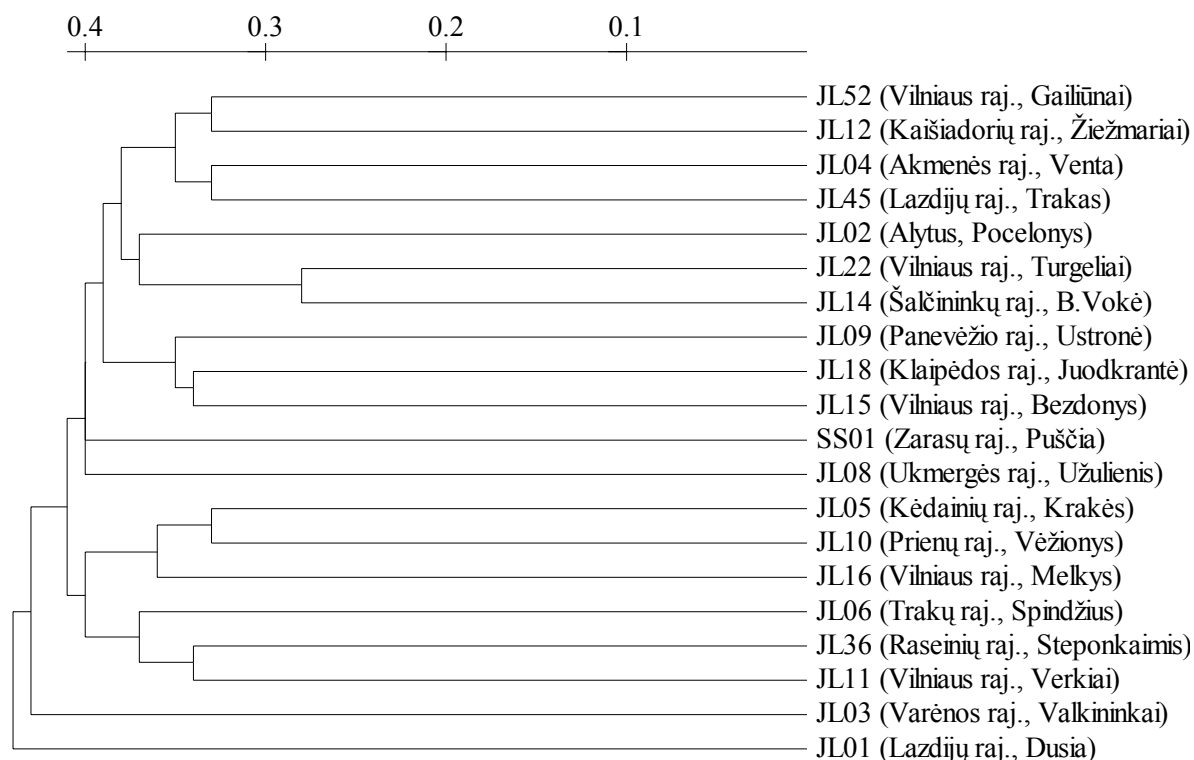
6 pav. RAPD produktų elektroforegrama, gauta su pradmeniu A4. Viršuje – paprastosios avietės kolekcijos pavyzdžių numeriai, kairėje ir dešinėje – DNR fragmentų ilgio žymenys

Tačiau galimas ir priešingas atvejis, kai tam tikro kolekcijos pavyzdžio RAPD fenotipe yra unikalus RAPD produktas. Pavyzdžiui, toks unikalus 685 kb dydžio DNR fragmentas aptiktas su pradmeniu 380-6 paprastosios avietės kolekcijos pavyzdyje JL18 (7 pav.).



7 pav. RAPD produktų elektroforegrama, gauta su pradmeniu 380-6. Viršuje – paprastosios avietės kolekcijos pavyzdžių numeriai, kairėje ir dešinėje – DNR fragmentų ilgio žymenys

Nustačius visų 20–ies tirtų individų RAPD fenotipus, apskaičiuoti Nei ir Li (1979) genetiniai atstumai tarp tirtų kolekcijos pavyzdžių pagal 228 polimorfinius RAPD lokusus. Naudojant genetinių atstumų skaitines reikšmes, UPGMA metodu buvo sudaryta dendrograma, kuri rodo tirtų avietės pavyzdžių genetinę divergenciją (8 pav.).



8 pav. 20–ies paprastosios avietės kolekcijos pavyzdžių grupavimas UPGMA metodu pagal Nei ir Li genetinius atstumus, nustatytus naudojant polimorfinius RAPD lokusus. Viršuje – genetinių atstumų skalė

Dendrogramoje nematyti ryškesnio tirtų pavyzdžių skirstymosi pagal geografinius regionus, visi tirti augalai buvo genetiškai skirtingi. Apskaičiuoti genetiniai atstumai svyravo nuo 0,28 iki 0,51 (3 lentelė Priede). Labiausiai skyrėsi kolekcijos pavyzdžiai JL01 (Lazdijų raj., Dusia) ir JL06 (Trakų raj., Spindžius) bei JL01 ir SS01 (Zarasų raj., Puščia), genetinis atstumas tarp jų buvo 0,51. Genetiškai nutolę pasirodė ir kolekcijos pavyzdžiai JL03 (Varėnos raj., Valkininkai) bei JL09 (Panevėžio raj., Ustronė), genetinis atstumas tarp jų buvo 0,49. Genetiškai artimiausi tirtųjų 20–ies aviečių grupėje buvo kolekcijos pavyzdžiai JL14 (Šalčininkų raj., B. Vokė) ir JL22 (Vilniaus raj., Turgeliai),

tarp jų nustatytas genetinis atstumas – 0,28. Vidutinis genetinis atstumas, nustatytas 20–ies tirtų avietės kolekcijos pavyzdžių grupėje buvo $0,40 \pm 0,04$.

1.1.2. Paprastosios avietės kolekcijos pavyzdžių genotipavimas ir genetinės įvairovės įvertinimas

Norėdami genotipuoti daugiau kolekcijos pavyzdžių, pasirinkome 6 pradmenis: A3, MP4, 270-6, 380-3, 470-8, 470-9 (11 lentelė). Pradmenų pasirinkimą lėmė jais nustatomo DNR polimorfizmo lygis, patikimas atsikartojamumas, patogi RAPD produktų analizė.

11 lentelė. Paprastosios avietės kolekcijos pavyzdžių RAPD analizės rezultatai, gauti su šešiais oligonukleotidiniais pradmenimis

Pradmuo	Analizuotų juostų skaičius	Polimorfinių juostų skaičius	Polimorfizmas, %	Fenotipų skaičius	Analizuotų juostų dydis (bp)
A3	10	8	80	22	450–1800
MP4	9	8	89	38	550–2500
270-6	14	9	64	30	500–2900
380-3	12	9	75	28	390–2100
470-8	11	8	73	36	440–3100
470-9	7	6	86	20	750–2000
Vidurkis	10,50±2,43	8,00±1,10	77,83±9,15		
Iš viso	63	48			

Naudojant šiuos pradmenis, buvo genotipuoti 49 kolekcijos pavyzdžiai (apie 42% visos genetinės kolekcijos) iš skirtingų Lietuvos geografinių taškų (4 pav., 4 lentelė). Pasirinkdami pavyzdžius, atsižvelgėme ir į skirtingas gamtines ekologines sąlygas, kuriomis augalai augo augavietėse. Atlikus šių 49–ių paprastosios avietės pavyzdžių genotipavimą RAPD metodu nustatyti 63 RAPD lokusai, kurių 48 buvo polimorfiniai. Tiek polimorfinių lokusų pakako genotipuoti visus 49 kolekcijos pavyzdžius.

Analizuotų DNR fragmentų dydis svyravo nuo 390 bp iki 3100 bp. Vienam pradmeniui teko vidutiniškai $10,50 \pm 2,43$ DNR juostos, o polimorfinių

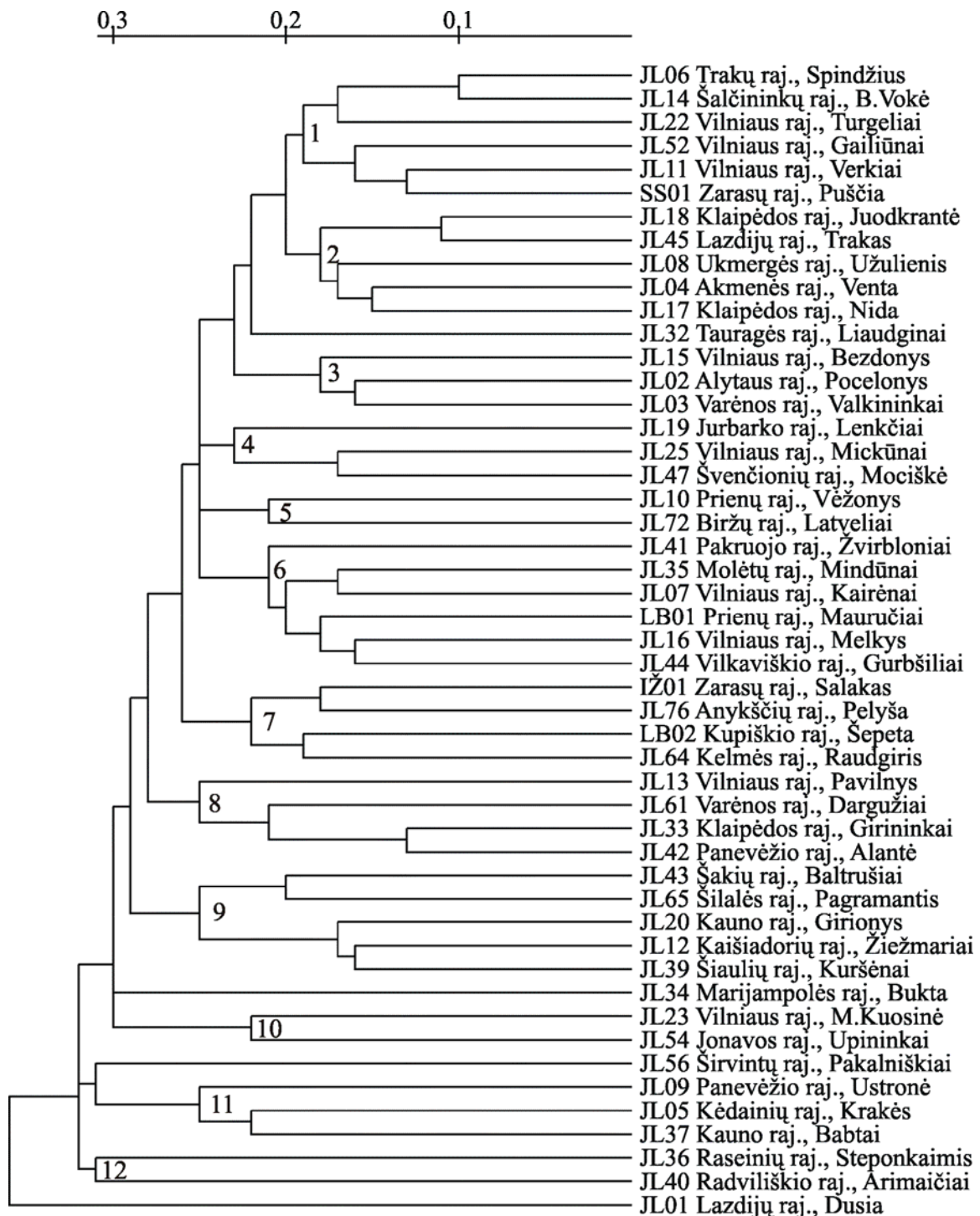
lokusų skaičius vienam pradmeniui sudarė vidutiniškai $77,83 \pm 9,15\%$ (11 lentelė). Daugiausiai (14) amplifikacijos produktų gauta su pradmeniu 270-6, mažiausiai (tik 7) – su 470-9. Daugiausia polimorfinių RAPD lokusų nustatyta naudojant pradmenis MP4 ir 470-9 (atitinkamai 89% ir 86%). Daugiausiai skirtingų RAPD fenotipų gauta su pradmenimis MP4 ir 470-8 (atitinkamai 38 ir 36). Tai geriausiai genotipavimui tinkantys pradmenys, nes su jais galima identifikuoti atitinkamai 38 ir 36 RAPD haplotipus 49–iuose tirtuose pavyzdžiuose (11 lentelė).

Kadangi vieno pradmens pagalba nustatomų molekulinų žymenų skaičiaus nepakako visiems pavyzdžiams genotipuoti, ieškojome dviejų pradmenų derinių, kurie duotų geriausius rezultatus (12 lentelė). Kaip matyti iš šios lentelės, genotipavimui naudojant keturis pradmenų derinius po du (470-8 ir 270-6, MP4 ir 270-6, MP4 ir 470-8, 470-9 ir 470-8) galima identifikuoti visus tirtus paprastosios avietės pavyzdžius.

12 lentelė. Paprastosios avietės kolekcijos pavyzdžių RAPD fenotipų skaičius, nustatytas derinant pradmenis poromis

Pradmenys	270-6	380-3	470-8	MP4	470-9
380-3	47				
470-8	49	47			
MP4	49	48	49		
470-9	48	47	49	47	
A3	45	44	46	47	44

Panaudojus 48 polimorfinius lokusus tirtų pavyzdžių RAPD fenotipams apibūdinti, tarp jų buvo apskaičiuoti Nei ir Li genetiniai atstumai. Naudojant Nei ir Li genetinių atstumų matricos duomenis (4 lentelė Priede) UPGMA metodu buvo nubraižyta dendrograma, rodanti tirtų kolekcijos pavyzdžių genetinius panašumus ir skirtumus (9 pav.).



9 pav. 49–ių paprastosios avietės genotipų sujungimas į klasterius UPGMA metodu naudojant Nei ir Li genetinių atstumų pagal polimorfinius RAPD lokusus matricą. Viršuje – genetinių atstumų skalė, 1 – 12 – klasterių numeriai

Dendrogramoje aiškiai matyti, kad visi tirti paprastosios avietės pavyzdžiai genetiškai skirtingi ir sudaro nedideles grupes. Apskaičiuoti Nei ir Li genetiniai atstumai tirtoje augalų grupėje svyravo nuo 0,10 iki 0,49 (4

lentelė Priede). Vidutinis genetinis atstumas, nustatytas tarp visų 49–ių paprastosios avietės genotipų, buvo $0,28 \pm 0,06$. Genetiškai panašiausi genotipai – JL06 (Trakų raj., Spindžius) ir JL14 (Šalčininkų raj., B.Vokė), genetinis atstumas tarp jų buvo 0,10. Genetiškai panašūs buvo ir kolekcijos pavyzdžiai JL18 (Klaipėdos raj., Juodkrantė) ir JL45 (Lazdijų raj., Trakas), genetinis atstumas tarp jų buvo 0,11. Labiausiai genetiškai skyrėsi avietės pavyzdžiai JL40 iš Radviliškio raj., Arimaičių ir JL43 iš Šakių raj., Baltrušių vietovių. Genetinis atstumas tarp šių pavyzdžių buvo 0,49. Panašus atstumas (0,48) nustatytas tarp avietės pavyzdžio JL01 iš Lazdijų raj., Dusios ir JL56 – iš Širvintų raj., Pakalniškių. Genetinis atstumas tarp kolekcijos pavyzdžių JL40 ir JL65 iš Šilalės raj., Pagramančio bei JL34 – iš Marijampolės raj., Buktos ir JL36 – iš Raseinių raj., Steponkaimio buvo 0,47. Genetiškai panašiausi kolekcijos pavyzdžiai JL06 ir JL14 skyrėsi septyniais RAPD lokusais, o mažiausiai panašūs (JL43 ir JL40) – dvidešimt penkiais.

Norėdami objektyviai įvertinti tirtų pavyzdžių genetinę divergenciją, genetinius atstumus tarp jų apskaičiavome ir kitais genetinių atstumų skaičiavimo metodais (Sokal, Michener, 1958; Link ir kt., 1995). Tarp skirtingais metodais apskaičiuotų genetinių atstumų matricų buvo patikima koreliacija ($GD_{SM}-GD_L$ $r=0,960$; $GD_{NL}-GD_{SM}$ $r=0,950$; $GD_{NL}-GD_L$ $r=0,998$; visais atvejais $p=0,001$).

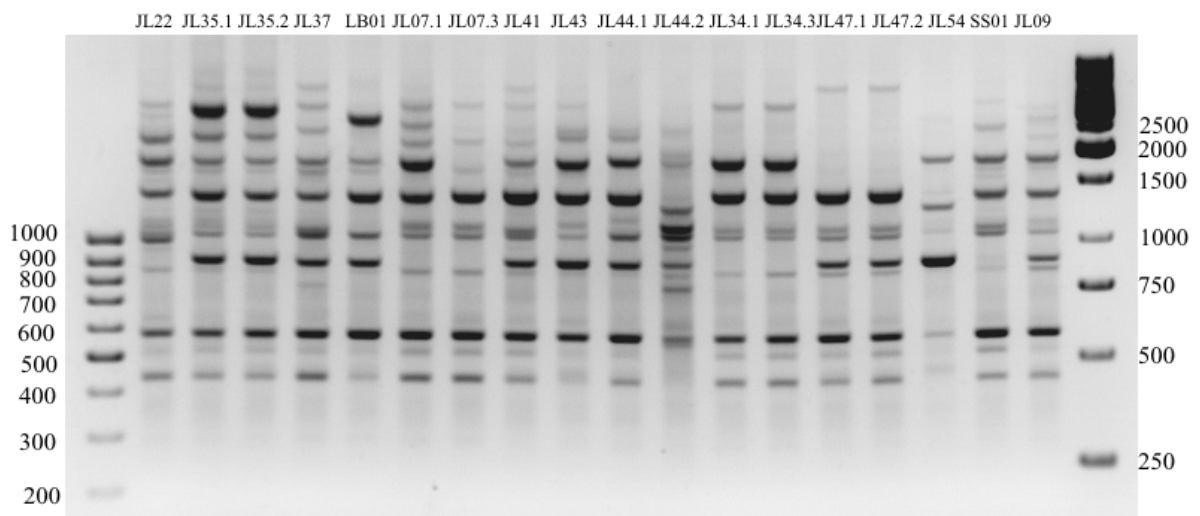
1.1.3. Paprastosios avietės kolekcijos pavyzdžių genetinio tapatumo patikrinimas

To paties pavyzdžio klonų palaikymas kolekciijoje yra susijęs su klaidomis, kurios atsiranda medžiagos paėmimo, transportavimo ar kolekcijos palaikymo metu, nes vizualiai nelengva pastebėti individų skirtumus (Staniulytė ir kt., 2004). Be to, galimi klonų genetinės medžiagos pokyčiai ir dėl aplinkos poveikio.

Šiame darbo etape RAPD metodu buvo patikrintas kai kurių paprastosios avietės klonų genetinis tapatumas. Norint užtikrinti tam tikro genotipo

pavyzdžio išlikimą naujoje augavietėje, kiekvienas paprastosios avietės pavyzdys kolekcijoje buvo auginamas trimis pakartojimais.

Tyrimui pasirinkome septyniolika kolekcijos pavyzdžių: JL07, JL34, JL35, JL37, JL41, JL43, JL44, JL47, JL54, JL56, JL61, JL64, JL65, JL72, JL76, LB01, LB02. Kiekvieno kolekcijos pavyzdžio du klonai buvo analizuojami su šešiais pradmenimis: A3, MP4, 270-6, 380-3, 470-8, 470-9. Su pradmeniu A3 buvo nustatyti dviejų pavyzdžių JL07 ir JL44 klonų skirtumai (10 pav.).



10 pav. Paprastosios avietės klonų genetinio identiškumo patikrinimas su pradmeniu A3: JL35.1 ir JL35.2, JL34.1 ir JL34.3, JL47.1 ir JL47.2 – identiški klonai; JL07.1 ir JL07.3, JL44.1 ir JL44.2 – neidentiški. Kairėje ir dešinėje – DNR fragmentų dydžių žymenys, bp

Kitų pavyzdžių klonai tarpusavyje nesiskyrė. Pastebėti skirtumai galėjo būti sąlygoti mutacijų (JL07.1 ir JL07.3 atveju) ar klaidų renkant ir dauginant medžiagą (JL44.1 ir JL44.2 atveju). Atlikus kolekcijos pavyzdžio JL04 perklonavimą tris kartus, tyrimai neparodė jokių RAPD fenotipo pokyčių.

1.2. Paprastosios avietės kolekcijos morfologijos tyrimas

Augalai į genetinę kolekciją buvo parenkami vizualiai įvertinus jų morfologinius skirtumus: stiebų aukštį, lapų, stiebų spalvą, dyglių kiekį, lapų

formą, lapalakščio krašto dantytumą ir kt.. Paprastosios avietės kolekcijoje buvo tiriami kokybiniai ir kiekybiniai morfologiniai požymiai (5 lentelė Priede, 13 lentelė). Kokybinių požymių įvertinimas pagal morfologinių požymių ir biologinių savybių klasifikatorių parodė kai kuriuos aviečių morfologinius skirtumus, tačiau daugelis požymių buvo vienodi, pvz., visų kolekcijos pavyzdžių primokanai buvo su vaško apnašu. Buvo pastebėta, kad vieno augalo tie patys morfologiniai požymiai gali skirtis, pvz., lapo standumas – prieš saulę lapai storesni, raukšlėti, o apatinėje augalo dalyje jie gležnesni, plonesni. Kai kurie kokybinių morfologinių požymių skirtumai priklausė nuo augalo vystymosi stadijos, pavyzdžiui, ontogenezės metu kito lapų spalva, primokanai keitė spalvą iš šviesiai žalios į violetinę. Tokie požymiai nebuvo vertinami. Penkta lentelė Priede leidžia susidaryti bendrą vaizdą, kaip varijuoja tam tikri kolekcijos pavyzdžių kokybiniai morfologiniai požymiai ir kaip skiriasi augalai, tačiau išsamiau buvo analizuojama 13 kiekybinių morfologinių požymių (13 lentelė). Šioje lentelėje pateikti kelis metus matuotų morfologinių požymių vidurkiai.

Morfometriniai matavimai parodė morfologinių požymių skirtumus tarp atskirų genetinės kolekcijos pavyzdžių. Aviečių lapų ilgis svyravo nuo 9,04 cm iki 14,64 cm. Ilgiausius lapus ($14,64 \pm 2,22$) išaugina kolekcijos pavyzdys JL36. Dideliais lapais pasižymi šie kolekcijos pavyzdžiai: JL08, JL10, JL72. Smulkius lapus išaugina avietės JL13, JL19, JL39, JL54. Lapų plotis svyravo nuo 8,80 cm iki 13,81 cm. Plačiausius ($13,81 \pm 2,17$) beveik apvalius lapus (ilgio ir pločio santykis artimas vienetui) išaugina kolekcijos pavyzdys JL08. Platūs lapai taip pat būdingi kolekcijos pavyzdžiui JL36. Siauresni lapai būdingi kolekcijos pavyzdžiams JL02, JL39, JL54 (1 pav. Priede, 13 lentelė).

Viršūninių lapelių ilgis tirtuose aviečių pavyzdžiuose svyravo nuo 4,73 cm iki 8,19 cm. Ilgesnius viršūninius lapelius išaugina kolekcijos pavyzdžiai JL08, JL36 bei JL72, platesnius – JL36 ir JL37. Trumpesni viršūniniai lapeliai būdingi kolekcijos pavyzdžiams JL02, JL13, o patys trumpiausi – JL54. Siauriausi viršūniniai lapeliai būdingi kolekcijos pavyzdžiams JL13, JL19,

JL39 ir JL65, plačiausi – JL36 (2 pav. Priede, 13 lentelė). Viršūninių lapelių plotis svyravo nuo 3,27 cm iki 5,49 cm.

Lapkočių ilgis svyravo nuo 1,01 cm iki 2,22 cm. Ilgiausiais lapkočiais pasižymi kolekcijos pavyzdys JL36, ilgi lapkočiai būdingi ir kolekcijos pavyzdžiams JL06, JL72 bei LB02. Trumpiausi lapkočiai būdingi kolekcijos pavyzdžiui JL13, kiek ilgesni – JL23, JL39, JL45, JL47. Lapo ašies ilgis tirtuose pavyzdžiuose svyravo nedaug – nuo 2,46 cm (JL19) iki 4,52 cm (JL06) (3 pav. Priede, 13 lentelė).

Tirtų avietės pavyzdžių florikanų aukštis svyravo nuo 0,84 m iki 1,68 m. Žemiausios avietės buvo LB01, JL03, JL13, aukščiausius florikanus išaugina kolekcijos pavyzdžiai JL33, JL36 (4 pav. Priede, 13 lentelė). Per penkis stebėjimų metus labiausiai svyravo kolekcijos pavyzdžių JL23 ir JL65 florikanų aukštis. 2006 m. JL23 išaugino vidutiniškai 1,68 m aukščio florikanus, o 2007 m. – tik 0,96 m, panašiai ir kolekcijos pavyzdys JL65 2006 m. išaugino vidutiniškai 1,66 m aukščio stiebus, o 2007 m – tik 0,82 m. 2006 m. visų kolekcijos pavyzdžių florikanų vidurkis buvo 1,36 m, 2007 m. – 1,35 m. Manome, kad tokius kai kurių kolekcijos pavyzdžių florikanų aukščio svyravimus gali sukelti kolekciijoje taikoma priežiūra (genėjimas, ravėjimas ir pan.), kai pašalinus dalį stiebų, kitamet išauginama mažiau, bet stipresnių stiebų.

13 lentelė. Paprastosios avietės kolekcijos 49–ių pavyzdžių kiekybiniai morfologiniai požymiai

Kolekcijos pavyzdžio numeris	Lapo ilgis, cm	Lapo plotis, cm	Viršūninio lapelio ilgis, cm	Viršūninio lapelio plotis, cm	Lapkočio ilgis, cm	Rachio ilgis, cm	Kaulavaisių skaičius vaisiuje	Vaisiaus svoris, g	Vaisiaus ilgis, mm	Vaisiaus skersmuo, mm	Florikano aukštis, m	Florikano skersmuo, cm	Žiedo dydis, cm
JL01	12,07±2,46	10,03±1,94	6,13±1,11	5,02±1,21	1,84±0,54	4,04±0,95	39,00±8,34	0,43±0,03	9,20±0,28	10,50±0,28	1,18±0,03	0,85±0,03	1,91±0,04
JL02	9,73±0,73	8,80±0,49	5,10±0,20	3,75±0,34	1,27±0,26	3,23±0,53	34,65±1,48	0,39±0,01	9,70±0,57	10,45±0,21	1,13±0,22	0,80±0,04	2,17±0,13
JL03	12,10±2,55	10,49±2,39	6,27±1,38	3,94±0,84	1,59±0,40	4,15±0,95	36,75±6,01	0,46±0,01	9,50±0,85	9,90±0,71	0,94±0,19	0,59±0,29	1,75±0,13
JL04	11,44±0,41	10,70±0,97	6,23±0,58	3,70±0,27	1,69±0,23	3,55±0,28	32,20±5,66	0,41±0,02	8,20±0,99	9,95±0,49	1,44±0,03	0,63±0,03	1,87±0,16
JL05	12,31±2,20	11,25±2,04	6,77±1,54	4,32±0,71	1,61±0,38	3,93±0,48	41,15±10,82	0,55±0,10	11,80±0,00	11,40±0,00	1,29±0,11	0,68±0,05	1,49±0,27
JL06	12,41±2,34	10,29±2,51	5,92±1,24	4,30±1,30	2,13±0,66	4,52±0,60	42,29±5,11	0,46±0,05	9,37±1,46	10,12±1,11	1,18±0,08	0,87±0,06	2,10±0,00
JL07	10,64±1,43	9,90±0,74	6,01±0,82	4,12±0,44	1,46±0,22	2,96±0,40	38,70±5,23	0,72±0,27	11,45±2,33	12,00±1,41	1,20±0,21	0,63±0,12	1,92±0,11
JL08	13,77±2,39	13,81±2,17	8,19±1,75	4,69±1,05	1,78±0,41	3,63±0,48	38,40±3,11	0,69±0,12	10,80±0,28	12,00±0,00	1,50±0,10	0,70±0,17	2,01±0,04
JL09	11,87±1,69	10,76±1,61	6,28±1,05	4,56±0,64	1,56±0,45	3,91±0,36	42,90±5,80	0,75±0,05	12,30±0,42	12,75±0,07	1,56±0,11	0,70±0,13	2,18±0,00
JL10	13,26±1,31	12,12±1,63	6,85±1,11	4,54±0,55	2,00±0,36	4,31±0,59	46,60±4,38	0,59±0,02	11,10±0,28	11,75±0,21	1,54±0,08	0,68±0,04	1,78±0,00
JL11	11,33±2,16	10,02±2,01	6,12±1,39	4,53±0,73	1,69±0,40	3,44±0,64	33,40±3,11	0,58±0,04	9,85±0,35	11,75±0,07	1,24±0,10	0,64±0,05	1,58±0,06
JL12	11,58±2,50	9,99±1,85	5,99±1,45	4,35±0,97	1,75±0,41	3,83±0,79	36,75±1,20	0,55±0,08	10,60±0,42	11,05±0,21	1,51±0,04	0,65±0,00	1,66±0,06
JL13	9,04±0,82	9,03±0,69	5,11±0,56	3,27±0,10	1,01±0,18	2,84±0,33	47,65±16,33	0,46±0,13	10,05±1,20	10,25±0,78	0,97±0,19	0,61±0,15	1,73±0,04
JL14	11,11±2,81	10,18±2,66	5,55±1,63	3,73±1,01	1,85±0,56	3,47±0,53	28,31±9,06	0,32±0,05	8,31±0,58	9,70±0,42	1,48±0,14	0,75±0,03	1,57±0,09
JL15	10,23±1,25	9,62±1,15	5,59±0,75	4,07±0,57	1,28±0,25	3,19±0,45	38,70±4,67	0,55±0,13	9,70±1,41	11,25±0,64	1,09±0,14	0,62±0,13	1,58±0,25
JL16	12,46±1,57	12,08±2,01	6,92±1,25	4,99±0,84	1,77±0,42	3,69±0,28	56,50±5,37	0,86±0,08	13,10±1,41	12,95±0,49	1,39±0,12	0,69±0,07	2,14±0,08
JL17	10,48±1,31	10,19±1,05	6,08±0,91	3,86±0,33	1,36±0,26	2,91±0,30	35,30±17,96	0,49±0,08	10,35±0,92	10,75±0,07	1,35±0,09	0,68±0,14	1,67±0,07
JL18	11,66±2,01	10,53±2,17	6,36±1,36	4,94±0,72	1,59±0,45	3,47±0,45	37,51±0,16	0,56±0,10	9,43±0,25	11,88±0,18	1,46±0,05	0,74±0,05	1,54±0,06
JL19	9,41±0,76	9,05±0,48	5,36±0,25	3,39±0,33	1,39±0,27	2,46±0,27	43,45±0,64	0,50±0,20	9,80±0,99	10,55±1,06	1,51±0,25	0,69±0,09	1,62±0,22
JL20	11,57±1,44	10,96±0,89	6,64±0,92	4,36±0,72	1,64±0,27	3,26±0,50	37,27±1,32	0,47±0,04	10,12±0,31	10,88±0,40	1,27±0,14	0,61±0,08	2,15±0,58
JL22	12,01±2,39	11,38±3,00	6,58±1,80	4,62±1,81	1,72±0,61	3,65±0,51	39,75±1,06	0,66±0,10	10,73±1,66	12,38±1,16	1,40±0,02	0,70±0,16	2,08±0,12
JL23	10,55±2,13	9,09±1,48	5,41±0,88	3,85±0,44	1,15±0,41	4,00±1,02	51,00±0,57	0,85±0,09	12,45±0,21	13,15±0,21	1,16±0,44	0,63±0,20	1,83±0,38
JL25	11,29±0,62	9,71±0,51	5,52±0,51	4,14±0,30	1,90±0,18	3,72±0,18	40,65±15,06	0,45±0,04	9,80±0,71	10,50±0,00	1,44±0,19	0,74±0,03	1,63±0,15
JL32	12,14±2,47	11,02±1,99	6,66±1,23	5,16±0,89	1,42±0,38	3,95±0,80	38,10±5,23	0,93±0,06	11,75±0,35	14,05±0,6	1,40±0,20	0,72±0,04	1,82±0,02
JL33	10,65±1,67	10,29±1,02	6,18±0,76	3,88±0,64	1,38±0,27	2,96±0,56	47,15±2,19	0,71±0,17	10,80±0,57	12,15±0,78	1,66±0,15	0,88±0,01	2,08±0,00
JL34	10,73±2,17	9,88±2,41	5,78±1,34	4,06±0,56	1,73±0,49	3,02±0,47	46,85±4,45	0,71±0,21	11,50±1,56	12,30±1,13	1,42±0,24	0,69±0,08	1,76±0,00
JL35	11,13±0,72	11,11±1,16	6,58±0,51	4,57±0,54	1,48±0,17	2,92±0,13	41,05±0,21	0,92±0,09	11,90±0,28	12,85±0,64	1,60±0,09	0,92±0,15	2,24±0,03

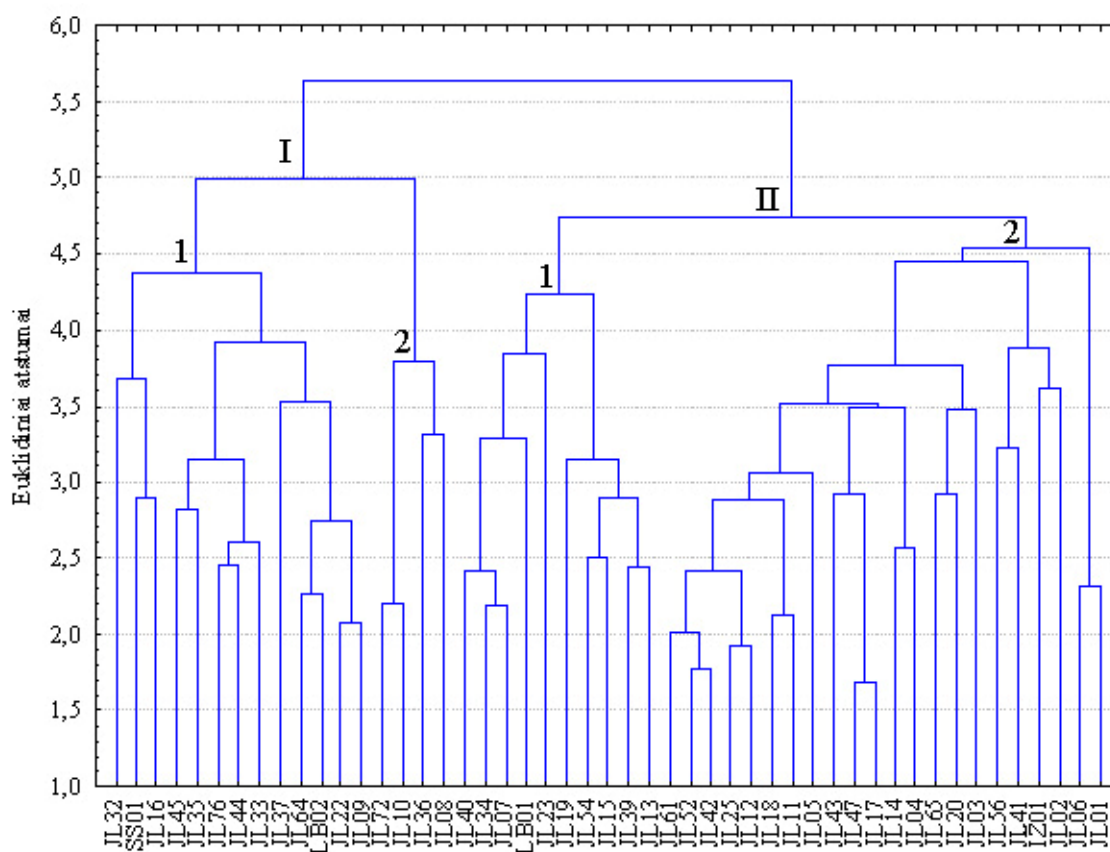
13 lentelės tęsinys

Kolekcijos pavyzdžio numeris	Lapo ilgis, cm	Lapo plotis, cm	Viršūninio lapelio ilgis, cm	Viršūninio lapelio plotis, cm	Lapkočio ilgis, cm	Rachio ilgis, cm	Kaulavaisių skaičius vaisiuje	Vaisiaus svoris, g	Vaisiaus ilgis, mm	Vaisiaus skersmuo, mm	Florikano aukštis, m	Florikano skersmuo, cm	Žiedo dydis, cm
JL36	14,64±2,22	13,23±2,11	7,90±1,90	5,49±0,81	2,22±0,56	4,51±0,47	40,35±5,30	0,70±0,03	11,70±0,28	11,70±0,72	1,68±0,10	0,73±0,05	2,06±0,29
JL37	12,30±1,72	11,74±1,68	6,73±1,05	5,27±1,11	1,92±0,60	3,54±0,34	32,50±5,23	0,60±0,04	10,20±1,70	11,30±0,71	1,22±0,03	0,78±0,07	1,95±0,04
JL39	9,23±1,04	8,94±0,77	5,41±0,60	3,50±0,60	1,18±0,38	2,65±0,53	35,95±0,07	0,47±0,16	10,39±1,18	10,56±2,20	1,21±0,08	0,60±0,11	1,88±0,20
JL40	10,68±1,00	9,78±0,62	5,77±0,55	4,09±0,14	1,62±0,15	3,16±0,23	45,50±10,47	0,62±0,04	10,35±1,06	11,35±0,07	1,22±0,21	0,78±0,07	1,93±0,00
JL41	11,62±2,21	11,31±2,42	6,56±1,39	4,35±0,97	1,45±0,49	3,34±0,20	24,00±0,99	0,35±0,02	8,35±0,07	10,00±0,28	1,37±0,15	0,75±0,13	2,17±0,00
JL42	11,24±3,45	10,73±2,68	5,86±1,19	4,09±0,90	1,51±0,64	3,66±1,41	47,27±14,62	0,49±0,20	9,99±2,13	9,75±1,91	1,39±0,07	0,68±0,11	1,65±0,00
JL43	10,94±3,11	10,52±2,57	5,97±1,77	3,59±0,67	1,22±0,49	3,56±0,91	29,05±8,98	0,47±0,02	9,35±0,07	10,95±0,78	1,56±0,11	0,82±0,21	1,88±0,03
JL44	11,24±1,15	10,79±0,83	6,18±0,78	3,68±0,44	1,62±0,33	3,30±0,30	39,35±7,71	0,77±0,06	11,95±0,64	12,25±0,07	1,52±0,07	0,78±0,02	1,88±0,17
JL45	10,61±1,01	9,91±0,91	6,23±0,57	4,57±0,70	1,14±0,21	3,00±0,33	44,30±3,39	0,88±0,31	12,40±2,26	12,45±1,48	1,55±0,02	0,77±0,16	2,04±0,01
JL47	10,67±0,93	10,83±1,07	6,43±0,74	3,65±0,59	1,16±0,08	2,91±0,15	37,40±4,24	0,56±0,05	9,40±0,00	11,30±0,00	1,38±0,05	0,73±0,08	1,65±0,02
JL52	11,50±4,62	9,68±3,25	5,81±2,14	3,86±1,14	1,59±0,88	4,09±1,71	41,74±14,08	0,44±0,10	9,53±0,19	10,11±0,16	1,36±0,10	0,65±0,04	1,64±0,15
JL54	9,11±0,60	8,85±0,59	4,73±0,24	3,60±0,18	1,20±0,14	3,01±0,37	32,98±0,82	0,65±0,14	10,03±0,45	11,46±0,93	1,24±0,08	0,67±0,17	1,61±0,04
JL56	11,29±1,26	10,44±1,01	5,71±0,49	4,32±0,71	1,54±0,43	3,96±0,44	35,50±2,55	0,50±0,07	10,05±1,48	10,30±0,14	1,31±0,24	0,79±0,19	2,35±0,12
JL61	11,85±1,00	10,51±0,65	6,49±0,67	4,05±0,11	1,29±0,22	3,97±0,23	37,80±2,12	0,46±0,11	9,60±0,14	10,30±0,85	1,30±0,03	0,66±0,02	1,65±0,12
JL64	11,50±1,17	10,71±1,09	5,78±0,72	5,07±0,48	1,95±0,30	3,70±0,45	48,30±14,14	0,64±0,07	11,65±1,91	12,45±2,05	1,51±0,14	0,83±0,14	1,94±0,00
JL65	12,43±3,39	12,20±3,23	7,07±1,91	3,46±0,80	1,57±0,49	3,58±0,93	40,90±4,67	0,53±0,06	9,55±0,07	10,60±0,71	1,23±0,39	0,69±0,22	1,92±0,00
JL72	13,33±1,55	12,10±0,61	7,58±1,35	4,00±0,57	2,05±0,19	3,76±0,57	56,05±6,01	0,65±0,12	10,95±0,07	11,40±1,13	1,55±0,18	0,72±0,10	1,65±0,00
JL76	11,67±0,69	11,36±0,22	6,66±0,27	4,10±0,19	1,41±0,03	3,48±0,46	47,61±12,00	0,63±0,12	11,15±0,92	11,45±0,78	1,48±0,13	0,85±0,16	1,86±0,00
LB01	11,08±0,73	9,98±0,74	5,93±0,60	4,13±0,38	1,60±0,06	3,54±0,35	41,70±0,71	0,74±0,05	11,20±0,14	11,75±0,07	0,84±0,06	0,60±0,16	1,72±1,01
LB02	12,00±0,51	11,25±0,45	6,28±0,44	4,77±0,22	2,07±0,07	3,53±0,14	50,52±8,74	0,73±0,24	10,95±1,34	11,74±1,36	1,49±0,08	0,71±0,17	2,04±0,32
IŽ01	10,34±0,75	9,53±0,69	5,63±0,32	4,37±0,11	1,83±0,15	2,81±0,56	27,06±2,13	0,40±0,09	8,34±0,48	9,13±0,35	1,12±0,14	0,70±0,16	2,03±0,60
SS01	12,69±2,67	12,27±1,91	7,13±1,28	4,86±0,80	1,50±0,40	3,86±1,04	57,75±7,57	1,01±0,00	12,90±0,57	13,65±0,07	1,43±0,21	0,81±0,19	1,73±0,00
Vidurkis	11,41±1,70	10,59±1,49	6,20±1,00	4,24±0,64	1,58±0,35	3,51±0,58	40,43±7,14	0,60±0,16	10,48±1,21	11,33±1,10	1,35±0,19	0,72±0,08	1,86±0,22

Avietės kolekcijos pavyzdžių vieno vaisiaus svoris svyravo nuo 0,32 g iki 1,01 g. Mažiausi vaisiai būdingi JL14, JL41, JL02, IŽ01 kolekcijos pavyzdžiams, didžiausi – SS01, JL16, JL23, JL32, JL35 (13 lentelė).

Kolekcijos avietė JL36 iš Raseinių raj., Steponkaimio labiausiai išsiskyrė savo morfologiniais požymiais iš tirtų kolekcijos pavyzdžių (13 lentelė).

Norėdami įvertinti morfologinę įvairovę tirtuose paprastosios avietės kolekcijos pavyzdžiuose, standartizavome kiekybinius morfologinius duomenis ir sudarėme individų euklidinių atstumų matricą. Panaudojus euklidinių atstumų duomenis, UPGMA metodu buvo nubraižytas euklidinių atstumų medis (11 pav.).



11 pav. Euklidinių atstumų, apskaičiuotų remiantis morfologiniais paprastosios avietės kolekcijos pavyzdžių skirtumais tarp individų, medis, sudarytas UPGMA metodu. I, II – pagrindinės grupės, 1, 2 – pagrindiniai pogrupiai

Vienuoliktame paveiksle matyti, kad išsiskiria dvi pagrindinės pavyzdžių grupės, kuriose kolekcijos avietės grupuojasi pagal panašius

morfologinius požymius. Skirtumai tarp abiejų grupių atskirų morfologinių požymių buvo patikimi, išskyrus rachio ilgį (14 lentelė).

14 lentelė. Dviejų morfologiškai skirtingų paprastosios avietės kolekcijos pavyzdžių grupių palyginimas

Morfologinis požymis	I grupė	II grupė	Morfologinis požymis	I grupė	II grupė
Lapo ilgio vid.	12,19±1,09	11,00±0,95	Vaisiaus svoris	0,75±0,13	0,52±0,12
	t = 3,95, df = 47, p<0,001			t = 6,14, df = 47, p<0,001	
Lapo pločio vid.	11,52±1,01	10,11±0,81	Vaisiaus ilgis	11,55±0,81	9,95±1,01
	t = 5,34, df = 47, p<0,001			t = 5,60, df = 47, p<0,001	
Viršūninio lapelio ilgio vid.	6,75±0,64	5,94±0,53	Vaisiaus skersmuo	12,31±0,77	10,86±0,85
	t = 4,70, df = 47, p<0,001			t = 5,85, df = 47, p<0,001	
Viršūninio lapelio pločio vid.	4,64±0,50	4,02±0,41	Florikano aukštis	1,50±0,11	1,28±0,17
	t = 4,60, df = 47, p<0,001			t = 4,71, df = 47, p<0,001	
Lapkočio ilgio vid.	1,70±0,30	1,52±0,26	Florikano skersmuo	0,76±0,07	0,70±0,08
	t = 2,27, df = 47, p<0,030			t = 2,69, df = 47, p<0,01	
Rachio ilgis	3,63±0,43	3,44±0,49	Žiedo dydis	1,97±0,16	1,81±0,22
	t = 1,34, df = 47, p<0,190			t = 2,72, df = 47, p<0,01	
Kaulavaisių skaičius vaisiuje	44,88±6,82	38,09±6,21			
	t = 3,52, df = 47, p<0,001				

Pirmąją (I) didelę grupę sudaro avietės su santykinai didesniais požymiais: stambesniais lapais ir viršūniniais lapeliais, didesniu kaulavaisių skaičiumi vaisiuje, didesniais vaisiais, aukštesniais florikanais, didesniais žiedais. Antrąją (II) didelę grupę sudaro avietės su mažesnėmis morfologinių požymių reikšmėmis.

Pirmojoje (I) grupėje išsiskiria du dideli pogrupiai – 1 ir 2. Pirmasis (1) pogrupis jungia dar kelis žemesnius antros eilės pogrupius, iš kurių pirmajam priklauso kolekcijos pavyzdžiai JL32, SS01, JL16, kurie turi didelius lapus, ilgus rachius, tačiau trumpesnius lapkočius ir mažesnius žiedus, o antrasis – skykla į dar du smulkesnius trečios eilės pogrupius. Pirmasis skiriasi nuo antrojo, nes jungia kolekcijos pavyzdžius JL45, JL35, JL76, JL44, JL33, kurių stambūs stiebai, žiedai ir uogos, tačiau lapai yra trumpakočiai, jų trumpesni rachiai. Į antrąjį (2) pogrupį pakliūva kolekcijos pavyzdžiai JL72,

JL10, JL36, JL08 su dideliais lapais, ilgais lapkočiais ir rachiis, dideliais vaisiais ir aukštais, bet plonais florikanais.

Antroji (II) grupė taip pat skyla į du didelius pogrupius. Pirmojo (1) pogrupio avietėms būdingi mažesni lapai ir viršūniniai lapeliai, ploni florikanai ir smulkūs žiedai. Antrasis (2) jungia avietes, užauginančias smulkius vaisius. Pirmajame (1) pogrupyje galima išskirti du antros eilės pogrupius, kurių pirmasis skiriasi nuo antrojo tuo, kad jungia stambesnius vaisius, ilgesnius lapkočius turinčius kolekcijos pavyzdžius JL40, JL34, JL07, LB01, JL23, antrasis jungia mažiausiomis morfologinių požymių reikšmėmis pasižyminčius kolekcijos pavyzdžius – JL19, JL54, JL15, JL39, JL13. Antrasis antros eilės pogrupis skyla į du trečios eilės pogrupius, kurių vienas jungia avietes JL01 ir JL06, kurių lapai yra ilgi, tačiau siauri, o viršūniniai lapeliai trumpi, bet platūs, lapkočiai ilgi, žiedai dideli, o vaisiai smulkūs, florikanai žemi, tačiau jų skersmuo didelis. Antrasis trečios eilės pogrupis skyla į du ketvirtos eilės pogrupius. Vienas jų jungia kolekcijos pavyzdžius JL56, JL41, IŽ01 ir JL02, kuriems būdingi nedideli lapai, trumpi ir platūs viršūniniai lapeliai, dideli žiedai, smulkūs vaisiai, žemi, tačiau stamboki florikanai. Kitas vėl skyla į du penktos eilės pogrupius, iš kurių viename yra kolekcijos pavyzdžiai JL65, JL20, JL03 su stambesniais lapais ir viršūniniais lapeliais, tačiau žemais ir plonais florikanais. Kitas jungia avietes su aukštesniais stiebais, mažesniais žiedais ir skyla dar į du pogrupius. Vienam jų priklauso kolekcijos pavyzdžiai JL43, JL47, JL17, JL14, JL04 su smulkiais lapais, smulkiais vaisiais ir aukštais florikanais.

Pagal morfologinių požymių reikšmes sudarytoje euklidinių atstumų matricoje (6 lentelė Priede) artimiausi yra kolekcijos pavyzdžiai JL17 (Klaipėdos raj., Nida) ir JL47 (Švenčionių raj., Mociškė) bei JL42 (Panevėžio raj., Alantė) ir JL52 (Vilniaus raj., Gailiūnai). Didžiausiais morfologiniais skirtumais pasižymi kolekcijos pavyzdžiai JL13 (Vilniaus raj., Pavilniai) ir JL36 (Raseinių raj., Steponkaimis), JL54 (Jonavos raj., Upininkai) ir JL36, JL39 (Šiaulių raj., Kuršėnai) ir JL36 bei JL19 (Jurbarko raj., Lenkčiai) ir JL36

(11 pav.). Kolekcijos pavyzdys JL36 iš Raseinių raj., Steponkaimio savo morfologiniais požymiais labiausiai išsiskiria iš kitų kolekcijos aviečių.

Buvo apskaičiuotos tirtų kolekcijos pavyzdžių morfologinių požymių tarpusavio Pearson'o koreliacijos (15 lentelė). Geriausiai koreliavo tarpusavyje susiję morfologiniai požymiai, pavyzdžiui, lapo ilgis ir plotis ($r=0,884$, $p=0,001$), vaisiaus skersmuo ir svoris ($r=0,930$, $p=0,001$).

1.2.1. Augavietės edafinių savybių įtaka morfologiniams požymiams ir RAPD polimorfizmui

Atrenkant augalus į genetinę kolekciją, buvo imamas ir augalų augavietės dirvožemio mėginys, kuris buvo ištirtas Botanikos instituto Cheminės analizės laboratorijoje. Buvo nustatyti šie dirvožemio rodikliai: rūgštumas, humuso, azoto, fosforo ir kalio kiekiai (1 lentelė Priede). Pastebėtos nedidelės, bet patikimos koreliacijos tarp augavietės dirvožemio savybių ir kai kurių morfologinių požymių (16 lentelė).

Statistiškai patikima koreliacija nustatyta tarp lapo ilgio ir azoto kiekio dirvožemyje ($r=0,289$, $p=0,044$), tarp lapo pločio ir humuso bei azoto kiekio dirvožemyje (atitinkamai, $r=0,283$, $p=0,049$ ir $r=0,327$, $p=0,022$) (16 lentelė).

15 lentelė. Paprastosios avietės 49–ių genotipų morfologinių požymių tarpusavio Pearson‘o koreliacijos

Požymis	Lapo ilgis	Lapo plotis	Viršūninio lapelio ilgis	Viršūninio lapelio plotis	Lapkočio ilgis	Rachio ilgis	Kaulavaisių skaičius vaisiuje	Vaisiaus svoris	Vaisiaus ilgis	Vaisiaus skersmuo	Florikano aukštis	Florikano skersmuo
Žiedo dydis	0,154 p=0,29	0,237 p=0,10	0,187 p=0,20	0,305 p=0,03	0,134 p=0,36	0,036 p=0,80	-0,015 p=0,92	0,183 p=0,21	0,180 p=0,22	0,136 p=0,35	0,140 p=0,34	0,415 p=0,001
Florikano skersmuo	0,161 p=0,27	0,196 p=0,18	0,132 p=0,37	0,277 p=0,05	0,167 p=0,25	0,066 p=0,65	0,086 p=0,56	0,172 p=0,24	0,086 p=0,55	0,177 p=0,22	0,455 p=0,001	
Florikano aukštis	0,355 p=0,01	0,448 p=0,001	0,412 p=0,001	0,258 p=0,07	0,249 p=0,09	0,071 p=0,63	0,174 p=0,23	0,291 p=0,04	0,283 p=0,05	0,340 p=0,02		
Vaisiaus skersmuo	0,229 p=0,11	0,309 p=0,03	0,336 p=0,02	0,463 p=0,001	-0,041 p=0,78	0,072 p=0,62	0,526 p=0,001	0,930 p=0,001	0,851 p=0,001			
Vaisiaus ilgis	0,239 p=0,10	0,294 p=0,04	0,314 p=0,03	0,383 p=0,01	0,002 p=0,99	0,130 p=0,38	0,701 p=0,001	0,883 p=0,001				
Vaisiaus svoris	0,224 p=0,12	0,319 p=0,03	0,348 p=0,01	0,419 p=0,001	-0,035 p=0,81	0,041 p=0,78	0,597 p=0,001					
Kaulavaisių skaičius vaisiuje	0,209 p=0,15	0,212 p=0,15	0,201 p=0,17	0,160 p=0,27	0,103 p=0,48	0,177 p=0,22						
Rachio ilgis	0,763 p=0,001	0,457 p=0,001	0,412 p=0,001	0,465 p=0,001	0,530 p=0,001							
Lapkočio ilgis	0,702 p=0,001	0,504 p=0,001	0,434 p=0,001	0,559 p=0,001								
Viršūninio lapelio plotis	0,646 p=0,001	0,542 p=0,001	0,534 p=0,001									
Viršūninio lapelio ilgis	0,875 p=0,001	0,946 p=0,001										
Lapo plotis	0,884 p=0,001											

paryškintos statistiškai patikimos koreliacijos, $p \leq 0,05$

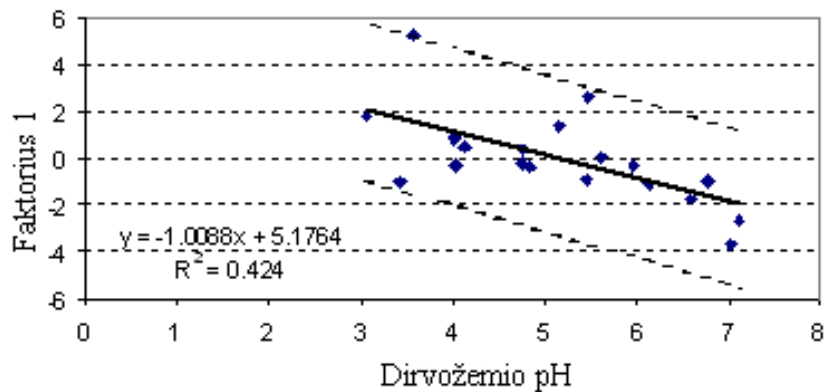
16 lentelė. Paprastosios avietės 49–ių genotipų morfologinių požymių Spearman‘o koreliacijos su radaviečių dirvožemio rodikliais

Dirvožemio rodiklis Morfologinis požymis	pH	Humusas	Azotas	Fosforas	Kalis
Lapo ilgis	0,112 p=0,443	0,153 p=0,293	0,289 p=0,044	-0,203 p=0,163	0,145 p=0,320
Lapo plotis	0,082 p=0,574	0,283 p=0,049	0,327 p=0,022	-0,158 p=0,279	0,121 p=0,407
Viršūninio lapelio ilgis	0,040 p=0,784	0,184 p=0,206	0,263 p=0,067	-0,173 p=0,234	0,079 p=0,589
Viršūninio lapelio plotis	0,140 p=0,336	-0,028 p=0,851	-0,039 p=0,792	-0,098 p=0,504	-0,050 p=0,732
Lapkočio ilgis	-0,011 p=0,940	0,212 p=0,143	0,217 p=0,134	-0,010 p=0,946	0,244 p=0,091
Rachio ilgis	0,058 p=0,690	0,004 p=0,976	0,148 p=0,311	-0,196 p=0,178	0,123 p=0,400
Kaulavaisių skaičius vaisiuje	-0,132 p=0,365	0,028 p=0,849	0,044 p=0,764	-0,208 p=0,152	0,111 p=0,447
Vaisiaus svoris	-0,107 p=0,464	0,054 p=0,711	0,049 p=0,737	-0,141 p=0,334	0,131 p=0,369
Vaisiaus ilgis	-0,143 p=0,326	0,088 p=0,547	0,057 p=0,696	-0,184 p=0,206	0,097 p=0,508
Vaisiaus plotis	-0,136 p=0,351	-0,035 p=0,810	-0,025 p=0,863	-0,268 p=0,063	-0,012 p=0,935
Florikano aukštis	-0,047 p=0,751	0,106 p=0,467	0,189 p=0,194	-0,095 p=0,516	0,111 p=0,448
Florikano skersmuo	0,238 p=0,100	0,087 p=0,551	0,119 p=0,414	0,005 p=0,972	0,035 p=0,810
Žiedo skersmuo	0,046 p=0,752	-0,046 p=0,756	-0,167 p=0,253	-0,161 p=0,268	-0,056 p=0,701

paryškintos statistiškai patikimos koreliacijos, $p \leq 0,05$

Savo darbe tyrėme ryšį tarp augavietės dirvožemio sudėties (pH, humuso kiekio, azoto, fosforo ir kalio kiekio) ir RAPD žymenų įvairovės dvidešimtyje geriausiai mūsų ištirtų paprastosios avietės kolekcijos pavyzdžių (4 lentelė). Principinių komponentų metodu buvo tiriamas 230–ies polimorfinių RAPD lokusų, gautų su 36 pradmenimis, pasiskirstymas augalų RAPD fenotipuose priklausomai nuo dirvožemio savybių. Buvo nustatyti 22 RAPD žymenys, kurie turėjo įtakos koreliacijai tarp RAPD fenotipų pasiskirstymo ir dirvožemio pH. Patikima koreliacija (esant 1% reikšmingumo

lygmeniui) buvo nustatyta tarp tirtų pavyzdžių RAPD fenotipų faktorinės analizės rezultatų ir dirvožemio rūgštumo ($r=-0,65$) (12 pav., 17 lentelė).



12 pav. Regresijos kreivė, apibūdinanti dvidešimties paprastosios avietės kolekcijos pavyzdžių RAPD fenotipų faktorinės analizės rezultatų priklausomybę nuo augavietės dirvožemio rūgštumo

17 lentelė. Pearson'o koreliacijos koeficientai, nustatyti tarp 230–ies paprastosios avietės individų polimorfinių RAPD lokusų pasiskirstymo faktorinės analizės rezultatų ir augavietės dirvožemio savybių

Kintamasis	pH	Humusas	Azotas	Fosforas	Kalis
Faktorius 1	-0,65	-0,03	-0,01	-0,35	-0,18
Faktorius 2	-0,26	-0,03	-0,03	0,22	-0,07
Faktorius 3	-0,30	-0,05	-0,01	-0,08	-0,05

paryškinta statistiškai patikima koreliacija, $p \leq 0,01$

Atlikus STEPDISC procedūrą, nustatyti 9 RAPD lokusai (A4₄₇₀, A4₅₃₀, A7₇₃₀, B6₁₀₀₀, MP2₆₀₅, MP4₁₀₁₅, 380-3₁₃₉₀, 380-3₁₅₅₀, 470-7₈₀₀), kurie turėjo didžiausios įtakos tirtų kolekcijos pavyzdžių susiskirstymui į grupes pagal augavietės dirvožemio rūgštumą.

Kitame darbo etape buvo tiriama, ar galima nustatyti panašią ekologinių ir genetinių veiksnių priklausomybę naudojant 48 polimorfinius RAPD lokusus didesnėje, 49–ių kolekcijos pavyzdžių, grupėje. Buvo vertinamas dirvožemio savybių poveikis tirtų augalų genetinei įvairovei, tačiau patikimos priklausomybės nenustatyta (18 lentelė).

18 lentelė. Pearson'o koreliacijos koeficientai, nustatyti tarp 48-ių paprastosios avietės polimorfinių RAPD lokusų pasiskirstymo faktorinės analizės rezultatų ir augavietės dirvožemio savybių

Kintamasis	pH	Humusas	Azotas	Fosforas	Kalis
Faktorius 1	-0,043 p=0,765	-0,099 p=0,493	-0,057 p=0,692	0,048 p=0,740	-0,038 p=0,795
Faktorius 2	0,011 p=0,457	-0,039 p=0,786	0,078 p=0,595	0,065 p=0,654	0,027 p=0,851
Faktorius 3	-0,015 p=0,919	0,184 p=0,201	-0,059 p=0,685	-0,140 p=0,333	-0,227 p=0,112

Nepaisant to, buvo nustatyta septynių RAPD lokusų pasiskirstymo tirtuose augaluose priklausomybė nuo augavietės dirvožemio cheminių savybių (rūgštumo, fosforo ir kalio kiekio) (19 lentelė).

Lokuso 270-6₁₄₀₀ pasiskirstymas priklausė net nuo trijų dirvožemio rodiklių: pH, fosforo ir kalio kiekio. Neaptikta ryšio tarp RAPD lokusų pasiskirstymo ir azoto bei humuso kiekio dirvožemyje.

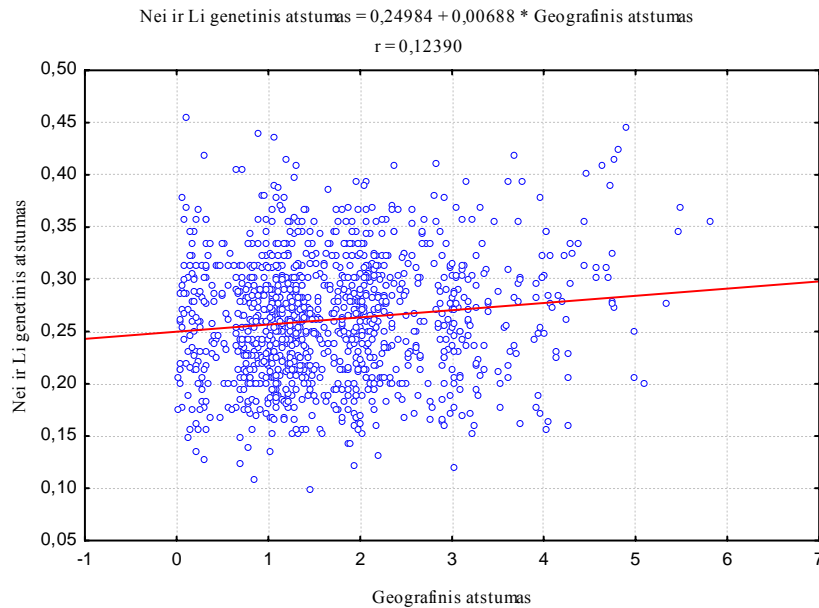
19 lentelė. Paprastosios avietės genotipų kai kurių RAPD lokusų priklausomybė nuo dirvožemio savybių

Dirvožemio rodiklis Lokusas	pH	Fosforas	Kalis
270-6 ₁₄₀₀	*	*	*
380-3 ₄₉₀	*		
470-8 ₉₂₀			**
470-8 ₂₅₀₀		*	*
MP4 ₈₅₀		*	
MP4 ₈₂₀		*	
470-9 ₂₀₀₀			*

parodytos tik statistiškai patikimos koreliacijos – * $p \leq 0,05$, ** $p < 0,01$

1.3. Radavietės geografinės padėties įtaka paprastosios avietės genetinei ir morfologinei įvairovei

Paprastosios avietės kolekciją VU Botanikos sode sudaro augalai iš skirtingų Lietuvos regionų. Iš 49–ių tirtų kolekcijos pavyzdžių mažiausi geografiniai atstumai buvo tarp kolekcijos pavyzdžių JL25 (Vilniaus raj., Mickūnai) ir JL52 (Vilniaus raj., Gailiūnai) – 2,14 km ir tarp kolekcijos pavyzdžių JL07 (Vilniaus raj., Kairėnai) ir JL13 (Vilniaus raj., Pavilnys) – 4,91 km. Didžiausi geografiniai atstumai buvo tarp kolekcijos pavyzdžių JL17 (Klaipėdos raj., Nida) ir JL47 (Švenčionių raj., Mociškė) – 361,77 km, tarp JL18 (Klaipėdos raj., Juodkrantė) ir JL47 – 353,39 km, tarp JL33 (Klaipėdos raj., Girininkai) ir JL47 – 329,09 km (7 lentelė Priede). Palyginus visų tirtų individų RAPD fenotipus (iš viso 1176 porų) tarpusavyje, buvo apskaičiuoti Nei ir Li genetiniai atstumai tarp jų. Remiantis šiais atstumais, UPGMA metodu buvo nubraižyta dendrograma, kuri atspindi tirtų paprastosios avietės kolekcijos pavyzdžių genetinės divergencijos laipsnį (9 pav.). Tirti genotipai grupuojasi į dvylika nedidelių sankaujų. Tai rodo, kad tirti pavyzdžiai yra genetiškai skirtingi ir grupuojasi tik į nedideles grupes po kelis genotipus. Kai kurios sankaujos sudarytos iš geografiškai artimose vietovėse surinktų individų, pvz., pirmąją (1) sankaują sudaro šeši individai, iš kurių net penki surinkti Vilniaus apylinkėse, antroji (2) sankauja heterogeniškesnė, tačiau į ją pakliūva du individai iš Nidos ir Juodkrantės, trečiąją (3) sankaują sudaro individai iš pietų Lietuvos rajonų, septintoji (7) sankauja jungia augalus iš šiaurės rytų rajonų, išskyrus avietę iš Kelmės raj., devintajai (9) sankaujai priklauso kolekcijos pavyzdžiai iš vidurio ir vakarų Lietuvos, vienuoliktajai (11) priklauso vidurio Lietuvos regiono avietės kolekcijos pavyzdžiai iš Kėdainių, Kauno ir Panevėžio rajonų. Nepaisant to, kad dendrogramoje regioninis specifiškumas stipriai neišreikštas, tam tikro geografinio grupavimosi pačiose sankaujose paneigti negalima. Koreliacijos tarp geografinių euklidinių ir genetinių atstumų nenustatyta ($r=0,124$, $p=0,001$) (13 pav.).



13 pav. Nei ir Li genetinių ir geografinių atstumų tarpusavio priklausomybė

Taip pat nenustatyta koreliacijos tarp morfologinių euklidinių ir geografinių euklidinių atstumų ($r=0,100$, $p=0,01$).

SAS GENMOD metodu buvo įvertinta RAPD lokusų alelių pasiskirstymo ir geografinės padėties priklausomybė. Tyrimo rezultatai, pateikti 20 lentelėje rodo, kad paprastosios avietės genetinei įvairovei būdingas tam tikras vakarų–rytų gradientas.

Paprastosios avietės kolekcijos pavyzdžių radaviečių aukštis virš jūros lygio svyravo nuo 3 m (JL17, Klaipėdos raj., Nida) iki 262 m (JL23, Vilniaus raj., Mažoji Kuosinė). Paskaičiavus koreliacijas tarp altitudės ir morfologinių požymių, gauta statistiškai patikima neigiama koreliacija tarp florikano aukščio ir radavietės aukščio virš jūros lygio ($r=-0,304$, $p=0,03$).

20 lentelė. Paprastosios avietės kolekcijos pavyzdžių geografinės padėties ir nustatytų RAPD lokusų priklausomybė

Lokusas	Platuma, N	Ilguma, E
270-6 ₁₀₅₀		*
270-6 ₁₁₀₀	*	***
270-6 ₁₂₀₀		*
380-3 ₉₅₀		*
470-8 ₇₅₀		**
470-8 ₉₂₀		*
MP4 ₈₂₀		*
A3 ₈₉₀	**	
A3 ₉₀₀	*	

* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001

1.4. Molekulinių (RAPD) žymenų ir morfologinių požymių priklausomybės tyrimas paprastosios avietės kolekcijos pavyzdžiuose

Literatūroje yra duomenų, kad RAPD metodu galima aptikti priklausomybę tarp molekulinų ir morfologinių žymenų (Morimoto ir kt., 2006). Mūsų tyrime nebuvo gauta koreliacijos tarp avietės kolekcijos pavyzdžiuose nustatytų Nei ir Li genetinių ir morfologinių požymių euklidinių atstumų ($r=0,073$, $p=0,01$). SAS GENMOD metodu buvo nustatyta priklausomybė tarp RAPD lokusų alelių pasiskirstymo ir morfologinių požymių skaitinių reikšmių (21 lentelė).

Kai kurie RAPD lokusai (380-3₄₉₀, 470-8₉₂₀, MP4₁₅₀₀, A3₈₉₀) rodė patikimą koreliaciją net su keliais morfologiniais požymiais. Lapkočio ilgio skaitinė reikšmė buvo susijusi su keturių RAPD lokusų (A3₈₉₀, MP4₁₅₀₀, 380-3₄₉₀ ir 380-3₂₁₀₀) variavimu, viršūninio lapo ilgio – su trijų: MP4₁₅₀₀, 270-6₁₁₀₀, 380-3₉₅₀.

21 lentelė. Paprastosios avietės kolekcijos pavyzdžių morfologinių požymių ir nustatytų RAPD lokusų priklausomybė

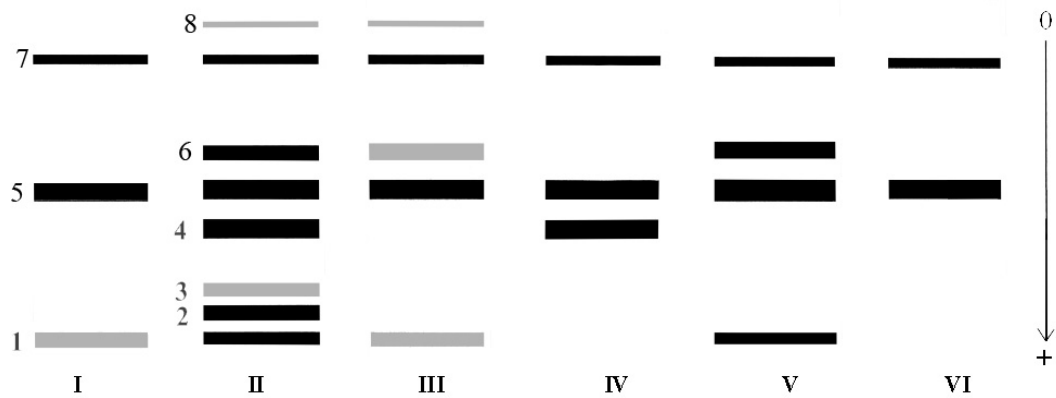
Morfologinis požymis RAPD lokusas	Lapo ilgis	Lapo plotis	Viršūninio lapo ilgis	Viršūninio lapo plotis	Lapkočio ilgis	Rachio ilgis	Kaulavaisių skaičius vaisiuje	Vaisiaus svoris	Vaisiaus ilgis	Vaisiaus skersmuo	Florikano aukštis	Žiedo skersmuo
A3 ₈₉₀					*	*			*	*		
A3 ₉₀₀	*	*										
MP4 ₇₅₀							*					
MP4 ₁₂₀₀											*	
MP4 ₁₅₀₀			*		*	*						
270-6 ₁₁₀₀			*									
380-3 ₄₉₀	*				*			*				
380-3 ₆₅₀		*										
380-3 ₉₅₀			*									
380-3 ₂₁₀₀					*							
470-8 ₉₂₀				*			*	*			*	*
470-8 ₁₁₉₀				*								

* pažymėtos statistiškai patikimos koreliacijos, $p < 0,05$

1.5. Superoksido dismutazės polimorfizmo tyrimai

Superoksido dismutazės (SOD) polimorfizmo tyrimai atlikti dvidešimtyje paprastosios avietės kolekcijos pavyzdžių, kurių RAPD analizės rezultatai aprašyti aukščiau (4 lentelė). Atskirų avietės kolekcijos pavyzdžių elektroforegramose buvo stebima iki 8 izoformų, kurias pagal judėjimo pobūdį poliakrilamido gelyje galima suskirstyti į 6 tipus (14 pav.).

Pirmojo tipo (I) SOD izofermentinis spektras būdingas kolekcijos pavyzdžiams JL01, JL04, SS01, JL06; antrojo (II) tipo spektras – JL05; trečiojo (III) – JL09; ketvirtojo (IV) – JL03, JL08, JL11, JL12; penktojo (V) – JL14, JL10; šeštojo (VI) – JL02, JL15, JL16, JL18, JL22, JL36, JL45, JL52.



14 pav. Paprastosios avietės genetinės kolekcijos pavyzdžių SOD polimorfizmas. 1–8 – juostų numeriai nuo greičiausiai judančios gelyje, 0 → + – srovės kryptis gelyje

Mažiausiai izoformų aptikta šeštąjį (VI) SOD izofermentų tipą turinčiuose pavyzdžiuose, kuriems būdinga ir tai, kad jų augaviečių dirvožemio rūgštumas buvo didžiausias tirtų pavyzdžių grupėje (pH svyravo nuo 3,05 iki 4,85). Panašus SOD izoformų spektras būdingas ir ketvirtajam (IV) tipui, kuriam priklausė šiek tiek šarmingesnėse augavietėse augusios avietės (pH svyravo nuo 5,15 iki 5,97). Ketvirtajam (IV) bei šeštajam (VI) tipui būdinga ir tai, kad išnyksta greičiausiai migruojanti pirmoji (1) izoforma. Penktasis (V) tipas būdingas pavyzdžiams iš augaviečių, kurių dirvožemio pH 4,01 ir 4,75. Šiuose pavyzdžiuose papildomai atsiranda šeštoji (6) izoforma. Iš visų ištirtų paprastosios avietės kolekcijos pavyzdžių išsiskiria JL05 iš Kėdainių raj., Krakių. Šio augalo elektroforegamoje išryškėjo daugiausia izoformų – aštuonios.

2. Paprastosios avietės populiacijų tyrimai

2.1. Paprastosios avietės populiacijų individų genetinės įvairovės ir panašumo tyrimas

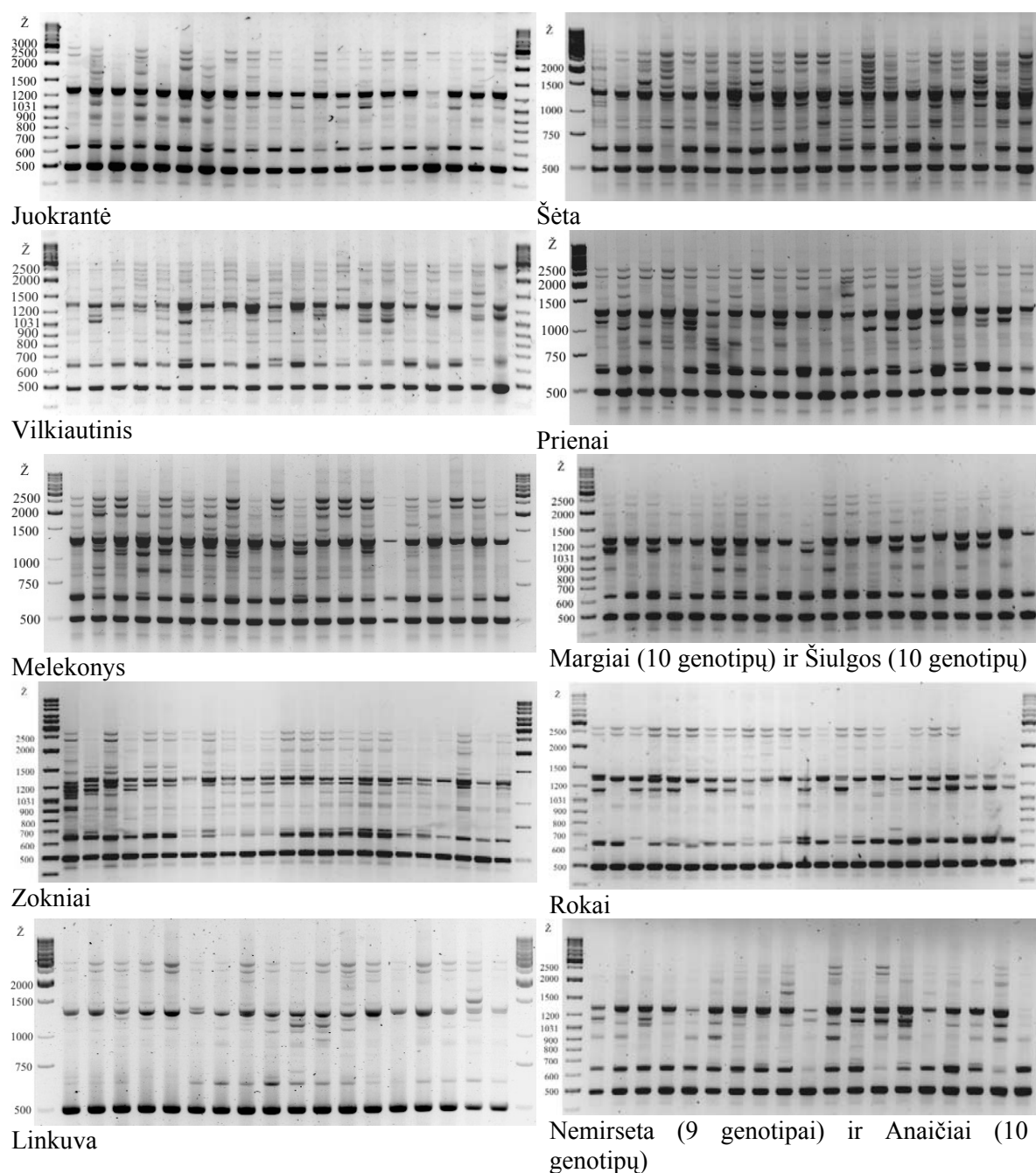
Paprastosios avietės populiacijų RAPD analizė pradėta naudojant 13 oligonukleotidinių pradmenų: 170-2, 170-4, 270-1, 270-5, 270-6, 380-3, 380-6, 380-9, 470-8, 470-9, A3, MP4 ir P1. Tyrimo metu buvo atsisakyta penkių pradmenų dėl prastos RAPD juostų kokybės arba blogo atsikartojamumo pakartotiniuose bandymuose, todėl galutinė analizė atlikta su aštuoniais pradmenimis: P1, MP4, 270-1, 270-6, 380-3, 380-6, 380-9 ir 470-8 (22 lentelė). Buvo ištirta devyniolika Lietuvos paprastosios avietės populiacijų, iš viso – 315 individų.

22 lentelė. Paprastosios avietės populiacijų RAPD analizės rezultatai, gauti su aštuoniais oligonukleotidiniais pradmenimis

Pradmuo	Bendras juostų skaičius	Polimorfinių juostų skaičius	Juostų dydis, bp	Polimorfizmas, %
P1	19	19	420–2800	100
MP4	13	12	520–2500	92,31
270-1	12	12	490–1100	100
270-6	16	13	500–2900	81,25
380-3	15	11	390–2100	73,33
380-6	13	10	600–1800	76,92
380-9	12	7	520–2230	58,33
470-8	13	12	390–3100	92,31
Iš viso	113	96		
Vidurkis	14,13±2,42	12,00±3,38		84,31±14,54

Su aštuoniais oligonukleotidiniais pradmenimis gauta 113 RAPD žymenų, iš kurių 96 buvo polimorfiški tirtose populiacijose, taigi polimorfizmas buvo 84,31%. 17 RAPD juostų buvo monomorfinės (95% dažniu) visuose tirtuose individuose, ir tai leidžia daryti prielaidą, kad šie monomorfiniai lokusai (MP4₉₅₀, 270-6₅₀₀, 270-6₆₄₀, 270-6₁₃₀₀, 380-3₃₉₀, 380-

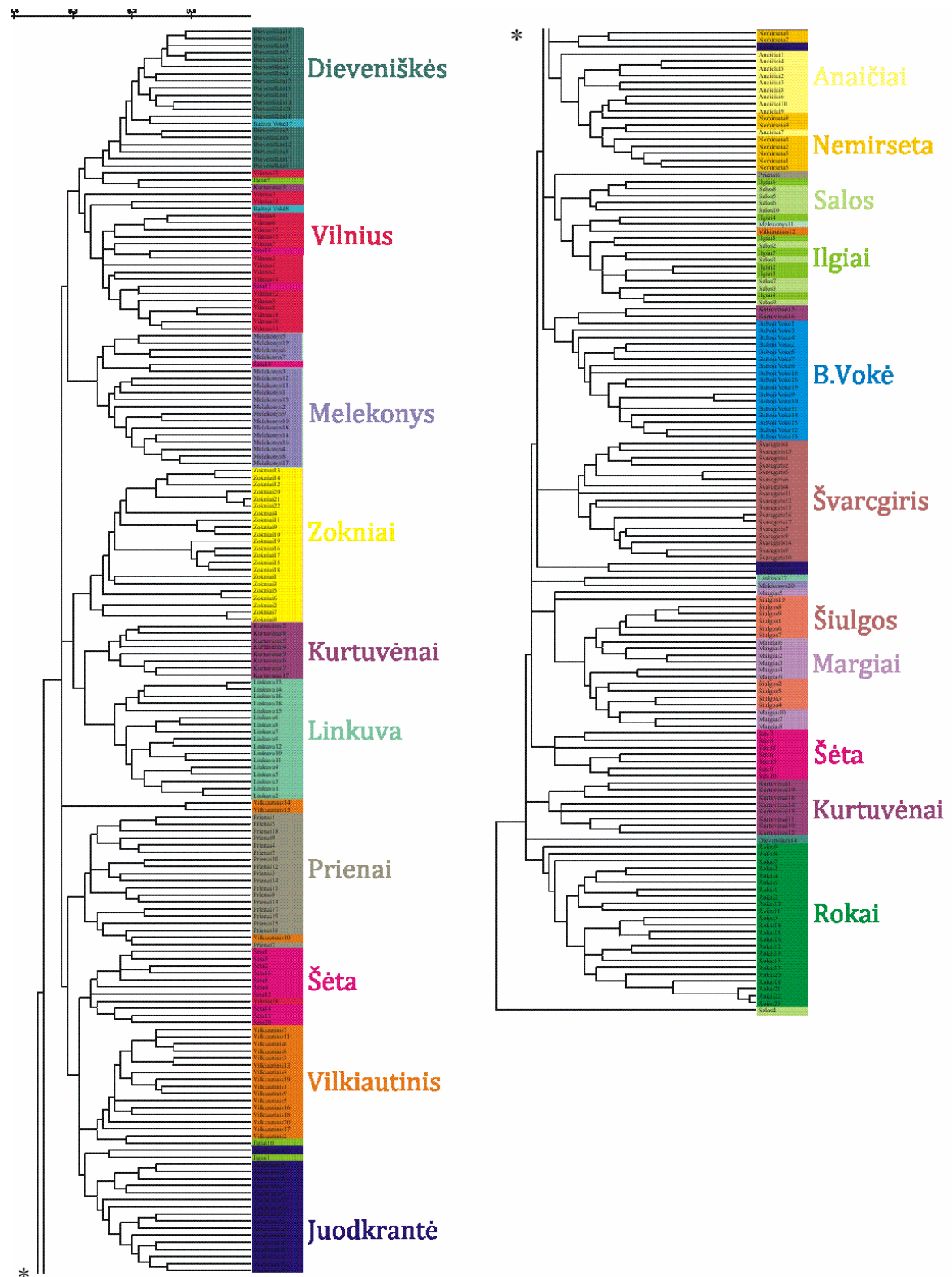
3₄₅₀, 380-3₅₂₀, 380-3₈₈₀, 380-6₇₇₀, 380-6₈₅₀, 380-6₁₁₀₀, 380-9₅₂₀, 380-9₅₇₀, 380-9₈₇₀, 380-9₁₂₅₀, 380-9₁₄₀₀, 470-8₄₄₀) gali būti būdingi rūšiai ar aukštesniam taksonui. Tolesniuose populiacijų tyrimuose naudojame tik polimorfinius lokusus. Kai kurių paprastosios avietės tirtų populiacijų elektroforezės vaizdai, gauti su pradmeniu 270-6, pateikti penkioliktame paveiksle.



15 pav. Kai kurių paprastosios avietės populiacijų RAPD elektroforegramos, gautos su pradmeniu 270-6. Ž – DNR fragmentų dydžio žymuo, bp

Analizuotų RAPD fragmentų dydis svyravo nuo 390 bp iki 3100 bp. Visi DNR fragmentai, pagausinti su pradmenimis P1 ir 270-1, buvo polimorfiniai. Su vienu pradmeniu gauta vidutiniškai $14,13 \pm 2,42$ DNR fragmentų, daugiausiai (19) – su pradmeniu P1.

Remiantis Nei ir Li genetiniais atstumais, UPGMA metodu nubraižyta 315-os tirtų individų dendrograma (16 pav.). Iš dendrogramos matyti, kad visi augalai buvo genetiškai skirtingi. Vis dėlto tos pačios populiacijos individams būdingas ir tam tikras genetinis savitumas. Dėl šios priežasties daugelio populiacijų (Juodkrantė, Vilkiautinis, Vilnius, Prienai, Linkuva, Dieveniškės, Baltoji Vokė, Melekony, Švarcgiris, Zokniai, Nemirseta, Anaičiai ir Rokai) individai dendrogramoje grupuojasi greta. Šėtos, Ilgių, Salų, Kurtuvėnų, Margių ir Šiulgų populiacijų individai nesudaro kompaktiškų grupių ir yra išsisklaidę po visą genetinio panašumo medį arba sudaro keletą smulkesnių sankaupų. Kai kuriose sankaupose galima išvelgti populiacijų grupavimąsi. Gana ryškiai išsiskiria sankaupa, kurią sudaro paprastosios avietės populiacijos iš Dieveniškių, Vilniaus ir Melekonių, taigi iš pietryčių Lietuvos. Kita sankaupa jungia šiauriau esančias Linkuvos, Zoknių, dalies Kurtuvėnų aviečių populiacijas. Į kitą didelę sankaupą patenka dalis Šėtos, Prienų, Vilkiautinio ir Juodkrantės populiacijos – gana aiški šiaurės – pietų kryptis, išskyrus Juodkrantės populiaciją. Visos šios trys didelės sankaupos sudaro vieną didelę grupę, jungiančią daugiau nei pusę tirtų populiacijų. Vieną sankaupą sudaro Margių ir Šiulgų bei Anaičių ir Nemirsetos populiacijos, kurios ir geografiškai yra arti viena kitos.



16 pav. UPGMA dendrograma, vaizduojanti paprastosios avietės devyniolikos populiacijų individų genetinį panašumą. * dendrogramos kirpimo vieta

Vidutinis Nei ir Li genetinis atstumas (GD_{xy}) tarp augalų populiacijose buvo $0,267 \pm 0,034$. Mažiausias vidutinis genetinis atstumas tarp augalų nustatytas Zoknių ($0,196 \pm 0,063$) ir Dieveniškių ($0,210 \pm 0,048$) populiacijose, didžiausias – Salų populiacijoje ($0,329 \pm 0,055$) (23 lentelė).

23 lentelė. Nei ir Li genetiniai atstumai tarp atskirų augalų paprastosios avietės populiacijose

Populiacija	Genetinis atstumas (GD_{xy})		
	Vidutinis	min.	maks.
Juodkrantė	$0,260 \pm 0,053$	0,140	0,412
Šėta	$0,291 \pm 0,045$	0,174	0,407
Vilkiautinis	$0,248 \pm 0,049$	0,109	0,361
Vilnius	$0,247 \pm 0,047$	0,088	0,388
Ilgiai	$0,267 \pm 0,044$	0,143	0,354
Salos	$0,329 \pm 0,055$	0,228	0,459
Prienai	$0,276 \pm 0,048$	0,159	0,434
Linkuva	$0,223 \pm 0,064$	0,043	0,421
Dieveniškės	$0,210 \pm 0,048$	0,107	0,365
Kurtuvėnai	$0,307 \pm 0,06$	0,161	0,455
Baltoji Vokė	$0,271 \pm 0,046$	0,073	0,368
Melekonys	$0,246 \pm 0,052$	0,123	0,423
Švarcgiris	$0,280 \pm 0,049$	0,023	0,394
Zokniai	$0,196 \pm 0,063$	0,008	0,327
Margiai	$0,275 \pm 0,053$	0,151	0,409
Šiulgos	$0,270 \pm 0,056$	0,129	0,356
Nemirseta	$0,260 \pm 0,045$	0,157	0,340
Anaičiai	$0,306 \pm 0,055$	0,162	0,419
Rokai	$0,306 \pm 0,062$	0,010	0,455
315 individų (rūšies viduje)	$0,267 \pm 0,034$	0,008	0,459

min. – mažiausias; maks. – didžiausias

2.2. Paprastosios avietės populiacijų genetinė struktūra ir diferenciacija

Kompiuterine programa PopGene v.1.31 buvo apskaičiuoti pagrindiniai paprastosios avietės populiacijų rodikliai (DNR polimorfizmas, stebimų ir efektyvių alelių skaičius, Nei genų įvairovė ir Shannon'o informacinio indekso reikšmės), kurie atspindi genetinės įvairovės lygį (24 lentelė).

24 lentelė. Paprastosios avietės gamtinių populiacijų kai kurie genetiniai rodikliai

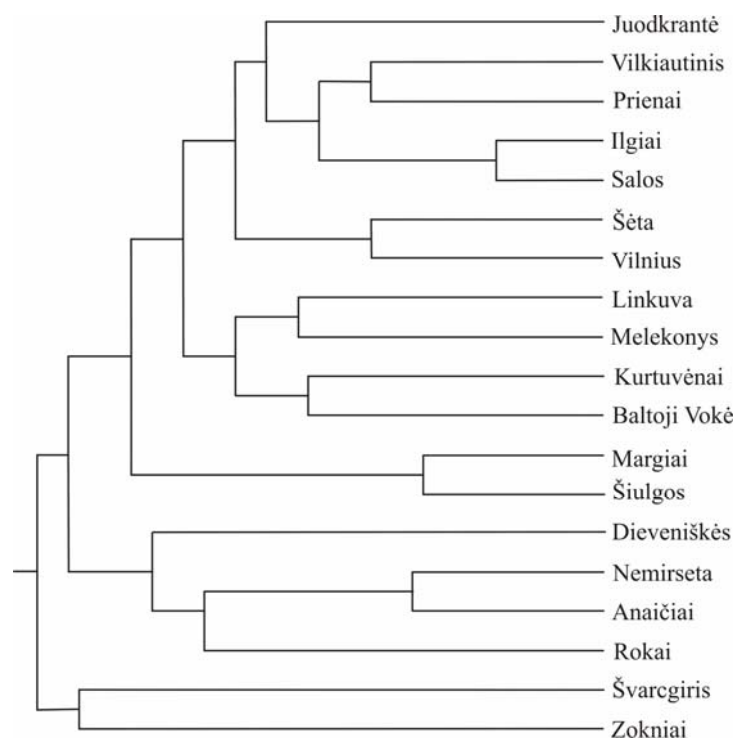
Populiacija	P, %	n_a	n_e	h	I
Juodkrantė	79,17	1,792±0,408	1,508±0,369	0,292±0,188	0,433±0,260
Šėta	81,25	1,813±0,392	1,546±0,385	0,306±0,193	0,450±0,263
Vilkautinis	77,08	1,771±0,423	1,464±0,368	0,271±0,190	0,404±0,264
Vilnius	79,17	1,792±0,408	1,507±0,370	0,291±0,189	0,431±0,261
Ilgiai	72,92	1,729±0,447	1,469±0,391	0,267±0,201	0,395±0,279
Salos	76,04	1,760±0,429	1,437±0,358	0,259±0,186	0,390±0,260
Prienai	77,08	1,771±0,423	1,486±0,376	0,279±0,193	0,414±0,269
Linkuva	76,04	1,760±0,429	1,466±0,390	0,266±0,199	0,396±0,275
Dieveniškės	72,92	1,729±0,447	1,425±0,390	0,245±0,200	0,367±0,277
Kurtuvėnai	79,17	1,792±0,408	1,466±0,345	0,276±0,182	0,414±0,254
Baltoji Vokė	79,17	1,792±0,408	1,439±0,352	0,261±0,186	0,393±0,259
Melekonys	79,17	1,792±0,408	1,478±0,375	0,276±0,191	0,412±0,264
Švarcگیرis	87,50	1,875±0,333	1,531±0,361	0,305±0,180	0,455±0,242
Zokniai	70,83	1,708±0,457	1,415±0,367	0,244±0,194	0,366±0,274
Margiai	66,67	1,667±0,474	1,385±0,375	0,226±0,196	0,341±0,277
Šiulgos	66,67	1,667±0,474	1,395±0,384	0,229±0,202	0,343±0,283
Nemirseta	69,79	1,698±0,462	1,405±0,361	0,240±0,191	0,362±0,270
Anaičiai	73,96	1,740±0,441	1,444±0,368	0,260±0,191	0,390±0,268
Rokai	84,38	1,844±0,365	1,483±0,354	0,267±0,181	0,405±0,246
Vidurkis	76,26±5,50	1,763±0,060	1,461±0,045	0,266±0,020	0,398±0,030
315 individų (rūšies viduje)		2,0±0,0001	1,660±0,270	0,380±0,110	0,561±0,130

P – polimorfizmas, n_a – stebimų alelių skaičius; n_e – efektyvių alelių skaičius; h – Nei genų įvairovė; I – Shannon'o informacinio indekso reikšmė

DNR polimorfizmo vidurkis 19-oje tirtų paprastosios avietės populiacijų buvo $76,26 \pm 5,50\%$. Mažiausias DNR polimorfizmas ($66,67\%$) nustatytas Šiulgų ir Margių populiacijose, didžiausias ($87,50\%$) – Švarcgirio populiacijoje.

Didžiausia Nei genų įvairovė pasižymėjo Šėtos ir Švarcgirio populiacijos (atitinkamai $0,305$ ir $0,306$), mažiausia genų įvairovė rasta Margių durpyno ir Šiulgų populiacijose (atitinkamai $0,226$ ir $0,229$). Vidutinė Nei genų įvairovė tirtose aviečių populiacijose siekė $0,266 \pm 0,020$. Didžiausias Shannon'o informacinis indeksas apskaičiuotas Švarcgirio populiacijoje ($0,455$), mažiausias – Margių ir Šiulgų populiacijose (atitinkamai $0,341$ ir $0,343$). Vidutinė Shannon'o informacinio indekso reikšmė tirtose aviečių populiacijose buvo $0,398 \pm 0,030$ (24 lentelė).

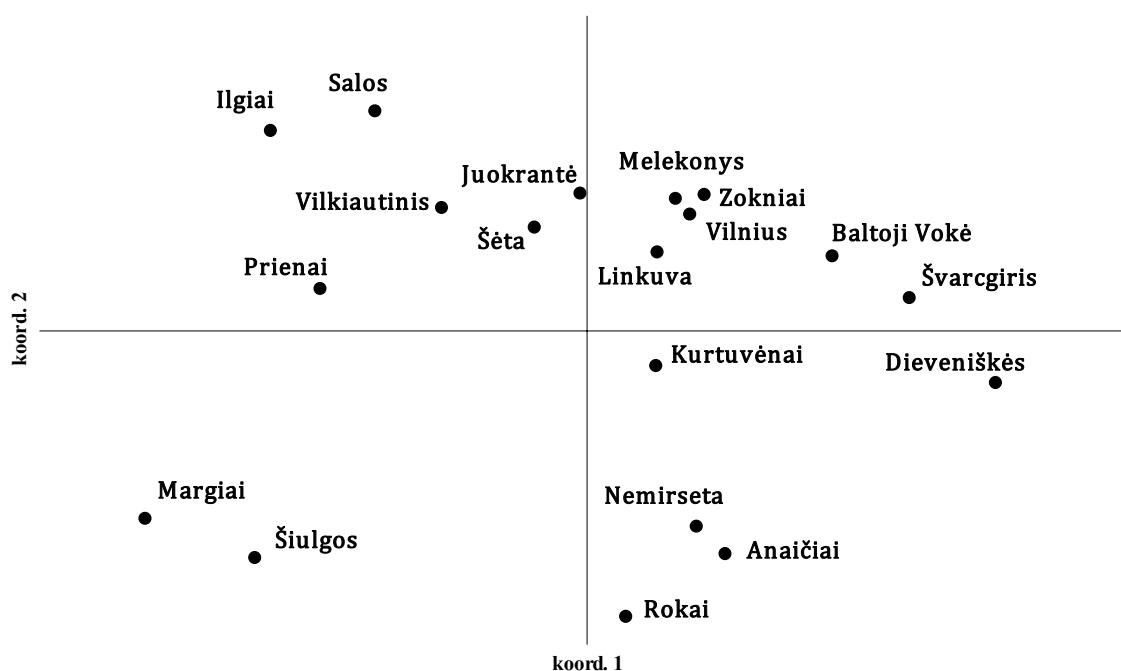
Panaudojus visus 96 polimorfinius lokusus, PopGene programa buvo apskaičiuoti tirtųjų paprastosios avietės populiacijų Nei (1972) genetiniai atstumai ir UPGMA metodu nubraižytas populiacijų genetinio panašumo medis (17 pav.).



17 pav. Paprastosios avietės devyniolikos populiacijų genetinio panašumo medis

Nei genetinių atstumų tarp paprastosios avietės populiacijų matrica pateikta 8 lentelėje Priede. Vidutinis genetinis atstumas tarp tirtų populiacijų buvo $0,177 \pm 0,04$. Mažiausias Nei genetinis atstumas (0,045) nustatytas tarp Salų ir Ilgių populiacijų, didžiausias (0,282) – tarp Dieveniškių ir Salų populiacijų bei tarp Dieveniškių ir Margių populiacijų (0,285). Nors genetinio panašumo medyje nematyti ryškaus paprastosios avietės populiacijų grupavimosi pagal augaviečių geografiją, tačiau mažiausi genetiniai atstumai nustatyti tarp geografiškai artimų populiacijų (17 pav.).

Atlikta principinių koordinacių analizė parodo visų tirtų paprastosios avietės populiacijų išsidėstymą koordinacių sistemoje. Trys koordinacių ašys aprašė 60,55% bendros genetinės įvairovės (pirmoji ašis aprašė 22,53%, antroji – 21,05%, trečioji – 16,96%). Aštuonioliktame paveiksle matyti, kad kai kurios geografiškai artimos populiacijos (pvz., Ilgiai ir Salos; Margiai ir Šiulgos; Nemirseta ir Anaičiai) dviejų koordinacių sistemoje grupuojasi gretimai viena kitos.



18 pav. Paprastosios avietės populiacijų išsidėstymas dvimatėje erdvėje

Ištyrus visus 19-os paprastosios avietės populiacijų individus, aptikti 96 polimorfiniai RAPD lokusai, tačiau nebuvo nė vienos populiacijos, kurioje

būtų visi šie lokusai. Daugiausiai lokusų (95) nustatyta Švarcgirio populiacijoje, mažiausiai – Margių durpyne ir Šiulgų miške (atitinkamai 82 ir 80 lokusų). Lokusų skaičius, nustatytas kiekvienai populiacijai patikimai koreliavo su tirtų augalų skaičiumi ($r=0,575$, $p=0,01$).

Skirtingas vidutinis RAPD fenotipų skaičius kiekvienai populiacijai su visais aštuoniais analizėje naudotais pradmenimis svyravo nuo 8,25 (Šiulgų miške ir Nemirsetoje) iki 17,63 (Rokų populiacijoje) (25 lentelė). Šis skaičius stipriai ir statistiškai patikimai koreliavo su tirtų individų skaičiumi ($r=0,957$, $p=0,001$). RAPD fenotipų dalis labiau atspindi įvairiose populiacijose stebėtų jų skaičių. Zoknių populiacijoje skirtingi RAPD fenotipai sudarė tik 65,9% nuo bendro fenotipų skaičiaus, o Nemirsetoje – 91,67%, Anaičiuose – 91,25%. Paprastosios avietės populiacijose nustatyta nedaug specifinių RAPD lokusų, kurie būtų būdingi tik vienai populiacijai, tačiau keletas tokių lokusų buvo aptikta (25 lentelė). Daugiausia specifinių RAPD lokusų (9) gauta su 470-8 pradmeniu.

25 lentelė. RAPD lokusai ir skirtingi RAPD fenotipai paprastosios avietės populiacijose

Populiacija	Tirtų augalų skaičius	Lokusai				Skirtingi RAPD fenotipai	
		Visi	Polimorfiniai	Specifiniai (pradmuo, lokuso dydis, bp)		Vidurkis ³	Dalis, % ⁴
				0 ¹	1 ²		
Juodkrantė	20	90	77			16,88±3,14	84,38±15,68
Šėta	20	91	78			17,25±3,20	86,25±15,98
Vilkautinis	20	89	74			16,00±3,55	80,00±17,73
Vilnius	19	91	76			15,75±3,14	82,89±17,96
Ilgiai	10	85	70			9,00±1,69	90,00±16,90
Salos	10	86	73	470-8 ₁₀₀₀ , 470-8 ₁₈₀₀ , 470-8 ₂₅₀₀	MP4 ₁₀₅₀	9,00±1,41	90,00±14,14
Prienai	19	89	74			16,25±3,01	85,53±15,85
Linkuva	18	92	73			13,38±3,66	74,31±20,34
Dieveniškės	20	91	70	270-1 ₇₂₀ , 380-6 ₇₀₀	270-6 ₁₀₅₀ , 470-8 ₁₅₀₀ , 470-8 ₂₅₀₀	14,75±3,69	73,75±18,47
Kurtuvėnai	19	88	76			16,88±2,10	88,82±11,05

25 lentelės tęsinys

Baltoji Vokė	19	92	76			15,88±3,72	83,55±19,58
Melekonys	20	91	76	470-8 ₃₉₀ , 470-8 ₇₀₀		16,25±3,41	81,25±17,06
Švarcگیرis	17	95	84			14,25±1,91	83,82±11,23
Zokniai	22	90	68	380-6 ₁₃₀₀	470-8 ₈₅₀	14,50±3,82	65,91±17,35
Margiai	10	82	64	380-6 ₁₉₀₀		8,25±1,75	82,50±17,53
Šiulgos	10	80	64	P1 ₈₀₀	MP4 ₁₇₅₀	9,00±1,31	90,00±13,09
Nemirseta	9	88	67		380-3 ₁₃₀₀ , MP4 ₂₀₀₀	8,25±1,16	91,67±12,94
Anaičiai	10	88	71	MP4 ₆₅₀		9,13±0,83	91,25±8,35
Rokai	23	89	81	270-6 ₉₀₀ , 470-8 ₈₅₀		17,63±4,44	76,63±19,30
Vidurkis		73±5,05				13,59±3,53	83,29±6,87

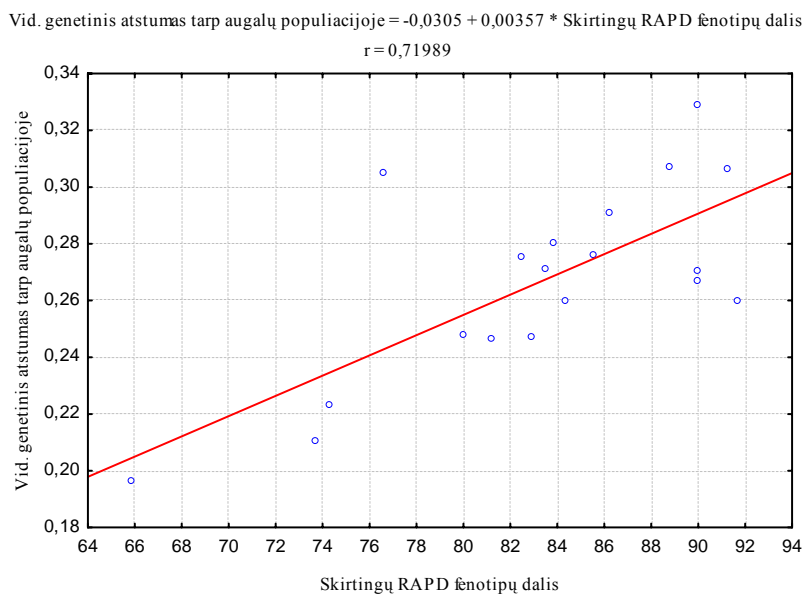
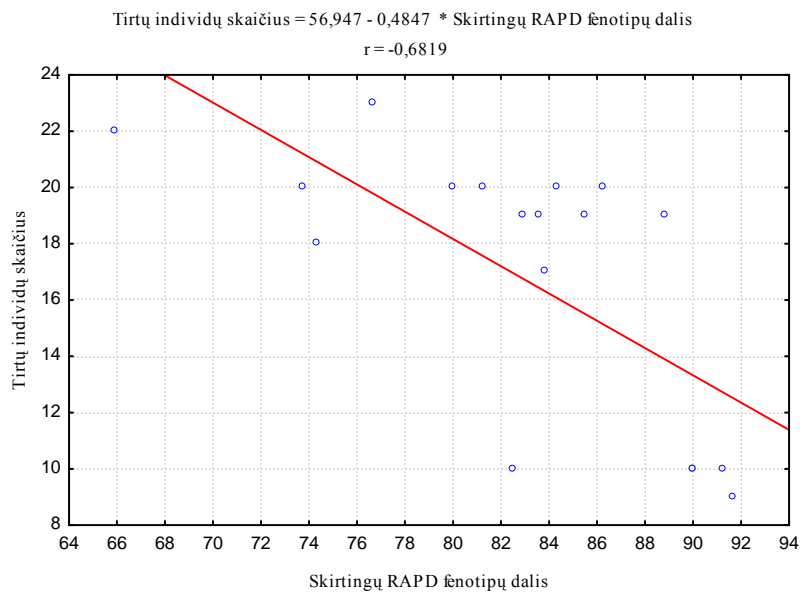
¹ – nulinis alelis, ² – monomorfinis, populiacijai būdingas žymuo, ³ – skirtingų RAPD fenotipų vidurkis populiacijoje, nustatytas su aštuoniais pradmenimis, ⁴ – skirtingų RAPD fenotipų dalis, tenkanti populiacijos individams

Buvo apskaičiuotos pagrindinių populiacijos rodiklių tarpusavio koreliacijos. Gauta žymi neigiama koreliacija tarp skirtingų RAPD fenotipų dalies ir tirtų individų skaičiaus ($r=-0,689$, $p=0,001$) bei koreliacija tarp skirtingų RAPD fenotipų dalies ir vidutinio genetinio atstumo tarp augalų populiacijoje ($r=0,720$, $p=0,001$) (19 pav., 26 lentelė).

26 lentelė. Paprastosios avietės pagrindinių populiacijų rodiklių tarpusavio Pearson'o koreliacijos

Populiacijos rodiklis	N	P, %	n_e	h	I	GD _{xy}
P, %	0,606 p=0,006					
n_e	0,464 p=0,045	0,798 p=0,001				
h	0,490 p=0,033	0,860 p=0,001	0,988 p=0,001			
I	0,506 p=0,027	0,895 p=0,001	0,974 p=0,001	0,997 p=0,001		
GD _{xy}	-0,362 p=0,128	0,290 p=0,228	0,132 p=0,590	0,202 p=0,408	0,234 p=0,334	
Skirtingų RAPD fenotipų dalis	-0,682 p=0,001	-0,068 p=0,782	0,078 p=0,751	0,092 p=0,707	0,086 p=0,726	0,720 p=0,001

paryškintos statistiškai patikimos koreliacijos, $p \leq 0,05$, N – tirtų individų skaičius, P – polimorfizmas, n_e – efektyvių alelių skaičius, h – Nei genų įvairovė, I – Shannon'o informacinis indeksas, GD_{xy} – vid. genetinis atstumas tarp augalų populiacijoje



19 pav. Koreliacija tarp tirtų individų skaičiaus ir skirtingų RAPD fenotipų dalies populiacijose (viršuje) bei tarp vidutinio genetinio atstumo tarp tirtų individų ir skirtingų RAPD fenotipų dalies populiacijose (apačioje)

Molekulinės genetinės įvairovės analizė parodė, kad pagrindinė genetinė įvairovė yra pasiskirsčiusi populiacijų viduje (27 lentelė). Įvairovę tarp populiacijų atspindinti Φ_{PT} reikšmė, apskaičiuota GenALEX kompiuterine programa, buvo 0,258 ($p=0,001$) ir artima PopGene kompiuterine programa apskaičiuotam genetinės diferenciacijos koeficientui G_{ST} (0,297).

27 lentelė. Paprastosios avietės molekulinė genetinė įvairovė (AMOVA)

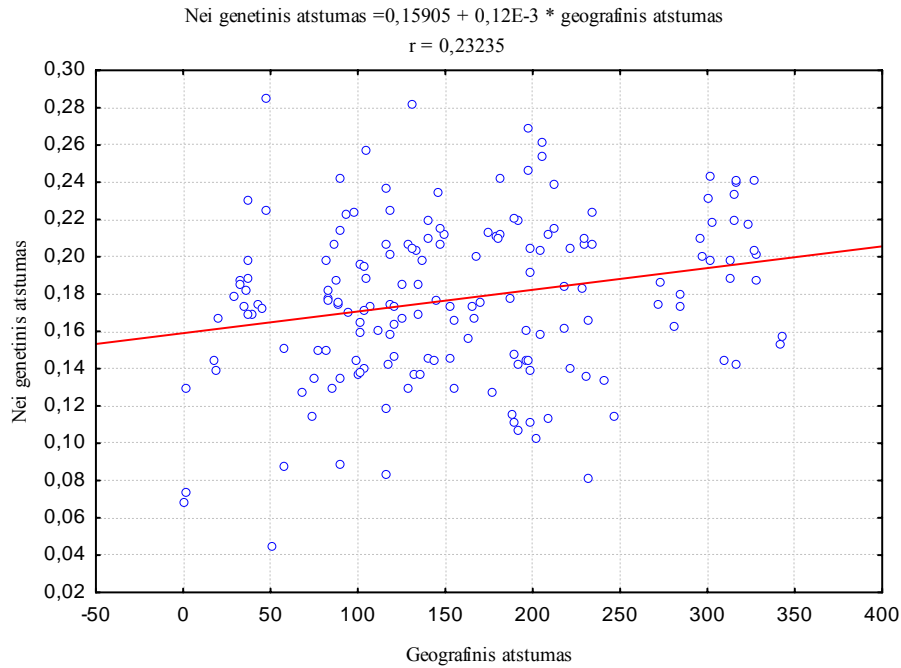
Genetinė įvairovė	df	SS	MS	Variacijos komponentas	%	Statistika	Reikšmė	p
Tarp populiacijų	18	1678,203	93,234	4,811	26			
Populiacijų viduje	296	4094,285	13,832	13,208	74	Φ_{PT}	0,258	0,001

df – laisvės laipsniai, SS – kvadratinių nuokrypių suma, MS – vidutinis kvadratinis nuokrypis

2.3. Geografinių veiksnių įtaka populiacijų genetinei įvairovei

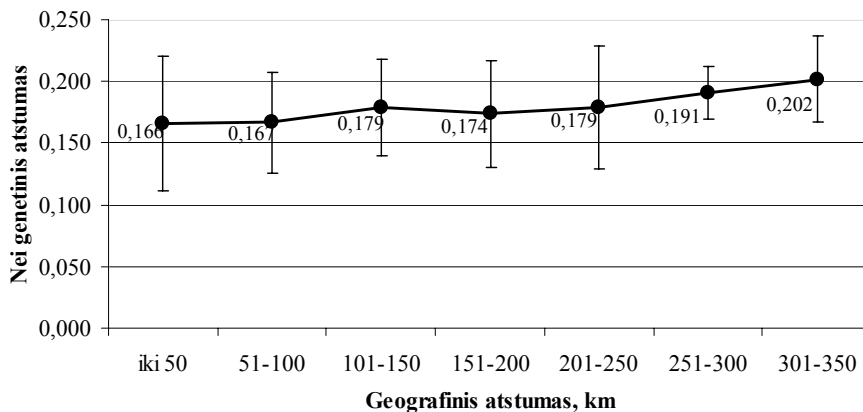
Kai kurios geografiškai artimos populiacijos (Salos ir Ilgiai, jas skyrė 50,49 km, $GD=0,045$), Šiulgų miškas ir Margių durpynas (keli šimtai metrų, $GD=0,068$), Nemirseta ir Anaičiai (2,13 km, $GD=0,074$), Vilkiautinis ir Prienai (56,04 km, $GD=0,088$) buvo panašios ir genetiškai. Tačiau kai kurios geografiškai artimos populiacijos buvo genetiškai gana skirtingos: Šėta ir Rokai (19,40 km, $GD=0,167$), Vilniaus ir B. Vokės durpyno (17,01 km, $GD=0,139$), Vilniaus ir Melekonių miško (17,01 km, $GD=0,145$), Linkuvos ir Zoknių (40,85 km, $GD=0,169$), Kurtuvėnų ir Zoknių (27,37 km, $GD=0,179$). Labiausiai geografiškai nutolusios buvo Dieveniškių ir Nemirsetos (342,78 km, $GD=0,157$) bei Dieveniškių ir Anaičių (340,93 km, $GD=0,153$), Nemirsetos ir Margių (327,14 km, $GD=0,201$), Nemirsetos ir Šiulgų (327,14 km, $GD=0,241$), Anaičių ir Margių (325,45 km, $GD=0,241$), Anaičių ir Šiulgų (325,45 km, $GD=0,204$), Dieveniškių ir Juodkrantės (323,05 km, $GD=0,217$) populiacijos. Atstumai tarp tirtų paprastosios avietės populiacijų pateikti 9 lentelėje Priede.

Koreliacinė analizė parodė, kad didėjant geografiniams atstumams tarp paprastosios avietės populiacijų, didėja ir Nei genetiniai atstumai ($r=0,232$, $p=0,002$) (20 pav.).



20 pav. Koreliacija tarp paprastosios avietės populiacijų geografinių ir Nei genetinių atstumų

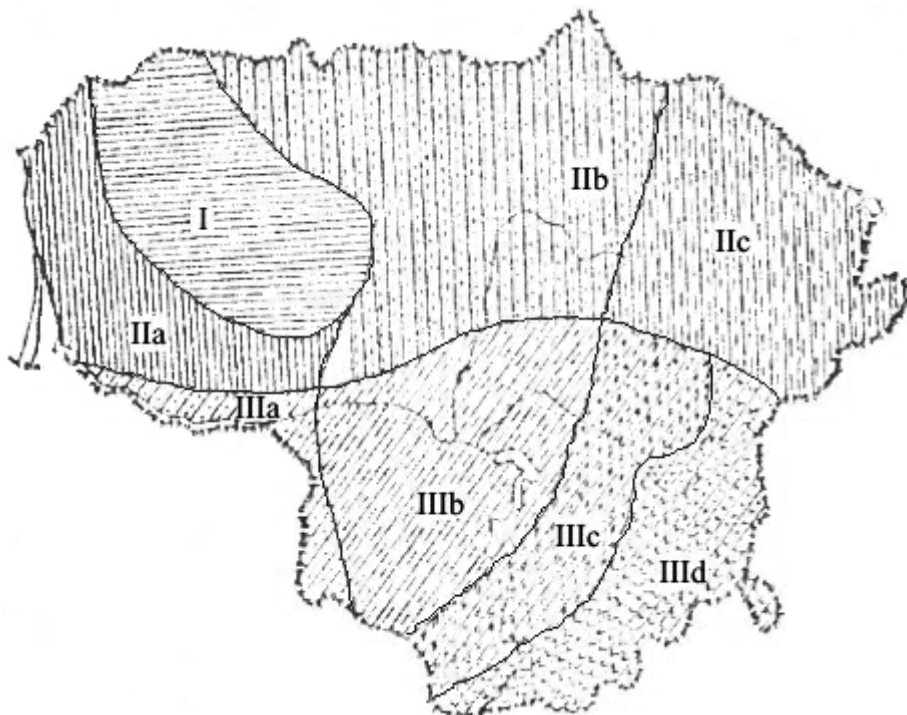
Geografiniai atstumai tarp tirtų paprastosios avietės populiacijų Lietuvoje svyravo nuo kelių šimtų metrų (tarp B. Vokės ir Melekonių, Margių ir Šiulgų) iki 343 km tarp Dieveniškių ir Nemirsetos populiacijų. Suskirsčius tirtas populiacijas pagal atstumus tarp jų į 7 grupes kas 50 km, matyti, kad genetiniai atstumai tarp populiacijų didėja, didėjant geografiniams atstumams tarp jų (21 pav.).



21 pav. Paprastosios avietės tirtų populiacijų genetinių ir geografinių atstumų priklausomybė

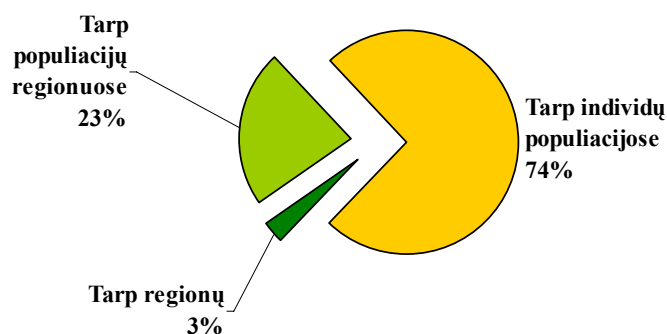
2.4. Skirtingų klimato sąlygų įtaka paprastosios avietės genetinei įvairovei

Lietuva nepasižymi dideliais klimato rodiklių svyravimais, tačiau dėl tam tikrų priežasčių (reljefo ypatybių, miškų masyvų ir ežerų sąlygojamo mikroklimato, vakarinius šalies krantus skalaujančios jūros) ir tokioje palyginti nedidelėje teritorijoje galima išskirti keturis klimatinius rajonus: Pajūrio, Žemaičių, Vidurio žemumos ir Pietryčių aukštumų. Pagal tinkamas augalams augti sąlygas Lietuva skirstoma į 3 agroklimatinius rajonus ir kelis smulkesnius parajonius (Bukantis, 1994) (22 pav.).



22 pav. Lietuvos agroklimatiniai rajonai ir porajoniai (pagal Bukantį, 1994)

Molekulinės genetinės įvairovės analizė (AMOVA) parodė, kad 19-os paprastosios avietės populiacijų genetinė diferenciacija – 23%, o pagrindinė genetinė įvairovė pasiskirsčiusi tarp individų populiacijų viduje (23 pav., 28 lentelė).



23 pav. Molekulinės genetinės įvairovės pasiskirstymas paprastosios avietės populiacijose

Suskirsčius tirtas paprastosios avietės populiacijas pagal agroklimateinius rajonus ir atlikus AMOVA analizę, buvo nustatyta nedidelė, statistiškai patikima diferenciacija ($\Phi_{RT}=3\%$, $p=0,001$) tarp agroklimateinių rajonų.

28 lentelė. Paprastosios avietės molekulinė genetinė įvairovė (AMOVA)

Įvairovė	df	SS	MS	Variacijos komponentas	%	Statistika	Reikšmė	p
Tarp regionų	7	775,881	110,840	0,619	3	Φ_{RT}	0,033	0,001
Tarp populiacijų regionuose	11	902,322	82,029	4,274	23	Φ_{PR}	0,236	0,001
Tarp individų populiacijose	296	4094,286	13,832	13,832	74	Φ_{PT}	0,261	0,001

df – laisvės laipsniai, SS – kvadratinių nuokrypių suma, MS – vidutinis kvadratinis nuokrypis

Atsižvelgdami į šiuos rezultatus bei literatūroje pateiktus kai kurių autorių duomenis (Steiner, Garcia de los Santos, 2001; Graham ir kt., 2003; Owuor ir kt., 2003), mes tyrėme genetinės įvairovės priklausomybę nuo kai kurių klimato rodiklių: kritulių kiekio įvairiais sezonais, metinio kritulių kiekio, vidutinės oro temperatūros įvairiais metų laikais ir vidutinės metinės temperatūros. Kiekviena populiacija buvo priskirta arčiausiai esančiai meteorologinei stociui ir apskaičiuotos koreliacijos tarp nustatytų genetinių

rodiklių ir daugiamečių meteorologinėse stotyse užregistruotų klimato rodiklių (10 ir 11 lentelės Priede). Gautos statistiškai patikimos koreliacijos tarp kai kurių populiacijų genetinės įvairovės rodiklių (efektyvaus alelių skaičiaus ir skirtingų RAPD fenotipų dalies) ir klimato rodiklių (29 lentelė).

29 lentelė. Paprastosios avietės populiacijų kai kurių genetinės įvairovės rodiklių koreliacijos su klimato rodikliais

Klimato rodiklis	Temperatūra		Kritulių kiekis							
	Liepos mėn.	Vasara	Gruodžio mėn.	Sausio mėn.	Vasario mėn.	Žiema	Kovo mėn.	Rugsėjo mėn.	Ruduo	Metinis
Genetinės įvairovės rodiklis										
Efektyvių alelių skaičius	0,481 p=0,04	0,483 p=0,04								
Skirtingų RAPD fenotipų dalis			0,565 p=0,01	0,642 p=0,001	0,467 p=0,04	0,631 p=0,01	0,519 p=0,02	0,480 p=0,04	0,460 p=0,05	0,582 p=0,01

Koreliacinė analizė parodė, kad efektyvių alelių skaičiui didesnę įtaką turėjo vasaros vidutinė temperatūra. Kritulių kiekis rudenį, žiemos mėnesiais ir bendras žiemos kritulių kiekis ypač svarbus skirtingų RAPD fenotipų daliai populiacijoje.

2.5. Genetinės įvairovės populiacijose priklausomybė nuo atstumo tarp rinktų augalų ir imties dydžio

Tirtose paprastosios avietės populiacijose imties dydis svyravo nuo 9 (Nemirseta) iki 23 (Rokai) augalų (25 lentelė). Polimorfizmas, efektyvių alelių skaičius, polimorfinių lokusų skaičius, Nei genų įvairovė, Shannon'o indeksas patikimai teigiamai koreliavo su imties dydžiu, o skirtingų RAPD fenotipų skaičius populiacijose patikimai neigiamai koreliavo su imties dydžiu ($r=-0,682$, $p=0,001$) (26 lentelė).

Paprastoji avietė – įvairiose augavietėse sutinkamas augalas. Augimo sąlygos (skirtingos dirvožemio savybės, apšvietimas, drėgmės ir temperatūros režimas) konkrečioje augavietėje gali įvairiai kisti. Paprastosios avietės

populiacijos paprastai yra fragmentuotos, todėl ir mūsų darbe skyrėsi atstumai tarp tyrimams rinktų augalų įvairiose populiacijose. Populiacijose, kuriose buvo palyginti vienodos sąlygos ir augalai nebuvo atskirti įvairiais geografiniais barjeriais, augalai buvo renkami maždaug kas 50–100 metrų. Pagal augavietės vientisumą visas tirtas populiacijas galima išskirti į dvi grupes:

1) populiacijos, kur paprastosios avietės individai augo palyginti panašiomis ekologinėmis sąlygomis ir buvo surinkti gana panašiais atstumais tarp atskirų individų. Šiai grupei mes priskyrėme 13 populiacijų: Juodkrantės, Vilniaus, Salų, Prienu, Dieveniškių, Baltosios Vokės, Melekonių, Zoknių, Margių, Šiulgų, Nemirseto, Anaičių, Roku;

2) populiacijos, kur augalai augo gana skirtingomis ekologinėmis sąlygomis, rinkimo taškai buvo atskirti įvairiais barjeriais, atstumai tarp augalų įvairavo. Šiai grupei priskyrėme Šėtos, Vilkiautinio, Ilgių, Linkuvos, Kurtuvėnų ir Švarcgirio populiacijas.

Norėdami įsitikinti, kad mūsų tirtų paprastosios avietės populiacijų genetiniams rodikliams neturėjo reikšmės skirtingos imtys, kiekvienoje populiacijoje suvienodinome individų skaičių – palikome po dešimt individų ir vienodos imties populiacijose vėl apskaičiavome genetinės įvairovės rodiklius (30 lentelė).

Vienodos imties populiacijose vidutinės genetinių rodiklių vertės buvo šiek tiek mažesnės, lyginant su pradinėmis, kurios buvo apskaičiuotos įvairios imties populiacijose (24 lentelė). Didžiausiomis genetinės įvairovės rodikliais pasižymėjusi Švarcgirio populiacija ir po imties sumažinimo išsaugojo didžiausias reikšmes. Roku populiacija taip pat išsaugojo dideles polimorfizmo ir stebėtų alelių reikšmes. Mažiausia genetinė įvairovė prieš populiacijų imčių suvienodinimą pasižymėjo Margių ir Šiulgų populiacijos, o vienodos imties populiacijų tarpe – Dieveniškių populiacija. Efektyvių alelių skaičius ir Nei genų įvairovė išliko mažiausi Margių populiacijoje.

30 lentelė. Pagrindiniai genetiniai parametrai, apskaičiuoti vienodos imties paprastosios avietės populiacijose

Populiacija	P, proc.	n _a	n _e	h	I
Juodkrantė	71,88	1,719±0,452	1,467±0,375	0,270±0,195	0,340±0,275
Šėta	76,04	1,760±0,429	1,499±0,390	0,282±0,198	0,416±0,274
Vilkiautinis	65,62	1,656±0,478	1,383±0,378	0,224±0,199	0,336±0,281
Vilnius	72,92	1,729±0,447	1,473±0,383	0,271±0,199	0,340±0,278
Ilgiai	72,92	1,729±0,447	1,469±0,391	0,267±0,201	0,395±0,279
Salos	76,04	1,760±0,429	1,436±0,358	0,259±0,186	0,390±0,260
Prienai	69,79	1,698±0,462	1,450±0,390	0,257±0,203	0,380±0,285
Linkuva	73,96	1,740±0,441	1,474±0,385	0,271±0,198	0,401±0,276
Dieveniškės	61,46	1,615±0,489	1,389±0,406	0,220±0,210	0,326±0,295
Kurtuvėnai	75,00	1,750±0,435	1,420±0,345	0,252±0,184	0,382±0,259
Baltoji Vokė	69,79	1,698±0,462	1,423±0,366	0,248±0,196	0,370±0,277
Melekonyš	73,96	1,740±0,441	1,452±0,374	0,262±0,195	0,391±0,272
Švarcگیرis	78,12	1,781±0,416	1,525±0,386	0,296±0,195	0,436±0,268
Zokniai	64,58	1,646±0,481	1,395±0,370	0,232±0,197	0,347±0,281
Margiai	66,67	1,667±0,474	1,385±0,375	0,226±0,196	0,341±0,277
Šiulgos	66,67	1,667±0,474	1,395±0,384	0,229±0,202	0,343±0,283
Nemirseta*	69,79	1,698±0,462	1,405±0,361	0,240±0,191	0,362±0,270
Anaičiai	73,96	1,740±0,441	1,444±0,368	0,260±0,191	0,390±0,268
Rokai	77,08	1,771±0,423	1,454±0,373	0,264±0,193	0,395±0,266
Vidurkis 189 individai	71,38	1,710±0,047 2,00	1,440±0,040 1,654±0,270	0,250±0,010 0,378±0,112	0,380±0,030 0,559±0,130

* Nemirsetoje tirti 9 individai;

P – polimorfizmas, n_a – stebimų alelių skaičius; n_e – efektyvių alelių skaičius; h – Nei genų įvairovė; I – Shannon'o informacinio indekso reikšmė

2.6. Skirtingomis ekologinėmis sąlygomis augančių paprastosios avietės populiacijų genetinės įvairovės palyginimas

Mus labiausiai domino netoli viena kitos lokalizuotų, tačiau skirtingomis ekogeografinėmis sąlygomis augančių paprastosios avietės populiacijų genetinių rodiklių palyginimas. Tokios yra Baltosios Vokės (durpynas) ir Melekonių (pušynas), Margių (užaugantis durpynas) ir Šiulgų (mišrus miškas), Nemirsetos (kopose augantys krūmynai) ir Anaičių poligono teritorijos populiacijos.

1. Baltosios Vokės durpyną nuo Melekonių miško skyrė apie 100 m proskyna, kuria eina pravažiuojamas kelias (24 pav.). Nepriklausomai nuo

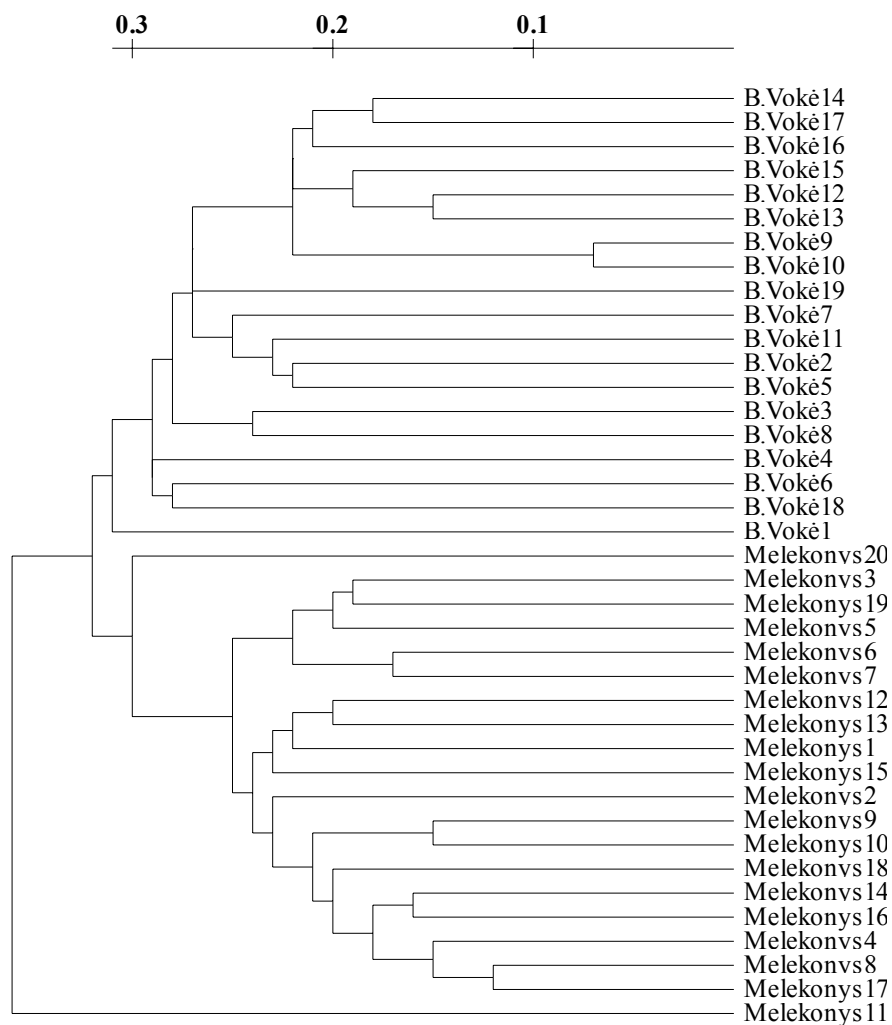
nedidelio geografinio atstumo tarp abiejų populiacijų, abiejose radavietėse labai skyrėsi ekologinės mikroklimato sąlygos. Baltosios Vokės durpyne augalai auga gerai apšviestuose sausumos ploteliuose, kuriuos skyria atviro vandens telkinukai. Melekonių miške vyrauja tankiai augantys spygliuočiai (paprastoji pušis su kadagiu), kurie sudaro pavėsį paprastosios avietės augalams.



24 pav. Paprastosios avietės Baltosios Vokės durpyno (D) ir Melekonių miško (M) populiacijos. Žemėlapis mastelis: 1:50000

Dėl nevienodo apšvietimo ir mikroklimato, Baltosios Vokės durpyno avietės žydi ir dera anksčiau nei Melekonių miško populiacijos avietės. Skiriasi ir šių populiacijų aukštis virš jūros lygio: Baltosios Vokės durpynas yra vidutiniškai 124 m, Melekonių miškas – 142 m.

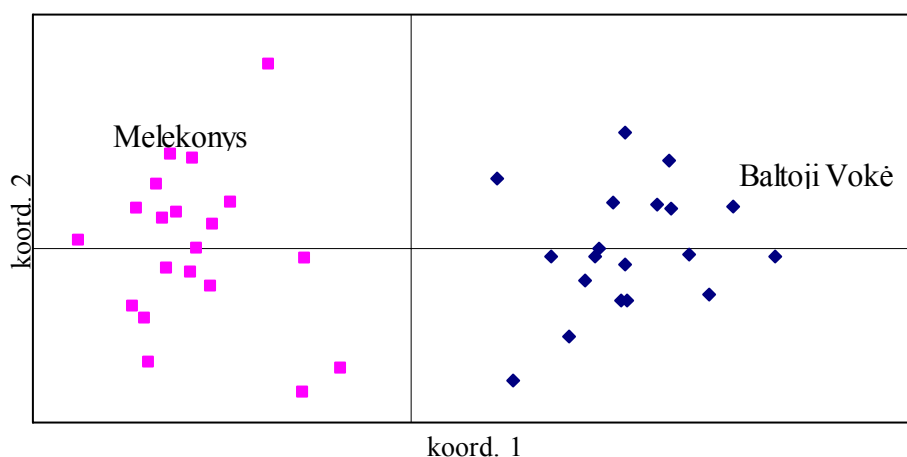
Genetinio panašumo dendrogramoje matyti, kad abiejų populiacijų individai ryškiai genetiškai skyrėsi ir suformavo dvi atskiras sankaupas (25 pav.).



25 pav. Paprastosios avietės Baltosios Vokės ir Melekonių populiacijų individų genetinio panašumo UPGMA dendrograma. Skalė viršuje – Nei ir Li genetinis atstumas, nustatytas palyginus individų RAPD fenotipus

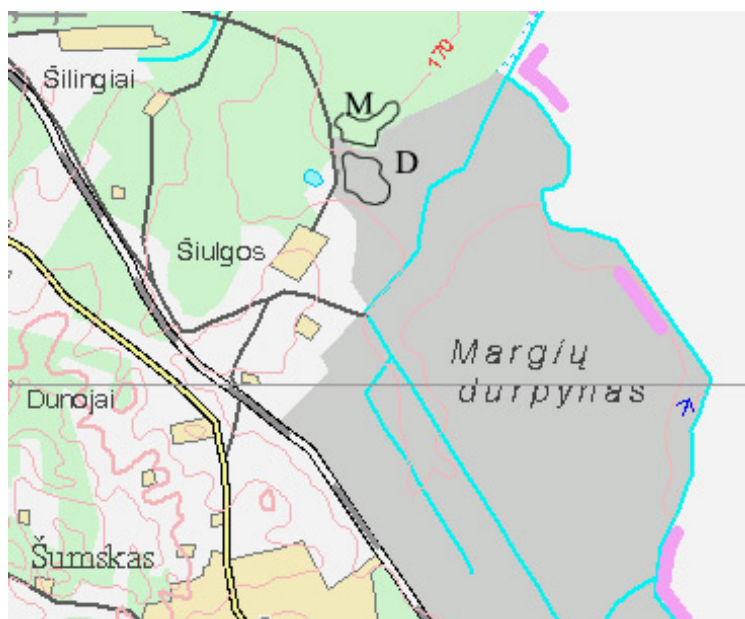
Baltosios Vokės durpyno avietės populiacijoje tarp tirtų augalų nustatyti didesni genetiniai atstumai (GD_{xy}) palyginti su Melekonių miško populiacija (31 lentelė). Abiejose populiacijose nustatytas toks pats DNR polimorfizmas (79,17%), nors kiti rodikliai šiek tiek skyrėsi – Melekonių miško augaluose efektyvių alelių skaičius, Nei genų įvairovė ir Shannon'o indeksas buvo šiek tiek didesni palyginti su durpyno augalais (31 lentelė). Durpyno populiacijos individuose buvo nustatyta 83,55% skirtingų RAPD fenotipų, Melekonių miško augaluose šiek tiek mažiau – 81,25%. Aptikta nemažai specifinių tirtoms populiacijoms lokusų, pagal kuriuos galima atskirti Melekonių miško populiacijos augalus nuo durpyno augalų. Molekulinės genetinės įvairovės

analizė (AMOVA) parodė 20% genetinę diferenciaciją tarp abiejų šių populiacijų. Principinių koordinačių analizė parodė, kad šių dviejų populiacijų augalai dvimatėje koordinačių erdvėje sudaro visiškai skirtingas sankaupas (26 pav.).



26 pav. Baltosios Vokės ir Melekonių populiacijų individų principinė koordinačių analizė

2. Margių durpynas beveik neapribotas nuo Šiulgų miško jokiais mikroklimatiniais ir fiziniais barjeriais (27 pav.). Augalai buvo renkami durpyne, kuris užauga krūmynais ir jaunais medeliais bei šalia augančiame spygliuočių miške. Nežymiai skiriasi tirtų populiacijų aukštis virš jūros lygio: durpyno – 165,2 m, miško – 173,5 m.

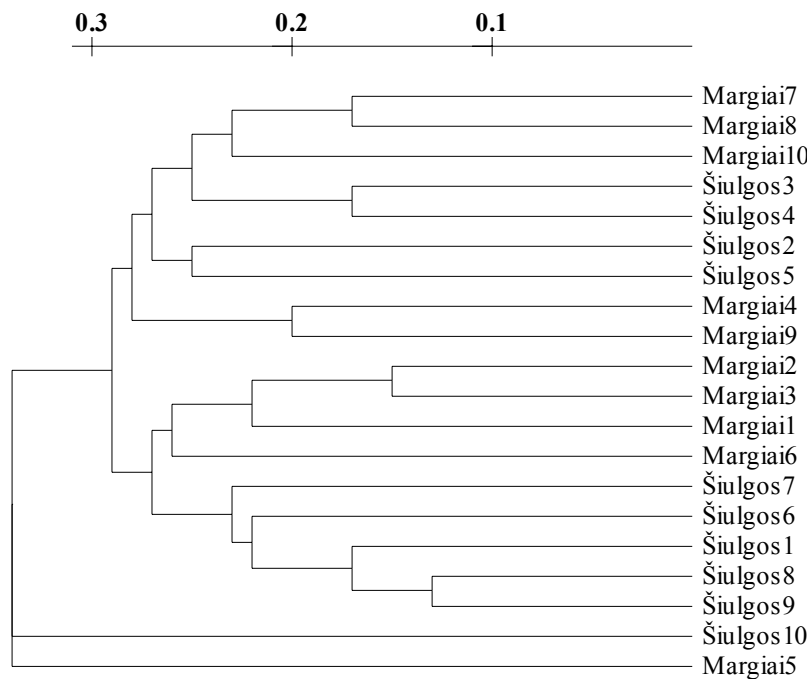


27 pav. Paprastosios avietės Margių durpyno (D) ir Šiulgų miško (M) populiacijos. Žemėlapis mastelis: 1:50000

Dendrogramoje (28 pav.) matyti, kad abiejų populiacijų augalai nesudaro griežtai apribotų sankaupų, tačiau bendroje visų tirtų paprastosios avietės populiacijų medyje (17 pav.) jos abi sudaro atskirą sankaupą.

Abiejose populiacijose nustatytas panašus genetinis atstumas (GD_{xy}): tarp Margių durpyno augalų – 0,275, Šiulgų miško – 0,270. Šiulgų miško populiacijoje genetiniai atstumai svyravo šiek tiek daugiau (nuo 0,120 iki 0,356), o Margių durpyno augalai buvo genetiškai panašesni (31 lentelė).

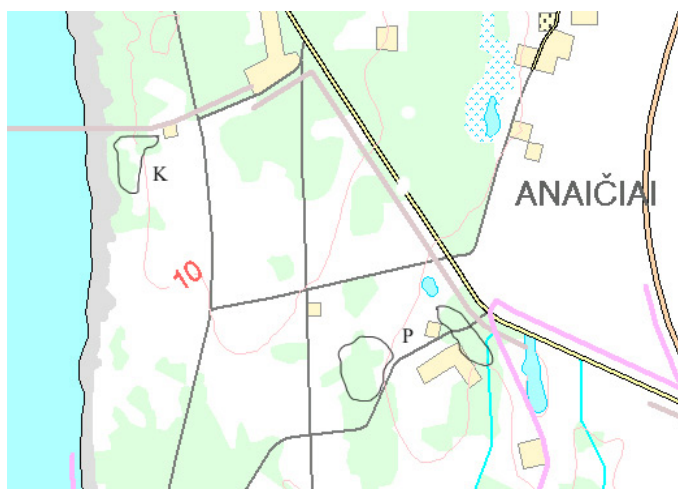
Šių populiacijų genetinė įvairovė buvo mažiausia iš visų devyniolikos tirtų paprastosios avietės populiacijų (24 lentelė). Tai galbūt lėmė nedidelės tirtos teritorijos ir nedidelės populiacijos imtys (po 10 augalų iš abiejų populiacijų). Molekulinės genetinės įvairovės analizė (AMOVA) parodė 8% genetinę diferenciaciją tarp abiejų šių populiacijų. Šiose populiacijose nustatytų RAPD fenotipų skaičius skyrėsi nedaug: Šiulgų miško populiacijoje nustatyta 90%, o Margių durpyno populiacijoje – 82,5% skirtingų RAPD fenotipų (31 lentelė).



28 pav. Paprastosios avietės Margių durpyno ir Šiulgų miško populiacijų individų genetinio panašumo UPGMA dendrograma. Skalė viršuje – Nei ir Li genetinis atstumas, nustatytas palyginus individų RAPD fenotipus

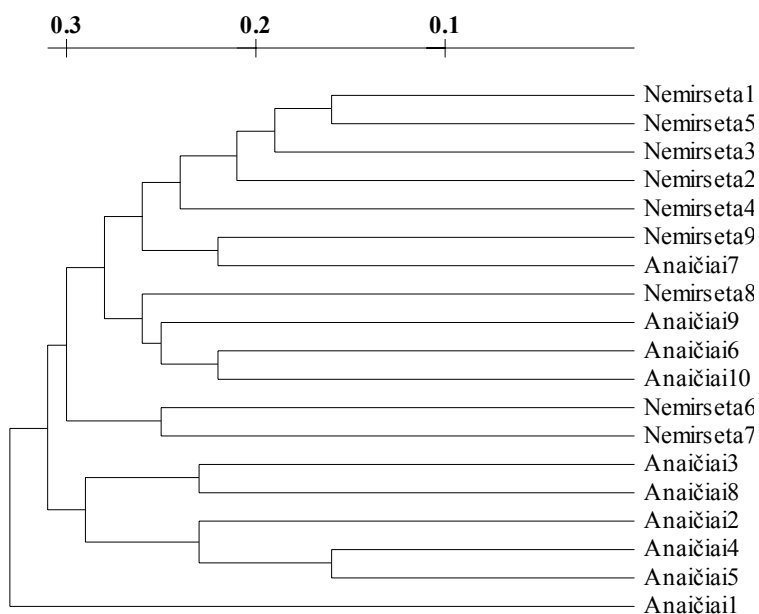
3. Nemirsetos ir Anaičių populiacijas skyrė dviejų kilometrų atstumas. Nemirsetos populiacijos atstovai rinkti kopose augančiose krūmynuose, o Anaičių – karinio poligono teritorijoje, kurioje daug įvairesnės ekologinės sąlygos ir žymūs žmogaus veiklos padariniai (29 pav.). Kaip matyti iš dendrogramos (30 pav.), abiejų tirtų populiacijų augalai nesigrupavo griežtai į atskiras sankaupas. Bendrame visų tirtų paprastosios avietės populiacijų genetinio giminingumo medyje Nemirsetos bei Anaičių populiacijos yra greta viena kitos ir sudaro bendrą sankaupą (17 pav.). Be to, matyti, kad šios populiacijos genetiškai panašios ir į kitą pajūrio paprastosios avietės populiaciją Juodkrantėje.

Molekulinės genetinės įvairovės analizė (AMOVA) parodė 3% genetinę diferenciaciją tarp Nemirsetos ir Anaičių populiacijų.



29 pav. Paprastosios avietės Nemirsetos kopų (K) ir Anaičių karinio poligono (P) populiacijos. Žemėlapiu mastelis: 1:50000

Nemirsetos populiacijoje aptikta 91,67% RAPD fenotipų, panašiai kaip ir Anaičių populiacijoje – 91,25%. Nustatyti ir specifiniai lokusai, skiriantys šias populiacijas vieną nuo kitos (31 lentelė).



30 pav. Paprastosios avietės Nemirsetos kopų ir Anaičių poligono populiacijų individų genetinio panašumo UPGMA dendrograma. Skalė viršuje – Nei ir Li genetinis atstumas, nustatytas palyginus tirtų individų RAPD fenotipus

31 lentelė. Paprastosios avietės populiacijų, augančių skirtingomis ekologinėmis sąlygomis, palyginimas

Populiacija Rodiklis	Baltoji Vokė	Melekonys	Margiai	Šiulgos	Nemirseta	Anaičiai
Atstumas	~100 metrų		300–400 metrų		2,13 km	
AMOVA	20%		8%		3%	
Genetinis atstumas pagal Nei	0,129		0,068		0,074	
GD _{xy} (min.; maks.)	0,271 (0,073; 0,368)	0,246 (0,123; 0,423)	0,275 (0,151; 0,409)	0,270 (0,129; 0,356)	0,260 (0,157; 0,340)	0,306 (0,162; 0,419)
P, %	79,17	79,17	66,67	66,67	69,79	73,96
n _e	1,439	1,478	1,385	1,395	1,405	1,444
h	0,261	0,276	0,226	0,229	0,240	0,260
I	0,393	0,412	0,341	0,343	0,362	0,390
Skirtingų RAPD fenotipų dalis	83,55±19,58	81,25±17,06	82,50±17,53	90,00±13,09	91,67±12,94	91,25±8,35
Specifiniai RAPD lokusai	270-6 ₁₂₀₀ (0), 270-1 _{580, 620} (1), 640, 750 (0), MP4 ₅₂₀ (1), P1 _{500, 720, 820} (1), 380-6 _{1250, 1300} (0)	270-6 ₈₂₀ (1), 380-3 _{510, 650, 700, 760} (1), 380-9 ₂₂₃₀ (1), 470-8 ₇₀₀ (0), 1500 (0), 3100 (1), 270-1 _{580, 680, 720} (0), 1100 (1), 380-6 ₁₃₀₀ (1)	270-6 ₈₂₀ (1), 380-9 ₂₂₃₀ (1), 270-1 ₁₁₀₀ (1), 380-6 ₁₃₀₀ (1)	270-6 ₆₂₀ (0), P1 ₈₀₀ (0)	270-6 ₇₂₀ (0), 380-3 _{830, 2100} (1), 380-9 ₈₅₀ (1), 270-1 ₅₀₀ (0), MP4 ₂₀₀₀ (1), P1 ₁₆₀₀ (0), 2000 (1), 380-6 ₆₀₀ (1)	270-6 _{1200, 1700} (0), MP4 ₆₅₀ (0), P1 ₈₂₀ (1)

GD_{xy} (min.; maks.) – genetinis atstumas populiacijoje tarp augalų (mažiausias, didžiausias), P – polimorfizmas, n_e – efektyvių alelių skaičius, h – Nei genų įvairovė, I – Shannon'o informacinis indeksas, (1) – populiacijai specifiniai aleliai, (0) – nuliniai aleliai

IV. REZULTATŲ APTARIMAS

1. Genetinės įvairovės tyrimas paprastosios avietės kolekcijoje

Genetinės kolekcijos pavyzdžių genotipavimas ir genetinės įvairovės įvertinimas RAPD metodu. Genetinės medžiagos apibūdinimas yra svarbi grandis, jungianti augalų genetinių išteklių išsaugojimą ir jų panaudojimą (Bretting, Widrechner, 1995). Molekulinių žymenų metodo pasirinkimą lemia poreikiai ir galimybės. Jis turi būti greitas, patikimas, nebrangus, techniškai nesudėtingas, informatyvus, t.y. leidžiantis atskirti ir išanalizuoti didelį skaičių genotipų. Šiuos kriterijus ir tenkina RAPD metodas (Williams ir kt., 1990), todėl jis plačiai naudojamas pradiniam kolekcijų genetinio vertinimo etape (Bretting, Widrechner, 1995; Divaret ir kt., 1999; Gustine ir kt., 2002; Žvingila ir kt., 2002). Metodas patogus dar ir tuo, kad nereikalauja informacijos apie tiriamos rūšies genomo nukleotidų seką. Tyrimų efektyvumą lemia pradmenų pasirinkimas. Pastarieji – dažniausiai 10 bp ilgio oligonukleotidai. Pagrindiniai RAPD žymenų trūkumai – dominuojantis jų paveldėjimo pobūdis ir priklausomybė nuo reakcijos sąlygų (Chen ir kt., 1997; Jones ir kt., 1997). Gana dažnai genetinių išteklių įvertinimui naudojama dviejų ar daugiau žymenų kombinacija. Šiame darbe paprastosios avietės genetinės kolekcijos įvairovei tirti buvo naudojami DNR ir morfologiniai žymenys.

Genotipuojant kolekcijos pavyzdžius molekulinių žymenų metodais, labai svarbu sudaryti tokį pradmenų rinkinį, su kuriuo būtų galima atskirti kuo daugiau skirtingų genotipų. Pradmenų rinkinio dydį lemia tiriamojo objekto polimorfizmas ir tiriamų pavyzdžių skaičius.

Turkijos mokslininkai, tirdami sėjamojo meliono (*Cucumis melo*) 56 vietinių ir 23 kitų šalių genotipų genetinę įvairovę RAPD metodu, naudojo 33 pradmenis, su kuriais buvo gauti 109 RAPD žymenys (Sensoy ir kt., 2007). Tiriant gausią europinio alyvmedžio (*Olea europaea*) genetinę kolekciją (123 kolekcijos pavyzdžiai, iš viso 497 medžiai), buvo naudoti tik 4 pradmenys, su

kuriais gauti 32 RAPD žymenys. Šių žymenų pagalba gauta 114 RAPD fenotipų. Gautieji RAPD žymenys po to buvo naudojami SSR analizėje (Khadari ir kt., 2003). Tiriant 55 augalus iš dygliuotojo šaltalankio (*Hippophae rhamnoides*) genetinės kolekcijos, buvo pasirinktas 8 pradmenų rinkinys. Atlikus RAPD analizę su šiais pradmenimis, gauti 63 polimorfiniai RAPD žymenys (Bartish ir kt., 2000).

Šiuo metu VU Botanikos sode saugomoje paprastosios avietės kolekcijoje yra daugiau nei šimtas skirtingų genetinių pavyzdžių iš visos Lietuvos ir kai kurių kaimyninių šalių. Natūraliai gamtoje augančios paprastosios avietės genetiniai išteklių Lietuvoje iki šiol nebuvo tirti molekuliniais žymenų metodais, todėl pradiniam tyrimų etape buvo atlikta pradmenų atranka su nedideliu kolekcijos pavyzdžių kiekiu. Mūsų darbe paprastosios avietės genetinės kolekcijos 20 pavyzdžių buvo tiriami, naudojant 36 pradmenimis. Atlikus RAPD analizę, gauti 284 amplifikacijos produktai, iš kurių 228 buvo polimorfiški (polimorfizmas buvo $80,64 \pm 16,74\%$). Gauti 24 specifiniai žymenys, kurie gali būti naudojami individualiems genotipams atskirti. Apskaičiuoti Nei ir Li genetiniai atstumai svyravo nuo 0,28 iki 0,51, vidutinis genetinis atstumas 20–yje kolekcijos pavyzdžių buvo $0,40 \pm 0,04$.

Paaiškėjus, kad paprastoji avietė yra labai polimorfiškas augalas, didesniai kolekcijos individų kiekiui genotipuoti mes pasirinkome mažesnių pradmenų kiekį – šešis. Naudodami šiuos pradmenis, genotipavome dar 29 kolekcijos pavyzdžius. Atlikus visų 49–ių paprastosios avietės pavyzdžių RAPD analizę, gauti 63 RAPD lokusai, iš kurių 48 buvo polimorfiški. DNR polimorfizmas tirtų pavyzdžių grupėje buvo $77,83 \pm 9,15\%$. Nei ir Li genetiniai atstumai šiuose pavyzdžiuose svyravo nuo 0,10 iki 0,49, vidutinis genetinis atstumas – $0,28 \pm 0,06$.

Bulgarų mokslininkai, tirdami Bulgarijos paprastosios avietės genetinės kolekcijos 28–ių varietetų ir elitinių linijų giminingumą RAPD metodu (naudojo 4 pradmenis, analizavo 56 polimorfinius lokusus), nustatė labai panašius ($0,33 \pm 0,10$) į mūsų nustatytus genetinius atstumus tarp laukinių

aviečių genotipų (Badjakov ir kt., 2006). DNR polimorfizmas taip pat buvo panašus – 87,5%. Autoriai pažymi, jog šiuo metu auginamos populiariausios aviečių veislės yra kilusios iš penkių pradinių veislių ir dėl selekcijos genetiškai supanašėjusios. Tokį didelį genetinį atstumą tarp tirtų 14 veislių galima paaiškinti tik maža imtimi. Mūsų tyrimuose vidutinis genetinis atstumas tarp 20-ies tirtų kolekcijos pavyzdžių buvo net 0,40, o ištyrus didesnę kolekcijos pavyzdžių skaičių, vidutinis genetinis atstumas buvo mažesnis (0,28).

Taigi, naudojant šešių pradmenų rinkinį (A3, MP4, 270-6, 380-3, 470-8, 470-9), RAPD metodu buvo genotipuoti visi tirtieji 49 paprastosios avietės pavyzdžiai (42% visos genetinės kolekcijos). Kadangi nei su vienu tyrimu naudotu pradmeniu nebuvo gauta 100% skirtingų RAPD fenotipų, tai mes atrinkome derinius po du pradmenis (470-8 ir 270-6, MP4 ir 270-6, MP4 ir 470-8, 470-9 ir 470-8), su kuriais galima identifikuoti visus tirtus paprastosios avietės pavyzdžius. Su šiais pradmenų deriniais būtų galima genotipuoti ir likusią paprastosios avietės kolekcijos dalį.

Panašaus pobūdžio darbuose pažymima, kad vertingi kolekcijos pavyzdžiai yra tie, kuriuose aptikti individualūs RAPD lokusai, nes jie gali būti naudojami selekcinuose darbuose, ieškant genų, koduojančių retus požymius (Garkava–Gustavsson ir kt., 2005). Individualūs lokusai taip pat palengvina kolekcinio pavyzdžio identifikaciją. Mūsų darbe tiriant 20 kolekcijos pavyzdžių, buvo gauti 24 genotipui specifiniai RAPD lokusai, o tiriant didesnę pavyzdžių skaičių (49) su mažesniu pradmenų kiekiu, aptiktas tik vienas genotipui specifinis RAPD lokusas.

Genetinės įvairovės įvertinimui naudojami įvairūs genetinių atstumų skaičiavimo metodai. Savo darbe mes naudojome genetinius atstumus, apskaičiuotus pagal Nei ir Li (1979). Šį genetinių atstumų skaičiavimo būdą savo darbuose naudoja daug tyrėjų (Nanda ir kt., 2004; Graham ir kt., 1997; Badjakov ir kt., 2006). Naudodami Nei ir Li genetinius atstumus, mes nubraižėme tirtų genotipų panašumo dendrogramą, lyginome juos su morfologiniais bei geografiniais euklidiniais atstumais. Genetinius atstumus tarp paprastosios avietės kolekcijos pavyzdžių apskaičiavome ir kitais skaičiavimo

metodais: pagal Link (1995) ir naudojant paprastąjį jungimą (Sokal, Michener, 1958). Visais atvejais genetiniai atstumai, apskaičiuoti paprastosios avietės kolekcijos pavyzdžiuose, patikimai koreliavo tarpusavyje.

Morfologinių žymenų panaudojimas paprastosios avietės kolekcijai tirti. Morfologiniai požymiai, nors ir priklauso nuo aplinkos sąlygų, augalo individualios raidos, gana dažnai naudojami genetinei įvairovei tirti. Dažniausiai morfologiniai požymiai būna patys pirmieji požymiai, pagal kuriuos augalai atrenkami į genetines kolekcijas. Yra augalų, kurių morfologinė įvairovė būna netgi akivaizdesnė negu molekulinė. Karhu ir kt., tirdami paprastosios pušies populiacijų struktūrą įvairiais molekuliniais žymenų metodais, nustatė labai silpną diferenciaciją tarp pušies populiacijų, nors morfologiškai jos ryškiai skyrėsi (Karhu ir kt., 1996).

Paprastosios avietės kolekcijoje stebėjome įvairius kiekybinius ir kokybinius požymius. Norėdami įsitikinti, kad morfologiniai požymiai nepriklauso nuo radavietės dirvožemio rodiklių ir ekologinių sąlygų, juos matavome kelis metus. Iš daugelio stebėtų požymių kolekcijos morfologiniam aprašymui ir įvertinimui buvo pasirinkta 13 kiekybinių morfologinių požymių. Kokybiniai požymiai (pvz., augalo lapų, stiebų spalva, dygliuotumo, plaukuotumo pobūdis) varijavo priklausomai nuo augalo vystymosi stadijos, todėl į tyrimą jų neįtraukėme. Penkerių stebėjimo metų bėgyje kolekcijoje buvo pastebėtas kai kurių morfologinių požymių (lapų, viršūninių lapelių dydžio) „smulkėjimas“, primokanų skaičiaus didėjimas. Manoma, kad tam įtakos turėjo kolekcijos priežiūra: vegetacijos metu kelis kartus apariami tarpai tarp eilių, taip sudaromos sąlygos avietėms laisviau plėstis ir išauginti daugiau stiebų, kurie išauga plonesni ir smulkesniais lapais. Kai kurie kolekcijos pavyzdžiai buvo išgenėjami, nes jie požeminėmis atžalomis skverbėsi į kitų pavyzdžių užimamus plotus, o išgenėti augalai kitais metais išaugino stambesnius stiebus ir didesnius lapus bei vaisius. Kaulavaisių skaičius vaisiuose priklausė ir nuo klimato sąlygų – sausą vasarą kaulavaisių kiekis vaisiuje didėjo, tačiau kaulavaisiai smulkėjo. Esant palankiam drėgmės ir temperatūros režimui, vaisiai išaugo stambesni, gražesni, kaulavaisių buvo mažiau, tačiau jie sultingesni ir didesni.

Apibendrinę kelių metų paprastosios avietės kolekcijos morfologinius stebėjimus, išskyrėme pavyzdžius, kurie pasižymėjo didesniais ar mažesniais lapais, išaugina aukštesnius ar žemesnius florikanus. Stambesnius lapus užauginantys kolekcijos pavyzdžiai JL08, JL10, JL36, JL72 taip pat pasižymėjo ir aukštesniais florikanais, ir šiais požymiais, matuojant juos kelis metus iš eilės, išsiskirdavo iš kitų kolekcijos pavyzdžių. Stambiausi vaisiai būdingi kolekcijos pavyzdžiams JL32, JL35, JL45, SS01. Smulčiausiais morfologiniais požymiais išsiskyrė kolekcijos pavyzdžiai JL13, JL15, JL19, JL39 ir JL54.

Laukinės avietės akivaizdžiai morfologiškai skiriasi nuo kultūrinių. Galimas dalykas, kad ir į paprastosios avietės kolekciją galėjo pakliūti sulaukėję kultūriniai augalai. Kaip rašo Ryabova (2007), sulaukėjusias paprastosios avietės formas galima atskirti, remiantis kai kuriais morfologiniais požymiais: kultūrinių aviečių viršūniniai lapeliai yra platesni, apvalesnės formos, nei laukinių. Laukinėms avietėms būdingi ilgesni sudėtiniai lapai, viršūniniai ir šoniniai lapeliai bei lapkočiai. Plačiais ovališkais viršūniniais lapais išsiskiria kolekciniai pavyzdžiai JL32 ir JL36, kurių radavietės buvo netoli gyvenamųjų namų, todėl galima manyti, kad šie individai gali būti „pabėgę“ iš žmogaus auginamų avietynų.

Kolekcijos pavyzdys JL01 iš Lazdijų raj., Dusios išsiskyrė iš kitų kolekcijos pavyzdžių savo vaisiais, kurie prinokę subyra į atskirus kaulavaisius. Tai nebūdinga paprastajai avietei. Šis genotipas sudarė atskirą atšaką ir pagal Nei ir Li genetinius atstumus nubraižytose dendrogramose, tiek tiriant 20 kolekcijos pavyzdžių, tiek ir 49. Galbūt platesni tyrimai kitais metodais padėtų išsiaiškinti, ar tai nėra paprastosios avietės hibridas su kita *Rubus* genties rūšimi.

Nemažai paprastosios avietės kolekcijos pavyzdžių išsiskyrė derėjimu du kartus per sezoną. 2005–2007 metų bėgyje vienerius metus dukart per sezoną vaisius vedė kolekcijos pavyzdžiai: JL01, JL05, JL08, JL12, JL15, JL22, JL33, JL34, JL44, JL47, JL61, JL64, JL65, LB01, LB02 IR SS01; dvejus metus – JL02, JL04, JL06, JL14, JL16, JL42, JL45; o visus trejus metus – JL19 (Jurbarko raj., Lenkčiai) ir JL20 (Kauno raj., Girionys). Paprastai tokia savybė būdinga kultūrinėms avietėms ir ja naudojamosi išvedant remontantines veisles.

Jei laukinėse avietėse aptinkama ši ypatybė, tai tokie kolekcijos pavyzdžiai gali būti naudojami kaip genų donorai selekcijoje.

Stebint paprastosios avietės fenologiją lauko kolekcijoje, buvo pastebėta, kad vienos avietės buvo ankstyvesnės už kitas, pvz., kolekcijos pavyzdžiai JL17 (Klaipėdos raj., Nida), JL44 (Vilkaviškio raj., Gurbšilis) ir JL47 (Švenčionių raj., Mociškė) ankstyviausiai išskleidė lapus, pradėjo žydėti ir megzti vaisius. Kolekcijos pavyzdžiai JL06 (Trakų raj., Spindžius), JL07 (Vilniaus raj., Kairėnai), JL09 (Panevėžio raj., Ustronė), JL23 (Vilniaus raj., Mažoji Kuosinė), atvirkščiai, vėliausiai išskleidė lapus, pradėjo žydėti ir megzti vaisius. Anksti vegetaciją pradedantys augalai gali būti patrauklūs selekcininkams, tačiau, iš kitos pusės, tokie augalai Lietuvos sąlygomis gali nukentėti pavasarinių šalnų metu. Praktiškiausia būtų auginti tokias avietes, kurios pradeda skleisti lapus vėliau, o laikotarpis tarp lapų skleidimo ir žydėjimo būtų trumpas. Tokiomis savybėmis pasižymėjo kolekcijos pavyzdžiai JL03, JL18, JL20, JL25, JL34, JL39, JL41, JL42 ir SS01.

Panašumo medis, gautas UPGMA klasterių metodu, remiantis 13–os morfologinių požymių euklidiniais atstumais, gana vaizdžiai atspindi skirtumus tarp paprastosios avietės genetinės kolekcijos pavyzdžių – individai, kurių morfologiniais požymių skaitinės reikšmės buvo didesnės, jungiasi į vieną grupę, o individai, kurių mažesnės – į kitą. Skirtumai tarp šių abiejų grupių buvo patikimi.

Molekulinių ir morfologinių žymenų efektyvumo palyginimas. Jau seniai pastebėta paprastosios avietės morfologinių požymių įvairovė. Koreliacijas tarp morfologinių požymių ir molekuliniiais metodais gautų genetinių atstumų tyrė škotų mokslininkai. Dar 1964 metais Jennings pastebėjo, kad paprastosios avietės pavyzdžiai iš skirtingų Škotijos vietovių skyrėsi morfologiškai. Augalai, kilę iš atšiauresnių vietovių, kurios buvo ir kalnuotos, pasižymėjo vėlesne vegetacija ir išaugindavo žemesnius stiebus su trumpesniais tarpubambliais. Kalnuotose vietovėse skiriasi temperatūra bei vėjuotumas, todėl ten augantys augalai pasižymi lėtesne vegetacija, jų žiedai susiformuoja vėliau. Morfologinius skirtumus tarp šiaurinių ir pietinių

paprastosios avietės populiacijų Škotijoje pastebėjo ir kita mokslininkų grupė (Marshall ir kt., 2001). Jie tyrė augalų, augančių natūraliomis sąlygomis ir perkeltų į šiltnamius, morfologinių požymių skirtumus. Avietės skyrėsi šiais morfologiniais požymiais: pirmamečio stiebo aukščiu ir krūmo architektūra, žiedų skaičiumi ant antramečio stiebo. Stiebo aukštis, skersmuo ir lapo plotas koreliavo su radaviečių altitudėmis ir priklausė nuo geografinių atstumų tarp augalų. Avietės, augančios žemesnėse vietovėse, auga tarp kitų, vešlių ir aukštų augalų (dilgėlių, gervuogių, įvairių medžių sėjinukų), todėl jos stiebiasi aukštyn (išaugina aukštesnius stiebus). Avietės, augančios aukštesnėse vietovėse, auga tarp žolinių augalų, kurių vegetacijos periodas yra žymiai trumpesnis, jas nuolat veikia vėjas ir apgraužia gyvūnai, todėl jos ir auga horizontaliai – plinta atžalomis. Kiti morfologiniai požymiai koreliavo šiek tiek silpniau (Marshall ir kt., 2001).

Lietuvoje reljefas vienodesnis negu Škotijoje. Mūsų tirtų avietės kolekcijos pavyzdžių radaviečių aukštis virš jūros lygio svyravo nuo 3 m (JL17, Klaipėdos raj., Nida) iki 262 m (JL23, Vilniaus raj., Mažoji Kuosinė). Savo darbe mes taip pat nustatėme patikimą neigiamą koreliaciją tarp stiebo aukščio ir radavietės aukščio virš jūros lygio ($r=-0,304$, $p=0,03$).

Palyginę savo darbe molekulinį žymenų pagalba gautus Nei ir Li genetinių atstumų ir morfologinių požymių euklidinių atstumų matricas, negavome jų koreliacijos ($r=0,073$, $p=0,01$).

Įvairiuose panašaus pobūdžio darbuose, tiriant priklausomybę tarp morfologinių požymių ir genetinių atstumų, gaunami prieštaringi rezultatai. Vienų autorių nuomone, RAPD metodu gali būti aptinkama tokia priklausomybė, kiti jos nenustatė. Sensoy ir kt. (2007), tirdami meliono *Cucumis melo* genetinę įvairovę RAPD metodu ir panaudoję 61 morfologinį požymį, nustatė patikimą koreliaciją tarp abiejų požymių matricų (Nei genetiniai ir morfologiniai euklidiniai atstumai koreliavo neigiamai, $r=-0,40$).

Wang ir kt. (2006), tirdami ašuotės *Stipa krylovii* morfologinę ir genetinę variaciją, nerado priklausomybės tarp RAPD žymenų ir 20-ies kiekybinių morfologinių požymių, nors skirtingomis ekologinėmis sąlygomis augančiuose

augaluose morfologiniai požymiai pastebimai įvairavo. Miežiuose *Hordeum spontaneum*, augančiuose skirtingomis ekologinėmis sąlygomis, taip pat buvo stebėtas morfologinių požymių variavimas ir regioninis pasiskirstymas, tačiau morfologinių požymių koreliacijos su baltymų bei molekuliniais žymenais genetinė įvairovė negauta (Volis ir kt., 2005). Panašaus pobūdžio darbe, tiriant lelijos *Lilium longiflorum* var. *scabrum* genetinę įvairovę RAPD metodu ir naudojant morfologinius požymius, taip pat negauta patikimos koreliacijos tarp molekuliniai ir morfologiniai žymenai (Wen, Hsiao, 1999).

Tiriant melionui giminingo ilgmoliūgio *Lagenaria siceraria*, kuris taip pat pasižymi didele morfologinių požymių įvairove, genetinė įvairovė įvairiose Kenijos provincijose, nebuvo gauta koreliacijos tarp RAPD žymenų ir morfologinių požymių, tačiau kartumu pasižyminčiose ilgamoliūgio veislėse nustatytos dvi specifinės RAPD juostos (Morimoto ir kt., 2006). Mūsų darbe SAS GENMOD metodu taip pat buvo nustatytas ryšys tarp 12-os RAPD lokusų alelių ir morfologinių požymių skaitinių reikšmių.

Kolekcijose, auginant augalus vienoje vietoje ir vienodomis lauko sąlygomis, morfologinių požymių stebėjimas, matavimas ir vertinimas yra daug laiko reikalaujantis procesas. Kolekcijų ir gamtinių populiacijų genetinės įvairovės vertinimas vien morfologiniais požymiais yra abejotinas, nes augalo morfologiniai požymiai per daug priklauso nuo aplinkos pokyčių. Nors daugelyje darbų ryškios koreliacijos tarp morfologinių požymių variacijos ir molekuliniai žymenai diferenciacijos paprastai nenustatomos, vis tik abiejų metodų derinys dažnai naudojamas praktikoje (Wang ir kt., 2006; Johnson ir kt., 2007; Khan ir kt., 2009).

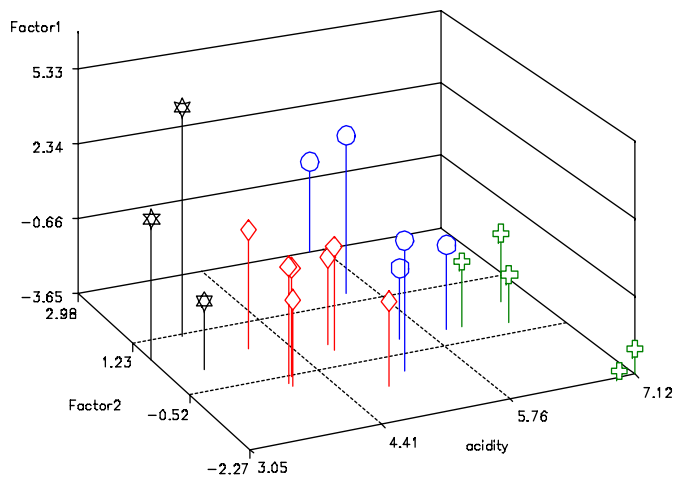
Paprastosios avietės kolekcijos pavyzdžių morfologinių požymių ir molekuliniai žymenai tyrimas puikiai papildo vienas kitą. Panaudojus abu metodus buvo parodyta didelė genetinė įvairovė kolekcijos imtyje. Morfologinių požymių stebėjimas ir matavimas augalų genetinėse kolekcijose turi praktinės reikšmės, nes leidžia įvertinti saugomą medžiagą ūkiniu požiūriu.

Augavietės edafinių savybių įtakos RAPD polimorfizmui tyrimas.

Tiriant priklausomybę tarp avietės augaviečių dirvožemio savybių ir 20-ies

geriausiai ištirtų kolekcijos pavyzdžių 230–ies RAPD lokusų pasiskirstymo, gauta žymi neigiama koreliacija tarp dirvos rūgštumo ir RAPD fenotipų faktorinės analizės rezultatų ($r=-0,65$, $p\leq 0,01$). Paprastosios avietės kolekcijos pavyzdžių pradinių augaviečių rūgštumas svyravo nuo 3,05 (JL16) iki 7,71 (JL56).

Gauti rezultatai rodo, kad tirtų individų augavietės ekologinės sąlygos (dirvožemio rūgštumas) galėjo turėti įtakos jų genetinei struktūrai. Priklausomai nuo aplinkos, gamtinės atrankos poveikyje, šiuose individuose išitvirtino atitinkami genetiniai lokusai. Šią tendenciją iliustruoja ir trimatis grafikas (31 pav.).



31 pav. 20–ies paprastosios avietės genotipų pasiskirstymas, gautas principinių komponentų analizės metodu priklausomai nuo polimorfinių RAPD lokusų ir augavietės dirvožemio pH. Skirtingi simboliai rodo skirtingu dirvožemio rūgštumu pasižyminčius kolekcijos pavyzdžius: ☆ – pH = 3–4, ◇ – pH = 4–5, ○ – pH = 5–6, † – pH = 6–7,12

Tačiau tiriant tą pačią priklausomybę tarp 49–ių kolekcijos pavyzdžių su žymiai mažesniu RAPD lokusų skaičiumi (48), negauta jokios priklausomybės tarp dirvožemio rodiklių ir RAPD pasiskirstymo dėsningumo. Manome, kad tyrime su 49–iais kolekcijos pavyzdžiais nebuvo įtraukti adaptaciniu požiūriu svarbūs RAPD lokusai. Visgi, šiame tyrime buvo

nustatyta kai kurių RAPD lokusų pasiskirstymo tirtuose augaluose priklausomybė nuo dirvožemio cheminių savybių (rūgštumo, fosforo ir kalio kiekio).

Susidomėjimas molekuline adaptacijų prigimtimi ir DNR žymenų panaudojimas jų tyrimui yra aktualu. Iki šiol neatsakyta į pagrindinį klausimą, koku mastu ir kaip koduojanti ir nekoduojanti augalų genomo dalys daro įtaką organizmų bei populiacijų prisitaikymui, ir kaip jas veikia gamtinė atranka.

Adaptyvi augalų DNR variacija tiriama naudojant įvairius DNR žymenų metodus: RAPD, SSR, AFLP, SNP, retrotranspozonus įvairiose organizmų taksonominėse grupėse (Nevo, 2001). Šie tyrimai įtikinamai parodė, kad aplinkos stresas ir ekologinės sąlygos veikia tiek koduojančią, tiek nekoduojančią genomo DNR. Aplinkos sąlygų įtaka DNR polimorfizmui įvertinta RAPD metodu daugelyje augalų rūšių: pušyse (Karhu ir kt., 1996), laukiniuose miežuose (Owuor ir kt., 1997; Owuor ir kt., 1999; Volis ir kt., 2001), kviečiuose (Fahima ir kt., 1999), fitolakose *Phytolacca dodecandra* (Semagn ir kt., 2000), *Yushania niitakayamensis* (Hsao, Lee, 1999), *Schizachyrium scoparium* (Huff ir kt., 1998). Daugelyje šių tyrimų buvo nustatyta, kad RAPD, kaip ir kitų molekulinųjų žymenų lokusus veikia gamtinė atranka. RAPD metodu tiriant kviečius *Triticum dicoccoides*, kurie augo skirtingo apšvietimo sąlygomis – vieni po medžiais, beveik visą dieną pavėsyje, o kiti – šiek tiek toliau, kur pavėsio nebūna, buvo nustatyti 20% DNR skirtumai tarp abiejų grupių augalų (Li ir kt., 1999). Manoma, kad juos nulėmė aridinės aplinkos sąlygos, sukeliančios stresą. Jau anksčiau atlikti šių augalų alozimų tyrimai patvirtino faktą, kad abiejų nišų augalai skiriasi – alozimų polimorfizmas buvo didesnis streso sąlygomis augančiuose kviečiuose. Be to, buvo stebima rezultatų, gautų įvairiais molekuliniais žymenų metodais, koreliacija (Nevo, 2001).

SOD polimorfizmo paprastosios avietės kolekcijos pavyzdžiuose tyrimai. Aplinkos veiksnių įtakai tirti kartu su genetiniais žymenimis naudojami ir biocheminiai (izofermentų) žymenys. Aplinkos veiksniai, tarp jų ir antropogeniniai (rūgštūs lietūs, šiltnamio efekto sukeliama reiškiniai,

netinkamų agrocheminių priemonių naudojimas ir t.t.) dažnai sukelia oksidacinį stresą. Antioksidacinių apsauginių sistemų, ypač fermentinių, kurios inhibuoja organinių molekulių oksidaciją, tyrimas įgyja vis didesnę reikšmę ne tik maistinių kultūrų derlingumo didinimui, bet ir bioįvairovės išsaugojimui (Kleijn ir kt., 2008; Cheruth ir kt., 2009).

Mūsų tirtų paprastosios avietės augaviečių dirvožemio rūgštumas svyravo nuo labai rūgščių (pH 3,05) iki neutralių (pH 7,02). Edafinių dirvos savybių poveikio SOD polimorfizmui tyrimas parodė, kad paprastosios avietės kolekcijos pavyzdžiams būdinga genetinė įvairovė, kuri lemia augalų tolerantiškumą augavietės dirvos rūgštingumui. Tai patvirtina ir kitų autorių duomenis, kad avietė yra tolerantiška dirvožemio rūgštumui ir gali augti esant įvairiam substrato pH (Watson, 1980; Ozolnīcius, 2004). Dvidešimties paprastosios avietės kolekcijos pavyzdžių, pradiniam darbo etape ištirtų RAPD metodu, augaviečių dirvožemio rūgštumo įtakos SOD polimorfizmui tyrimo rezultatai rodo, kad avietės augalams būdinga lokali adaptacija dirvožemio rūgštumui: kolekcijos pavyzdžių suskirstymas pagal SOD izozimų tipus į šešias grupes akivaizdžiai parodo SOD polimorfizmo priklausomybę nuo dirvožemio pH. Įdomu tai, kad VI – asis SOD izozimų tipas, turintis tik dvi izoformas, buvo būdingas net aštuoniems kolekcijos pavyzdžiams, kurie augo rūgščiame (vidutiniškai 3,97 pH) dirvožemyje, dažnai kirtimuose, kai tuo tarpu neutraliame dirvožemyje augusių augalų lapuose aptikome 8 SOD izoformas (14 pav.). Rūgščiuose dirvožemiuose (pH<5,5) padidėja Al druskų tirpumas, keičiasi P, N ir kitų maisto medžiagų metabolizmas augale. Tai gali sukelti oksidacinį stresą. Šiuo metu mažai žinoma apie rūgščių dirvožemių poveikio antioksidaciniams fermentams mechanizmus. Be to, vieni autoriai laikosi nuomonės, kad pvz., Al-tolerantiškuose augaluose padidėja SOD aktyvumas (Dong, 2002), kiti teigia, kad sumažėja (Boscolo, 2003).

Ren ir kt (1999), tirdami gysločio *Plantago major* lapų SOD polimorfizmo priklausomybę nuo augavietės altitudės nustatė, kad didėjant aukščiui, SOD izozimų skaičius mažėja. Šie pavyzdžiai ir mūsų gauti rezultatai rodo, kad SOD polimorfizmas susijęs su augalų prisitaikymu prie aplinkos

sąlygų. Nors mūsų darbe SOD polimorfizmo tyrimai nebuvo plačiau išvystyti, manome, kad SOD polimorfizmas ir papildomai šio fermento aktyvumo tyrimų rezultatai yra tinkamas žymuo augalų prisitaikymui prie konkrečių sąlygų tirti.

2. Genetinės įvairovės tyrimas gamtinėse paprastosios avietės populiacijose

RADP metodas plačiai naudojamas augalų populiacijų tyrimams (Nybom, Bartish, 2000). Šiuo metodu nustatoma tiriamų populiacijų struktūra, genetinė įvairovė populiacijos viduje, populiacijų diferenciacija. Tiriant genetinę įvairovę populiacijų viduje, RADP metodas yra žymiai jautresnis, palyginti su alozimų metodais, nes jo pagalba galima identifikuoti atskirus genotipus.

Atlikę paprastosios avietės kolekcijos tyrimus ir siekdami geriau įvertinti šios rūšies genetinius išteklius Lietuvoje, mes atlikome ir 19-os populiacijų iš įvairių agro klimatinių regionų tyrimus. RAPD analizei buvo pasirinkti 8 oligonukleotidiniai pradmenys (P1, MP4, 270-1, 270-6, 380-3, 380-6, 380-9, 470-8), su jais ištirta 315 individų. Su šiais pradmenimis gauta 113 RAPD žymenų, kurių 96 buvo polimorfiški tirtose populiacijose. Įvairių autorių darbai rodo, kad toks pradmenų kiekis yra pakankamas populiacijų struktūros nustatymui, pvz. tiriant raktažolės *Primula farinosa* 10 populiacijų, buvo pasirinkti 9 pradmenys ir jų pagalba ištirti 107 individai, gauti 96 RAPD fragmentai. Tyrimas parodė, kad visi tirtieji augalai buvo genetiškai skirtingi (Reisch ir kt., 2005). Rėpliojančiojo vėdryno (*Ranunculus reptans*) populiacijų struktūra tirta, naudojant 10-ies pradmenų rinkinį, ištirti 127 augalai iš 14 populiacijų, gauti 124 skirtingi RAPD fenotipai (Fischer ir kt., 2000). Nybom ir Bartish, apibendrinę 108 populiacijų tyrimų RAPD metodu rezultatus nustatė, kad ištyrus vidutiniškai 8 populiacijas po 17 augalų iš kiekvienos populiacijos, buvo nustatytas vidutiniškai 71 RAPD žymuo. Atlikta analizė parodė, kad nebuvo koreliacijos tarp polimorfinių lokusų ir ištirtų augalų skaičiaus. Ištirtų populiacijų skaičius, individų skaičius populiacijoje bei

polimorfinių RAPD lokusų skaičius taip pat neturėjo įtakos populiacijų genetinę diferenciaciją atspindintiems rodikliams Φ_{ST} , G_{ST} ir H_{pop} (Nybom, Bartish, 2000).

Mūsų atliktuose tyrimuose buvo gauta 17 monomorfinių lokusų (monomorfiniais laikyti tie, kurių dažnis visose populiacijose siekė daugiau nei 95%). Jie nebuvo įtraukti į RAPD analizę. Monomorfinių lokusų aptikimas leidžia daryti prielaidą, kad jie gali būti būdingi rūšiai ar aukštesniam taksonui (Rodriguez ir kt., 1999).

Vidutinis polimorfizmas paprastosios avietės populiacijose buvo $76,26 \pm 5,50\%$ ir savo reikšme labai artimas mūsų nustatytam 49–iuose kolekcijos pavyzdžiuose ($77,83 \pm 9,15\%$). Mūsų tyrimai taip pat parodė, kad 98% alelių, nustatytų su septyniais pradmenimis (pradmuo P1 nebuvo naudojamas kolekcijos tyrimuose) paprastosios avietės populiacijose, buvo nustatyti ir VU Botanikos sodo kolekcijoje. Tai rodo, kad VU Botanikos sodo paprastosios avietės kolekcija objektyviai atspindi šios rūšies genetinę įvairovę Lietuvos teritorijoje. Atskirose avietės populiacijose polimorfizmas svyravo nuo 66,67% iki 87,50% ir buvo didesnis nei kitų autorių nustatytas polimorfizmas kryžmadulkiuose daugiamečiuose augaluose, kurių vaisius taip pat platina gyvūnai. Šaltalankio, kuris pasižymi panašia gyvenimo strategija, polimorfizmas populiacijose buvo 55,18% (Bartish ir kt., 1999), kryklės populiacijose nustatytas tik 34,3% polimorfizmas (Jordano, Godoy, 2000).

Nybom ir kt. (2000) savo apžvalgoje nurodo, kad populiacijos imties dydis neturi didelės įtakos populiacijų rodikliams. Mūsų darbe imties dydis svyravo nuo 9 augalų iš Nemirsetos populiacijos iki 23 augalų iš Rokų populiacijos. Nustatyti pagrindiniai populiacijų genetinės įvairovės rodikliai (polimorfizmas, efektyvių alelių skaičius, polimorfinių lokusų skaičius, Nei genų įvairovė, Shannon'o indeksas) teigiamai koreliavo su imties dydžiu, o skirtingų RAPD fenotipų skaičius populiacijose neigiamai koreliavo su imties dydžiu. Norėdami įsitikinti, jog skirtingos imtys mūsų tirtose paprastosios avietės populiacijose neturėjo įtakos pagrindiniams populiacijų rodikliams, kiekvienoje populiacijoje sumažinome individų skaičių iki dešimties individų

(išskyrus Nenirsetos populiaciją, kurios buvo tirta 9 augalai) ir vienodos imties populiacijose vėl apskaičiavome genetinės įvairovės rodiklius (30 lentelė).

Vienodos imties populiacijose vidutinės genetinių rodiklių vertės buvo šiek tiek mažesnės. Polimorfizmas, stebėtų ir efektyvių alelių skaičius, Nei genų įvairovė ir Shannon'o indekso didžiausios reikšmės, kaip ir buvo, išliko Švarcgirio populiacijoje. Roku populiacija taip pat išsaugojo dideles polimorfizmo ir stebėtų alelių reikšmes. Mažiausia genetinė įvairovė prieš populiacijų imčių suvienodinimą pasižymėjo Margių ir Šiulgų populiacijos, o vienodos imties populiacijų tarpe – Dieveniškių populiacija. Matyt, Dieveniškių populiacijoje dėl specifinių sąlygų individai pasižymėjo gana panašiais genotipais. Efektyvių alelių skaičius ir Nei genų įvairovė išliko mažiausi Margių populiacijoje. Populiacijų genetinio panašumo dendrograma suvienodinus augalų skaičių imtyje, beveik nepakito (neparodyta). Taigi, šis tyrimas parodo, kad populiacijų genetinės įvairovės rodikliams populiacijų imties dydis neturėjo didelės reikšmės.

Paprastoji avietė įsikuria įvairiose augavietėse: kirtimuose, gaisravietėse, miškų aikštelėse, pagrioviuose, paežerėse ir pamiškėse. Tai šviesą mėgstantis augalas, plačiai įsikuriantis atviruose plotuose, kur nėra konkurencijos su aukštesniais augalais, savo intensyvaus augimo ir plėtimosi metu netgi nustelbia eglių ir pušų sėjinukus.

Naujos augalų populiacijos susikuria keliais būdais. Literatūros duomenimis, paprastosios avietės populiacijos susikūrimas *de novo* paprastai vyksta miško plote, kuriame dėl kokių nors priežasčių (audros, miško kirtimo ar tvarkymo darbų, gaisro) atsiranda proskynos („langai“) su suardytu dirvos paviršiumi (Давлетшина, Уланова, 1996). Tokiame plote saulės poveikyje greičiau irsta organinės medžiagos ir lengviau sudygsta augalų sėklos. Paprastosios avietės sėklos pasižymi dideliu gyvybingumu ir sunkiu dygimu. Nors literatūroje nurodoma, kad gamtinėse populiacijose dauguma paprastosios avietės sėklų sudygsta per pirmuosius 2–3 metus, tačiau nesudygusios sėklos sugeba praleisti ilgus metus dirvoje ramybės būsenoje, sudarydamos tam tikrą sėklų genobanką, iš kurio palankiomis sąlygomis sudygsta sėjinukai

(Tirmenstein, 1990). Jauni augalai naujai besikuriančioje populiacijoje gali būti sudyge ir iš sėklų, kurias platina paukščiai ar smulkūs žinduoliai. Tokios sėklos, perėjusios per virškinimo traktą, lengviau sudygsa. Taigi, paprastosios avietės naujai susidariusios populiacijos dažniausiai yra įvairių genotipų mišinys.

Mūsų atlikti paprastosios avietės populiacijų tyrimai parodė, kad netgi artimai augantys augalai skyrėsi genetiškai, pvz., Zoknių populiacijoje vienoje santalkoje augantys augalai rinkti maždaug kas 5–10 m, buvo genetiškai skirtingi. Mūsų tirtose paprastosios avietės populiacijose nebuvo rasta dviejų vienodų individų, visi tirti pavyzdžiai buvo genetiškai skirtingi. Beveik visose tirtose populiacijose atstumai tarp tyrimams renkamų individų buvo didesni nei 50 m, o panašumo dendrogramoje vienos populiacijos augalai sudarė atskiras grupes. Tai, kad nė vienoje tirtose paprastosios avietės populiacijoje nebuvo aptikta genetiškai identiškų ar labai genetiškai panašių individų, rodo, jog šios rūšies erdviniam plitimui populiacijoje svarbiausias yra lytinis dauginimasis.

Švedų mokslininkai, ištyrę vienos paprastosios avietės populiacijos 24-ių individų molekulinis fenotipus, neaptiko tarp jų vienodų (Antonius, Nybom, 1994). Graham su kolegomis teigia, kad paprastosios avietės pavyzdžius renkant kas 2 metrus, jų genetinis panašumas siekia 80–100%; esant 20 m atstumui – 60–100%, o kai atstumas tarp augalų 20 km – 40–70%. Motininio augalo ir jo sėjinukų panašumas buvo ne mažesnis nei 90% (Graham ir kt., 1997).

Vidupopuliacinė paprastosios avietės genetinė įvairovė. Genetiniai Nei ir Li atstumai (GD_{xy}) tarp visų tirtų 315 individų iš 19-os populiacijų buvo $0,267 \pm 0,034$, ir tai artima reikšmė, nustatyta ir paprastosios avietės kolekcijoje tarp 49-ių pavyzdžių ($0,280 \pm 0,060$). Genetiškai tarpusavyje panašiausi individai buvo Zoknių ($0,196 \pm 0,063$) ir Dieveniškių ($0,210 \pm 0,048$) populiacijose. Zoknių populiacijoje augalai buvo renkami gana nedideliais atstumais vienas nuo kito ir tai galėjo lemti jų didesnę genetinę panašumą. Dieveniškių populiacijoje augalai buvo renkami maždaug kas 50 m, jie augo šlapiame miške, todėl jų panašumą galėjo nulemti prisitaikymas prie savitų

vietos sąlygų. Didžiausias vidutinis genetinis atstumas tarp augalų nustatytas Salų populiacijoje ($0,329 \pm 0,060$). Panaši situacija buvo ir Roku populiacijoje, kuri buvo akivaizdžiai jauna, o arti jos augo kultūrinės avietės. Roku populiacijoje GD_{xy} buvo $0,305 \pm 0,06$. Anaičių populiacijoje dideli genetiniai atstumai ($0,306 \pm 0,06$) tarp augalų galėjo būti, atvirkščiai, dėl suskaidytos populiacijos. Kadangi tai karinio poligono teritorija, todėl atskiros subpopuliacijos atskirtos viena nuo kitos įvairiais barjeriais (statiniais, keliukais) ir tai apsunkina genetinius mainus tarp jų. Kurtuvėnų populiacijoje buvo dideli genetiniai atstumai ($0,307 \pm 0,06$) tarp augalų, nes jie buvo renkami didelėje Kurtuvėnų regioninio parko teritorijoje, fizikiniai atstumai tarp imties augalų buvo taip pat dideli. Paprastosios avietės skirtingų RAPD fenotipų skaičius atskirose populiacijose koreliavo su imties dydžiu ($r = -0,682$, $p = 0,001$) ir su vidutiniu genetiniu atstumu tarp augalų populiacijoje ($r = 0,720$, $p = 0,001$).

Unikalūs RAPD lokusai, nustatyti kai kuriose populiacijose, rodo paprastosios avietės populiacijų genetinį savitumą ir išskiria jas iš kitų avietės populiacijų tarpo. Mūsų darbe daugiausiai tokių išskirtinių RAPD lokusų (5) buvo gauta Dieveniškių populiacijoje. Šia savybe galima pasinaudoti, atrenkant pavyzdžius į genetines kolekcijas, nes tokie saviti lokusai gali būti susiję su populiacijų prisitaikymu prie vietos sąlygų.

Tarpopuliacinė paprastosios avietės genetinė įvairovė. Dauginimosi sistemos ypatumai, gyvenimo formų įvairovė, sėklų platinimo būdai ir geografinio paplitimo pobūdis yra glaudžiai susiję su genetinė variacija ir jos pasiskirstymu populiacijų viduje ir tarp populiacijų (Nybom, Bartish, 2000). Nybom (2004), apžvelgusi 307 straipsnius, kuriuose aprašyti branduolio DNR žymenimis paremti tarppopuliacinės ir vidupopuliacinės įvairovės tyrimai, nustatė, kad Φ_{ST} , G_{ST} ir H_{pop} reikšmės, gautos naudojant dominuojančiai paveldimus DNR žymenis (RAPD, AFLP ir ISSR), yra labai panašios ir gali būti tiesiogiai palyginamos. Dar anksčiau, apibendrinę skirtingų gyvenimo formų augalų populiacijų tyrimus, Nybom ir Bartish nustatė, kad Φ_{ST} rodo patikimesnius tarppopuliacinius skirtumus nei G_{ST} (Nybom, Bartish, 2000).

Paprastoji avietė – dvimetis augalas, nuolat atsinaujinantis šakninėmis atžalomis, todėl jis prilyginamas daugiamečiui. Daugiamečiai augalai pasižymi žymiai didesne vidupopuliacine įvairove, palyginus su vienmečiais (Nybom, Bartish, 2000). Mūsų tirtose paprastosios avietės populiacijose Φ_{ST} , apskaičiuota GenAlEx programa, buvo 0,258, o G_{ST} , apskaičiuota PopGene programa – 0,297. Palyginus su Nybom ir kt. nustatytais reikšmėmis, tiek Φ_{ST} , tiek G_{ST} buvo panašios į daugiamečiams ilgaamžiams augalams nustatytas reikšmes ($\Phi_{ST}=0,25$, $G_{ST}=0,23$). Nybom ir Bartish savo apžvalginiam darbe (2000) nurodo, kad kryžmadulkiams augalams būdinga didelė genetinė vidupopuliacinė įvairovė ir neryškiai išreikšta tarpregioninė diferenciacija. Vidupopuliacinė įvairovė, mūsų nustatyta paprastosios avietės populiacijose, buvo labai artima kitiems kryžmadulkiams augalams nustatytai genetinei įvairovei.

Paprastoji avietė – plačiai paplitęs augalas ir mūsų nustatyta G_{ST} reikšmė buvo artima tai, kuri nustatyta plačiai paplitusiems augalams. Didelę genetinę populiacijų įvairovę lemia ir tai, kad avietės yra kryžmadulkių augalai. Kryžmadulkių augalų populiacijoms būdinga mažesnė tarppopuliacinė genetinė įvairovė, nei savidulkių augalų populiacijoms.

Mūsų tirtų paprastosios avietės populiacijų Φ_{ST} ir G_{ST} reikšmės šiek tiek skyrėsi nuo vidutinių Φ_{ST} ir G_{ST} reikšmių, kurias kiti autoriai nustatė populiacijoms, kurių sėklas platina gyvūnai ($\Phi_{ST}=0,28$, $G_{ST}=0,17$) (Nybom, Bartish, 2000). Tačiau šių autorių pateiktos apibendrintos reikšmės nebuvo statistiškai patikimos. Be to, kaip buvo minėta, paprastosios avietės populiacijų susikūrimui naujoje vietoje turi įtakos ir dirvožemyje glūdintis sėklų bankas, o gyvūnų platinamos sėklos tik papildo jį.

Geografinės padėties įtaka paprastosios avietės genetinei įvairovei. Mūsų darbe tirtos paprastosios avietės populiacijos yra iš įvairių Lietuvos rajonų. Kai kurios populiacijos, tarp kurių geografiniai atstumai buvo nedideli, buvo panašios ir genetiškai (Salos ir Ilgiai, Margiai ir Šiulgos, Nemirseta ir Anaičiai, Vilkiutinis ir Prienai). Labiausiai geografiškai nutolusios buvo kraštinės populiacijos Lietuvos vakaruose ir rytuose bei pietryčiuose.

Koreliacinė analizė parodė nedidelę, tačiau patikimą koreliaciją tarp geografinių ir genetinių atstumų populiacijose ($r=0,232$, $p=0,002$), kuri buvo didesnė už nustatytą 49–iuose paprastosios avietės kolekcijos pavyzdžiuose ($r=0,124$, $p=0,001$). Suskirsčius atstumus tarp populiacijų po 50 km į 7 grupes, genetiniai atstumai didėjo, didėjant geografiniams atstumams tarp populiacijų.

Graham ir kt. (2003) tirdami erdviškai nutolusių paprastosios avietės populiacijų genetinę įvairovę Škotijoje Tayside vietovėje RAPD metodu, nustatė, kad geografiškai nutolusios populiacijos yra genetiškai diferencijuotos. Tiriant paprastosios avietės populiacijų diferenciaciją, pastebėta, kad genetinė įvairovė kito ne horizontalia, bet vertikalia kryptimi (kintant vietovės altitutei). Principinių koordinatinių metodų gauti rezultatai parodė tirtų aviečių populiacijų susigrupavimą į tris nutolusias grupes pagal altitudes. Genetinis panašumas tarp populiacijų mažėjo didėjant altitutei ir atstumui tarp tirtų populiacijų. Tirtoje teritorijoje altitudės svyravo nuo 5 iki 600 m virš jūros lygio, o nustatytas genetinės įvairovės pokytis vertikalia kryptimi buvo 4% kas 100 metrų. Didžiausias atstumas tarp 12 tirtų populiacijų buvo vos 40 km, taigi, genetinės įvairovės kitimas, priklausomai nuo geografinių atstumų, galėjo likti ir neįvertintas, nors ir buvo pastebėtas avietės morfologijos variavimas šiaurės – pietų kryptimi. Šiame darbe taip pat buvo parodyta, kad vienos populiacijos augalai tarpusavyje skyrėsi, galbūt dėl to, kad naujos paprastosios avietės populiacijos susidaro ne susiskaidant vientisai didelei populiacijai, bet iš naujo – sudygstant sėkloms. Paprastosios avietės populiacijos buvo erdviškai išsibarsčiusios, prisitaikiusios prie lokalių augavietės sąlygų, genetiškai diferencijuotos. Net ir labai artimos, augančios tomis pačiomis klimato sąlygomis aviečių populiacijos, kurias skyrė tik nedidelė upė, genetiškai buvo gana skirtingos (84% panašumo).

Graham ir kt. (1997), tirdami paprastosios avietės populiacijų ir kultivuojamų aviečių santykius RAPD metodu, dėsningumo tarp žymenų pasiskirstymo einant iš pietų į šiaurę neaptiko, nors labiausiai į šiaurę nutolusi populiacija turėjo daugiausia unikalių DNR juostų.

Tiriant bruknės gamtines populiacijas iš Švedijos, Suomijos, Norvegijos, Estijos, Rusijos, Japonijos ir Kanados, buvo aptikta žymi koreliacija tarp genetinių ir geografinių atstumų ($r=0,532$, $p<0,001$). Šiame tyrime neanalizuojant labiausiai nutolusių Japonijos ir Kanados bei kitam porūšiui priklausančias bruknių populiacijų, koreliacija liko pakankamai žymi ir statistiškai patikima ($r=0,475$, $p<0,001$), tačiau palyginus tarpusavyje vien tik Švedijos teritorijoje augančių bruknių populiacijas, ši koreliacija pasirodė esanti statistiškai nepatikima (Garkava–Gustavsson ir kt., 2005).

Nybom ir kt. taip pat pažymi, kad teigiama koreliacija tarp genetinių ir geografinių atstumų gana dažnai aptinkama kryžmadulkiuose augaluose (Nybom, Bartish, 2000).

Jogaitė ir kt., tirdami keturlapės vilkauogės (*Paris quadrifolia*) genetinę įvairovę Lietuvoje ir Norvegijoje, aptiko pakankamai didelę koreliaciją tarp genetinių ir geografinių atstumų ($r=0,775$, $p<0,001$), tačiau atskirai kiekvienoje šalyje tokia koreliacija buvo statistiškai nepatikima (Jogaitė ir kt., 2006). Literatūroje yra nemažai duomenų, kai koreliacijos tarp genetinių ir geografinių atstumų negauta, pvz., uolaskėlės *Saxifraga aizoides* (Lutz ir kt., 2000), mėlito *Sesleria albicans* (Reisch ir kt., 2003), bugienio *Ilex leuoclada* (Torimaru ir kt., 2003) bei kitų augalų populiacijų tyrimuose.

Daugelis autorių, tirdami įvairius augalus RAPD metodu, pabrėžia, kad kryžmadulkiams augalams būdinga didelė vidupopuliacinė genetinė įvairovė ir žymiai mažesnė tarpopuliacinė (Bartish ir kt., 1999; Jordano, Godoy, 2000; Nybom, Bartish, 2000). Tiriant mėlynės (*Vaccinium myrtillus*) 6 populiacijas molekulinės variacijos analizė (AMOVA) parodė, kad pagrindinė genetinė įvairovė pasiskirsčiusi populiacijų viduje (86,19%), o įvairovė tarp populiacijų yra tik 13,81%. Paprastoji mėlynė yra ilgaamžis augalas, pasižymintis mišria dauginimosi sistema – vegetatyviškai ir sėklomis. Bruknės populiacijose vidupopuliacinė genetinė įvairovė buvo 78,8% (Garkava–Gustavsson ir kt., 2005).

Dauguma augalų rūšių, kurios geba prisitaikyti prie įvairių aplinkos sąlygų, pasižymi fenotipiniu plastiškumu, ir tai pasireiškia kaip genetinė

diferenciacija tarp populiacijų bei populiacijų viduje (Müller–Schärer, Fischer, 2001). Palyginti nemažą avietės populiacijų genetinę diferenciaciją galima paaiškinti jų prisitaikymu prie lokalių sąlygų bei su tuo susijusiais genomo pokyčiais. Šią avietės savybę nurodo ir kiti autoriai (Marshall ir kt., 2001; Graham ir kt., 2003).

Mūsų darbe, populiacijas tarpusavyje palyginę AMOVA metodu trimis lygiais (tarp agroklimatinių regionų, populiacijų regionuose ir individų populiacijose) nustatėme, kad paprastosios avietės populiacijų genetinė diferenciacija yra 23%, o pagrindinė genetinė įvairovė pasiskirsčiusi populiacijų viduje – 74% ($p=0,001$). Tarpregioninei genetinei įvairovei teko tik 3% bendros genetinės įvairovės ($p=0,001$).

Mūsų nustatyta vidupopuliacinė genetinė įvairovė paprastosios avietės populiacijose labai panaši į Jordano ir Godoy (2000) apžvelgtą 13 medžių ir krūmų, kurių vaisius platina gyvūnai, RAPD metodu nustatytą vidupopuliacinę įvairovę (71,42%). Panašūs rezultatai buvo gauti tiriant kryžmadulčio paprastojo erškėčio (*Rosa canina*), kurio sėklas platina paukščiai, populiacijų genetinę įvairovę. Paaiškėjo, kad pagrindinė genetinės variacijos dalis (76–87%) teko individams populiacijų viduje, o atskiros populiacijos skyrėsi 13–24% (Jürgens ir kt., 2007). Kvapiosios kryklės (*Prunus mahaleb*) populiacijose pagrindinė genetinė įvairovė (81,77%) tenka individams populiacijose, 16,46% – populiacijoms regionuose ir 1,77% – regionams (Jordano, Godoy, 2000). Šio augalo populiacijos atskirtos geografiniais atstumais ir auga kalnuose, nors patikimos koreliacijos tarp genetinių atstumų ir geografinių atstumų bei altitudės negauta. Kryklės vaisius platinantys gyvūnai elgiasi dvejopai: vieni paukščiai minta tik vaisių minkštimu, o sėklas išmeta vietinėje populiacijoje, kiti paukščiai ir kai kurie žinduoliai išnešioja vaisius dideliais atstumais ir taip tikriausiai įtakoja genetinę įvairovę tarp populiacijų. Tiriant paprastosios pušies (*Pinus sylvestris*) šiaurinių ir pietinių populiacijų augalų prisitaikymą prie skirtingo temperatūros režimo, paaiškėjo, kad populiacijos pasižymėjo beveik vienoda genetinė struktūra, nebuvo gauta priklausomybės tarp

populiacijų genetinės įvairovės ir tirtu fenologinio reiškinių – pumpurų sprogoimo laiko (Karhu ir kt., 1996).

Skirtingomis ekologinėmis sąlygomis augančių paprastosios avietės populiacijų genetinės įvairovės tyrimai. Mūsų darbe buvo tirtos kelios paprastosios avietės populiacijos, kurios augo viena netoli kitos, tačiau skirtingomis ekologinėmis sąlygomis: Baltosios Vokės ir Melekonių, Margių ir Šiuļgų bei Anaičių ir Nemirsetos populiacijos. Didžiausi genetiniai skirtumai buvo aptikti Baltosios Vokės durpyno ir šalia esančio Melekonių miško paprastosios avietės populiacijose. Šios abi populiacijos skyrėsi ekologinėmis sąlygomis – skirtingu drėgmės ir šviesos režimu. Kaip matyti iš dendrogramos (25 pav.), Melekonių miško avietės giminingesnės tarpusavyje, jos sudaro dvi stambesnes grupes, o durpyno augalai genetiškai labiau skirtingi. Genetinius skirtumus tarp Baltosios Vokės augalų tikriausiai apsprendė gamtiniai barjerai (atviro vandens ploteliai) bei tai, kad populiacija yra jaunesnė, susikūrusi tikriausiai iš paukščių atneštų sėklų. Genetinius skirtumus taip pat galėjo nulemti ir durpyno aviečių adaptacija prie rūgštingesnio dirvožemio bei geresnių apšvietimo sąlygų. Abiejose šiose populiacijose aptikta ir nemažai specifinių lokusų. Tarp jų nustatyta gana didelė genetinė diferenciacija – 20%.

Kadangi populiacijas skiria nedidelė tik ~100 metrų pločio proskyna, genų srautas tarp populiacijų turėtų vykti gana laisvai. Nedidelę įtaką jam gali turėti ir nevienodas augalų gaunamas šviesos kiekis, dėl kurio šiek tiek skiriasi augalų žydėjimo laikas. Nepaisant izoliacijos tarp populiacijų nebuvimo, stebimą genetinę diferenciaciją dalinai galima paaiškinti natūralios atrankos, atsirandančios dėl skirtingų ekologinių sąlygų poveikiu. Li ir kt. (1999) tirdami kviečius *Triticum dicoccoides* augusius skirtingomis apšvietimo sąlygomis – saulės atokaitoje ir medžių pavėsyje, nustatė žymius skirtumus tarp abiejų augalų grupių.

Tiriant 25 mėlito *Sesleria albicans* populiacijas, augančias šešiuose skirtinguose augaviečių tipuose, stebėtas didelis polimorfizmas. Gauta molekulinė variacija tarp šešių skirtingų augaviečių tipų siekė 4,58% (Reisch ir

kt., 2003). Ši rūšis, kaip ir paprastoji avietė, yra labai plastiškas augalas, augantis įvairiose augavietėse.

Reisch ir kt., tirdami raktažolės pelenėlės populiacijas, augančias skirtingomis altitudėmis pasižyminčiose vietovėse, aptiko nemažą diferenciaciją tarp populiacijų, augančių žemiau 1750 m virš jūros lygio ir aukščiau. Augalai iš aukštesnių vietų pasižymėjo ir didesne genetinė įvairove, kuri, matyt, lemia geresnį skirtingų genotipų prisitaikymą prie kintančių aplinkos sąlygų ir išgyvenimą stresinėmis sąlygomis (Reisch ir kt., 2005). Autoriai teigia, kad šie rezultatai, gauti RAPD metodu, neturėtų atspindėti aplinkos poveikio augalų diferenciacijai, nes RAPD žymenys, jų nuomone, yra neutralūs, ir pažymi, kad aukštesnėse altitudėse augalų žiedadulkės ir sėklos tiesiog gali laisviau judėti didesniais atstumais ir todėl populiacijos gerokai heterogeniškesnės negu žemiau augančių augalų, kurių plitimui trukdo miškai.

Paprastoji avietė, kaip ir kitos plačiai paplitę rūšys, gerai jaučiasi esant įvairioms aplinkos sąlygoms. Tokioms rūšims būdingas fenotipinis plastiškumas ir didelis genetinis kintamumas (Bradshaw, 1984; Joshi ir kt., 2001). Tačiau tokia adaptacijos strategija turi savo kainą: atskiri genotipai yra prisitaikę prie vietinių sąlygų ir netoleruoja visos rūšiai būdingos aplinkos sąlygų įvairovės. Specializuoti tam tikroms sąlygoms genotipai užima įvairias ekologines nišas. Tokiose rūšyse nėra genotipų, kurie būtų universalūs visose situacijose (Van Tienderen, 1990).

IŠVADOS

1. Paprastosios avietės kolekcijoje bei gamtinėse populiacijose nustatytas didelis DNR polimorfizmo lygis (atitinkamai 77,83% ir 76,26%).
2. Paprastosios avietės kolekcijos augalai skyrėsi morfologiniais ir fenologiniais požymiais. Kai kurie kolekcijos pavyzdžiai galėtų būti naudingi vertingų genų donorai paprastosios avietės selekcijoje.
3. Nustatytas RAPD fenotipų polimorfizmo sąryšis su augaviečių dirvožemio rūgštumu.
4. Nustatyta augavietės aukščio virš jūros lygio įtaka avietės kolekcijos pavyzdžių florikano aukščiui ($r=-0,304$, $p=0,03$).
5. Paprastosios avietės kolekcijos pavyzdžiuose neaptikta koreliacijos tarp morfologinių euklidinių ir genetinių atstumų. Objektiviam genetinių išteklių įvertinimui reikia naudoti tiek morfologinius, tiek genetinius žymenis.
6. Vietinės ekologinės ir mikroklimato sąlygos gali turėti įtakos paprastosios avietės populiacijų genetinei diferenciacijai.
7. Paprastosios avietės populiacijose didžioji genetinės įvairovės dalis tenka vidupopuliacinei genetinei įvairovei (74%). Genetinė diferenciacija tarp populiacijų sudaro 23%, o tarpregioninė genetinė įvairovė – 3%.
8. Nustatyta palyginti didelė paprastosios avietės populiacijų genetinė diferenciacija bei populiacijai savitų RAPD lokusų buvimas rodo kai kurių populiacijų genetinį savitumą, kuris gali būti svarbus genetinių išteklių išsaugojimui.
9. Paprastosios avietės populiacijų individų RAPD fenotipų unikalumas rodo, kad populiacijų plitimui yra svarbus lytinis dauginimasis.
10. Paprastosios avietės kolekcijos genetinė įvairovė pilnai atspindi gamtinėse populiacijose nustatytą genetinę įvairovę.

MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS

Moksliniai straipsniai paskelbti leidiniuose, įrašytuose į Mokslinės informacijos instituto (ISI) sąrašą:

1. J. Patamsytė, D. Žvingila, J. Labokas, V. Baliuckas, L. Balčiūnienė, V. Kleizaitė, V. Rančelis. 2008. Study of genetic diversity among in wild raspberry (*Rubus idaeus* L.) germplasm collection using morphological characters and markers. *Biologija* 2: 66–74.
2. J. Patamsytė, D. Žvingila, I. Mažonytė, V. Kleizaitė, V. Baliuckas, L. Balčiūnienė, V. Rančelis. 2005. Assessment of ecological impact on genetic diversity among populations of *Rubus idaeus* L. *Biologija* 4: 24–28.
3. J. Patamsytė, D. Žvingila, J. Labokas, V. Baliuckas, V. Kleizaitė, L. Balčiūnienė and V. Rančelis. 2004. Assessment of diversity of wild raspberries (*Rubus idaeus* L.) in Lithuania. *Journal of fruit and ornamental plant research* 12: 195–205.

Moksliniai straipsniai paskelbti kituose leidiniuose:

1. J. Patamsytė, D. Žvingila, L. Balčiūnienė, V. Baliuckas, J. Labokas, V. Kleizaitė, V. Rančelis. 2008. Genotyping of wild raspberry (*Rubus idaeus* L.) accessions with RAPD markers. Proceedings of the International symposium on new researches in biotechnology. Serie F: Biotechnology. Bucharest, 470–478.
2. L. Balčiūnienė, J. Labokas, J. Patamsytė. 2006. Field performance of wild *Rubus idaeus*. Kaunas. Baltic Botanic Gardens in 2004–2006. 51–56.
3. Ранчялис В., Бальчюнене Л., Вайткунене В., Варнайте А., Жвингила Д., Клейзайте В., Патамсите Й., Чеснене Т. 2005. Полиморфизм естественных и индуцированных мутантов растений по морфологическим и молекулярным маркерам. Ботанические сады как центры сохранения биоразнообразия и рационального использования растительных ресурсов. Москва. 422–424.

4. D. Žvingila, J. Patamsytė, V. Kleizaitė, J. Labokas, V. Baliuckas, L. Balčiūnienė, V. Rančelis. 2004. A study of genetic variability and adaptation in wild *Rubus idaeus* L. using molecular markers. *Biologija* 3: 21–26.
5. Й. Патамсита, Д. Жвингила, В. Клейзайте, В. Ранчялис, Ю. Лабокас, Л. Бальчюнене. 2004. Изучение генетической изменчивости *Rubus idaeus* L. в коллекции Ботанического сада Вильнюсского университета. Роль ботанических садов в сохранении и обогащении биологического разнообразия видов. Калининград. 229–231.

Konferencijų pranešimų tezės:

1. J. Patamsytė, D. Žvingila, L. Balčiūnienė, V. Baliuckas, J. Labokas, V. Kleizaitė, V. Rančelis. 2008. Genotyping of wild raspberry (*Rubus idaeus* L.) accessions with RAPD markers. International symposium on new researches in biotechnology. Biotechnology. Bucharest. 105.
2. D. Žvingila, J. Patamsytė, I. Mažonytė, V. Kleizaitė, V. Baliuckas, L. Balčiūnienė, V. Rančelis. 2005. Assessment of genetic structure in Lithuanian wild raspberries (*Rubus idaeus* L.) populations by RAPDs. Biodiversity, Molecular Ecology and Toxicology. Palanga. 60.
3. Й. Патамсита. 2004. Использование молекулярных маркеров при изучении коллекции *Rubus idaeus*. Материалы VIII молодежной конференции ботаников в Санкт–Петербурге. Санкт–Петербург. 248.

PADĖKA

Prie šio darbo paruošimo prisidėjo daug žmonių. Pirmiausiai noriu padėkoti savo darbo vadovui doc. Dr. Donatui Žvingilai už gerą ir kryptingą vadovavimą, pagalbą įsisavinant molekulinis metodus, dalykinę ir moralinę paramą, svarbius patarimus ir pastabas ruošiant straipsnius ir šį darbą. Taip pat dėkoju savo moksliniams konsultantams dr. Laimutei Balčiūnienei ir dr. Juozui Labokui už suteiktą galimybę tirti VU Botanikos sodo paprastosios avietės kolekciją, už patarimus ir pagalbą lauko tyrimuose. Taip pat esu be galo dėkinga dr. Violetai Kleizaitėi už pagalbą atliekant kai kuriuos tyrimus, už kritines pastabas ir pagalbą redaguojant disertacijos rankraštį. Už vertingus patarimus įsisavinant statistinius metodus esu dėkinga Kastyčiui Beitui. Už duomenų apdorojimą SAS statistinių programų paketu labai dėkoju dr. Virgilijui Baliuckui. Taip pat norėčiau padėkoti doc. dr. Jūratei Tupčiauskaitei ir prof. Jonui Naujaliui už vertingas botanines diskusijas. Dėkoju prof. Vytautui Rančeliui už naudingus patarimus.

Esu dėkinga šio darbo recenzentėms dr. Lidai Bagdonienei ir dr. Eglei Čėsnienei už dalykines pastabas ir pasiūlymus.

Norėčiau padėkoti ir visam Botanikos ir genetikos katedros kolektyvui už malonų bendravimą ir pagalbą sprendžiant įvairius klausimus. Labai dėkoju Augalų genetikos laboratorijos darbuotojams už draugišką atmosferą, patarimus ir paramą.

Išskirtinai dėkoju savo šeimai už kantrybę ir supratingumą.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Aagaard J.E., Krutovskii K.V., Strauss S.H. 1998. RAPD markers of mitochondrial origin exhibit lower population diversity and higher differentiation than RAPDs of nuclear origin in Douglas fir. *Molecular Ecology* 7: 801–812.
- Abbate G., Bonacquisti S., Scassellati E. 2002. Morphological study of three *taxa* of the genus *Rubus* L. sec. *Rubus* (Rosaceae) in Western Central Italy. *Plant Biosystems* 136 (3): 321–330.
- Ayres D.R., Ryan F.J. 1997. The clonal and population structure of a rare endemic plant, *Wyethia reticulata* (Asteraceae): allozyme and RAPD analysis. *Molecular Ecology* 6: 761–772.
- Alice L.A., Campbell C.S. 1999. Phylogeny of *Rubus* (Rosaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. *American Journal of Botany* 86 (1): 81–97.
- Alice L.A., Eriksson T., Eriksen B., Campbell C.S. 2001. Hybridization and gene flow between distantly related species of *Rubus* (Rosaceae): evidence from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. *Systematic Botany* 26 (4): 769–778.
- Al-Zahim M.A., Ford-Lloyd B.V., Newbury H.J. 1999. Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. *Plant Cell Reports* 18: 473–477.
- Antonius K., Nybom H. 1994. DNA fingerprinting reveals significant amounts of genetic variation in a wild raspberry *Rubus idaeus* population. *Molecular Ecology* 3: 177–180.
- Asins M.J., Carbonell E.A. 1989. Distribution of genetic variability in a durum wheat collection. *Theoretical and Applied Genetics* 77: 287–294.
- Atienzar F.A., Jha A.N. 2006. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: a critical review. *Mutation Research* 613: 76–102.

- Atila S.P., Ağaoğlu Y.S. 2006. Developments in Raspberry Breeding. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 2 (4): 171–177.
- Badjakov I., Todorovska E., Kondakova V., Boicheva R., Atanassov A. 2006. Assessment the genetic diversity of Bulgarian raspberry germplasm collection by microsatellite and RAPD markers. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 14 (Suppl. 1): 61–76.
- Baker A.J. 2000. *Molecular methods in ecology*. Blackwell Publishing. 352.
- Balčiūnienė L., Labokas J., Radaitienė D. 2005. Primary evaluation of field collection of wild *Rubus idaeus*. *Botanica Lithuanica* 11 (1): 3–15.
- Bartish I.V., Jeppsson N., Nybom H. 1999. Population genetic structure in the dioecious pioneer plant species *Hippophae rhamnoides* investigated by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Molecular Ecology* 8: 791–802.
- Bartish G.I., Jeppsson N., Bartish I.V., Nybom H. 2000. Assessment of genetic diversity using RAPD analysis in a germplasm collection of sea buckthorn. *Agricultural and Food Science in Finland* 9: 279–289.
- Beattie J., Crozier A., Duthie G.G. 2005. Potential health benefits of berries. *Current Nutrition & Food Science* 1: 71–86.
- Beauchamp C.O., Fridovich I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44: 276.
- Bodenes C., Joandet S., Laigret F., Kremer A. 1997. Detection of genomic regions differentiating two closely related oak species *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus robur* L. *Heredity* 78: 433–444.
- Boscolo P.R.S., Menossi M., Jorge R.A. 2003. Aluminum-induced oxidative stress in maize. *Phytochemistry* 62: 181–189.
- Bowler C., Van Montagu M., Inze D. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 43: 83–116.
- Bradshaw A.D. 1984. Ecological significance of genetic variation between populations. *Perspectives on Plant Ecology*. Sinauer Associates Inc. 289–305.

- Brawn K., Fridovich I. 1981. DNA strand scission by enzymically generated oxygen radicals. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 206 (2): 414–9.
- Bretting P.K., Widrechner M.P. 1995. Genetic markers and plant genetic resources management. *Plant Breeding Reviews* 13: 11–86.
- Briarda M., Horvais A., Peron J.Y. 2002. Wild seakale (*Crambe maritima* L.) diversity as investigated by morphological and RAPD markers. *Scientia Horticulturae* 95: 1–12.
- Bukantis A. 1994. Lietuvos klimatas. Vilniaus universiteto leidykla. Vilnius. 188.
- Calero C., Ibáñez O., Mayol M., Rosselló J.A. 1999. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers detect a single phenotype in *Lysimachia minoricensis* JJ. Rodr. (*Primulaceae*), a wild extinct plant. *Molecular Ecology* 8: 2133–2136.
- Chebotar S., Röder M.S., Korzun V., Börner A. 2002. Genetic integrity of *ex situ* genebank collections. *Cellular & Molecular Biology Letters* 7: 437–444.
- Chen L.F.O., Kuo H.Y., Chen M.H., Lai K.N., Chen S.C.G. 1997. Reproducibility of the differential amplification between leaf and root DNA's in soybean revealed by RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 1033–1043.
- Chen W.H., Chen T.M., Fu Y.M., Hsieh R.M., Chen W.S. 1998. Studies on somaclonal variation in *Phalaenopsis*. *Plant Cell Reports* 18: 7–13.
- Cheruth A.J., Ksouri R., Ragupati G., Paramasivam M., Jallali I., Hameed J.A.J., Zhao C.X., Shao H.B., Rajaram P. 2009. Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. *Acta Physiologiae Plantarum* (online).
- Cohen J.I. (Red.) 1999. Managing Agricultural Biotechnology – Addressing Research Program Needs and Policy Implications. CAB International. 350.
- Coleman M., Abbott R.J. 2003. Possible causes of morphological variation in an endemic Moroccan groundsel (*Senecio leucanthemifolius* var. *casablancae*): evidence from chloroplast DNA and random amplified polymorphic DNA markers. *Molecular Ecology* 12: 423–434.

- Congiu L., Chicca M., Cella R., Rossi R., Bernacchia G. 2000. The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to identify strawberry varieties: a forensic application. *Molecular Ecology* 9: 229–232.
- Cousineau J.C., Donnelly D.J. 1992. Use of isoenzyme analysis to characterize raspberry cultivars and detect cultivar mislabeling. *Horticultural Science* 27 (9): 1023–1025.
- Davis B.J. 1964. Disc electrophoresis. Method and application to human serum proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences* 121: 404–427.
- Devos K.M., Gale M.D. 1992. The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. 84: 567–572.
- Divaret I., Margale E., Thomas G. 1999. RAPD markers on seed bulks efficiently assess the genetic diversity of *Brassica oleracea* L. collection. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 1029–1035.
- Dnyaneshwar W., Preeti Ch., Kalpana J., Bhushan P. 2006. Development and application of RAPD–SCAR marker for identification of *Phyllanthus emblica* Linn. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 29 (11): 2313–2316.
- Dong B., Sang W.L., Jiang X., Zhou J.M., Kong F.X., Hu W., Wang L.S. 2002. Effects of aluminum on physiological metabolism and antioxidant system of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Chemosphere* 47: 87–92.
- Dudnik N.S., Thormann I., Hodgkin T. 2001. The extent of use of plant genetic resources in research – a literature survey. *Crop Science* 41: 6–10.
- Ercisli S. 2004. A short review of the fruit germplasm resources of Turkey. *Genetic Resources and Crop Evolution* 51: 419–435.
- Fahima T., Sun G.L., Beharav A., Krugman T., Beiles A., Nevo E. 1999. RAPD polymorphism of wild emmer wheat populations, *Triticum dicoccoides*, In Israel. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 434–447.
- Fischer M., Husi R., Prati D., Peintinger M., van Kleunen M., Schmid B. 2000. RAPD variation among and within small and large populations of the rare clonal plant *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae). *American Journal of Botany* 87(8): 1128–1137.

- Foolad M.R. 2007. Genome mapping and molecular breeding of Tomato. *International Journal of Plant Genomics* 1–34.
- Fourré J.L., Berger P., Niquet L., André P. 1997. Somatic embryogenesis and clonal variation in Norway spruce: morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 159–169.
- Fraga M.F., Rodriguez R., Cana M.J. 2002. Genomic DNA methylation–demethylation during aging and reinvigoration of *Pinus radicata*. *Tree Physiology* 22: 813–816.
- Frankham R., Ballou J.D., Briscoe D.A. 2004. A Primer of Conservation Genetics. Cambridge University Press. 220.
- Fucci L., Oliver C.N., Coon M.J., Stadtman E.R. 1983. Inactivation of key metabolic enzymes by mixed–function oxidation reactions: possible implication in protein turnover and aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80: 1521–1525.
- Gabrielsen T.M., Bachmann K., Jakobsen K.S., Brochmann C. 1997. Glacial survival does not matter: RAPD phylogeography of Nordic *Saxifraga oppositifolia*. *Molecular Ecology* 6: 831–842.
- Gabrielsen T.M., Brochmann C. 1998. Sex after all: high levels of diversity detected in the arctic clonal plant *Saxifraga cernua* using RAPD markers. *Molecular Ecology* 7: 1701–1708.
- Garkava–Gustavsson L., Persson H.A., Nybom H., Rumpunen K., Gustavsson B.A., Bartish I.V. 2005. RAPD–based analysis of genetic diversity and selection of lingonberry (*Vaccinium vitis–idaea* L.) material for *ex situ* conservation. *Genetic Resources and Crop Evolution* 52: 723–735.
- Graham J., McNicol R.J. 1995. An examination of the ability of RAPD markers to determine the relationships within and between *Rubus* species. *Theoretical and Applied Genetics* 90: 1128–1132.
- Graham J., Squire G.R., Marshall B., Harrison R.E. 1997. Spatially dependent genetic diversity within and between colonies of wild raspberry *Rubus idaeus* detected using RAPD markers. *Molecular Ecology* 6: 1001–1008.

- Graham J., Smith K., Woodhead M., Russell J. 2002. Development and use of simple sequence repeat SSR markers in *Rubus* species. *Molecular Ecology Notes* 2: 250–252.
- Graham J., Marshall B., Squire G.R. 2003. Genetic differentiation over a spatial environmental gradient in wild *Rubus idaeus* populations. *New Phytologist* 157: 667–675.
- Graham J., Smith K., MacKenzie K., Jorgenson L., Hackett C., Powell W. 2004. The construction of a genetic linkage map of red raspberry (*Rubus idaeus* subsp. *idaeus*) based on AFLPs, genomic-SSR and EST-SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 740–749.
- Graham J., Smith K., Tierney I., MacKenzie K., Hackett C.A. 2006. Mapping gene *H* controlling cane pubescence in raspberry and its association with resistance to cane botrytis and spur blight, rust and cane spot. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 818–831.
- Gustine D.L., Voigt P.W., Brummer E.C., Papadopoulos Y.A. 2002. Genetic variation of RAPD markers for North American white clover collections and cultivars. *Crop Science* 42: 343–347.
- Harris H. 1966. Enzyme polymorphism in man. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B* 164: 298–310.
- Harrison R.E., Luby J.J., Furnier G.R., Hancock J.F. 1997. Morphological and molecular variation among populations of octaploid *Fragaria virginiana* and *F. chiloensis* (Rosaceae) from North America. *American Journal of Botany* 84 (5): 612–620.
- Hegi G. *Rubus* L.: Illiustrierte Flora von Mitteleuropa. (red. Huber H.) 1975. Band IV, Teil 2A. Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg. 274–411.
- Hsao J.Y., Lee M. 1999. Genetic diversity and microgeographic differentiation of yushan cane (*Yushania niitakayamensis*; Poaceae) in Taiwan. *Molecular Ecology* 8: 263–270.
- Hu J., Quiros C.F. 1991. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. *Plant Cell Reports* 10: 505–511.

- Huff D.R., Quinn J.A., Higgins B., Palazzo A.J. 1998. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) variation among native little bluestem [*Schizachyrium scoparium* (Michx.) Nash] populations from sites of high and low fertility in forest and grassland biomes. *Molecular Ecology* 7: 1591–1597.
- Yeh F.C., Yang R., Boyle T. 1999. POPGENE v.1.31, Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis.
- Jenczewski E., Prosperi J.M., Ronfort J. 1999. Differentiation between natural and cultivated populations of *Medicago sativa* (Leguminosae) from Spain: analysis with random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and comparison to allozymes. *Molecular Ecology* 8: 1317–1330.
- Jennings D.L. 1963. Some evidence of population differentiation in *Rubus idaeus* L. *New Phytologist* 63 (2): 153–157.
- Jennings D.L. 1988. Raspberries and blackberries: their breeding, diseases and growth. London, UK: Academic Press. 230.
- Jogaitė V., Naujalis J.R., Lazutka J.R. 2005. Genetic diversity in fragmented population of herb-Paris (*Paris quadrifolia* L., Triliaceae). *Biologija* 1: 18–23.
- Jogaitė V., Lazutka J.R., Stapulionytė A., Naujalis J.R., Odland A., Bjerktvedt D.K. 2006. Analysis of DNA polymorphism in wild populations of herb-Paris (*Paris quadrifolia* L., Triliaceae) from Lithuania and Norway. *Biologija* 1: 18–23.
- Johnson R.C., Kisha T.J., Evans M.A. 2007. Characterizing safflower germplasm with AFLP molecular markers. *Crop Science* 47: 1728–1736.
- Jones N., Ougham H., Thomas H. 1997. Markers and mapping: we are all geneticists now. *New Phytol* 137: 165–177.
- Jordano P., Godoy J.A. 2000. RAPD variation and population genetic structure in *Prunus mahaleb* (Rosaceae), an animal-dispersed tree. *Molecular Ecology* 9: 1293–1305.

- Jürgens A.H., Seitz B., Kowarik I. 2007. Genetic differentiation of *Rosa canina* (L.) at regional and continental scales. *Plant Systematics and Evolution* 269: 39–53.
- Joshi J., Schmid B., Caldeira M.C., Dimitrakopoulos P.G., Good J., Harris R., Hector A., Huss–Danell K., Jumpponen A., Minns A., Mulder C.P.H., Pereira J.S., Prinz A., Scherer–Lorenzen M., Siamantziouras A.S.D., Terry A.C., Troumbis A.Y., Lawton J.H. 2001. Local adaptation enhances performance of common plant species. *Ecology Letters* 4: 536–544.
- Kang H.M., Saltveit M. 2001. Activity of enzymatic antioxidant defense systems in chilled and heat shocked cucumber seedling radicles. *Physiologia Plantarum* 113: 548–556.
- Karhu A., Hurme P., Karjalainen M., Karvonen P., Kärkkäinen K., Neale D., Savolainen O. 1996. Do molecular markers reflect patterns of differentiation in adaptive traits of conifers? *Theoretical and Applied Genetics* 1–2: 215–221.
- Keane B., Smith M.K., Rogstad S.H. 1998. Genetic variation in red raspberries (*Rubus idaeus* L.; Rosaceae) from sites differing in organic pollutants compared with synthetic tandem repeat DNA probes. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17 (10): 2027–2034.
- Khadari B., Breton C., Moutier N., Roger J.P., Besnard G., Berville A., Dosba F. 2003. The use of molecular markers for germplasm management in a French olive collection. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 521–529.
- Khan M.A., Witzke–Ehbrecht von S., Maass B.L., Becker H.C. 2009. Relationship among different geographical groups, agro–morphology, fatty acid composition and RAPD marker diversity in Safflower (*Carthamus tinctorius*). *Genetic Resources and Crop Evolution* 56: 19–30.
- Kjølner S., Såstad S.M., Taberlet P., Brochmann C. 2004. Amplified fragment length polymorphism versus random amplified polymorphic DNA markers: clonal diversity in *Saxifraga cernua*. *Molecular Ecology* 13: 81–86.

- Kleijn D., Bekker R.M., Bobbink R., De Graaf M.C.C., Roelofs J.G.M. 2008. In search for key biogeochemical factors affecting plant species persistence in heathland and acid grasslands: a comparison of common and rare species. *Journal of Applied Ecology* 45: 680–687.
- Kleizaitė V., Čėsniėnė T., Rėnėelis V. 2004. The use of cobalt–induced chlorophyll morphoses for studying Co²⁺ interactions with cysteine and SOD. *Plant Science* 1249–1256.
- Kreher S.A., Forė S.A., Collins B.S. 2000. Genetic variation within and among patches of the clonal species, *Vaccinium stamineum* L. *Molecular Ecology* 9: 1247–1252.
- Kumar L.S. 1999. DNA markers in plant improvement: an overview. *Biotechnology Advances* 7: 143–182.
- Labokas J. 1998. Descriptors for *in situ* conservation of economic plant genetic resources. The Proceedings of International Symposium on *In Situ Conservation of Plant Genetic Diversity* 213–215.
- Labra M., Miele M., Ledda B., Grassi F., Mazzei M., Sala F. 2004. Morphological characterization, essential oil composition and DNA genotyping of *Ocimum basilicum* L. cultivars. *Plant Science* 167: 725–731.
- Lewontin R.C. 1972. The apportionment of human diversity. *Evolution Biology* 6: 381–394.
- Li C., Fahima T., Beiles A., Korol A.B., Nevo E. 1999. Microclimatic stress and adaptive DNA differentiation in wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 873–883.
- Linde M., Diel S., Neuffer B. 2001. Flowering ecotypes of *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik. (Brassicaceae) analysed by a cosegregation of phenotypic characters (QTL) and molecular markers. *Annals of Botany* 87: 91–99.
- Link W., Dickens C., Singh M., Scwall M., Melchinger A.E. 1995. Genetic diversity in European and Mediterranean faba bean germplasm revealed by RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 90: 27–32.

- Lisek A., Korbin M., Rozpara E. 2005. Using simply generated RAPD markers to distinguish between sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 14 (Suppl. 1): 53–59.
- Lowe A., Harris S., Ashton P. 2004. Ecological Genetics. Design, Analysis and Application. Blackwell Publishing. 326.
- Lu M.Z., Wang X.R., Szmidt A. 1997. Molecular properties of RAPDs in *Pinus sylvestris* (L.) and their implications for genetic analysis. *Forest Genetics* 4 (4): 227–234.
- Lukoševičius A., Lapinskas E., Misevičiūtė A., Česonis S., Butkus V., Švitraitė–Buskienė L., Ryliškis A., Keparutis V., Morkūnas A. 1996. Lietuvos pomologija. 2 T. Vilnius. Mokslo ir enciklopedijų leidykla.
- Lutz E., Schneller J.J., Holderegger R. 2000. Understanding population history for conservation purposes: populations genetics of *Saxifraga aizoides* (Saxifragaceae) in the lowlands and lower mountains of the Alp. *American Journal of Botany* 87: 583–590.
- Marshall B., Harrison R.E., Graham J., McNicol J.W., Wright G., Squire G.R. 2001. Spatial trends of phenotypic diversity between colonies of wild raspberry *Rubus idaeus*. *New Phytologist* 151: 671–682.
- Meusel H., Jäger E., Weinert E. 1965. Vergleichende chorologie der Zentraleuropäischen Flora. VEB Gustav Fisher Verlag, Jena: 258.
- Miller Coyle H., Ladd C., Palmbach T., Lee H.C. 2001. The green revolution: botanical contributions to forensics and drug enforcement. *Croatian Medical Journal* 42 (3): 340–5.
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7 (9): 405–411.
- Morimoto Y., Maundu P., Kawase M., Fujimaki H., Morishima H. 2006. RAPD polymorphism of the white-flowered gourd (*Lagenaria siceraria* (Molina) Standl.) landraces and its wild relatives in Kenya. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53: 963–974.

- Müller–Schärer H., Fischer M. 2001. Genetic structure of the annual weed *Senecio vulgaris* in relation to habitat type and population size. *Molecular Ecology* 10: 17–28.
- Murkaitė R., Avietė. Gervuogė. *Rubus* L.: Lietuvos TSR flora. (red. Natkevičaitė–Ivanauskienė M.) 1971. IV tomas. Vilnius. 100–116.
- Nanda R.M., Nayak S., Rout G.R. 2004. Studies on genetic relatedness of *Acacia* tree species using RAPD markers. *Biologia* 59: 115–120.
- Navasaitis M., Ozolinčius R., Smaliukas D., Balevičienė J. 2003. Lietuvos Dendroflora. Kaunas, Lututė. 576.
- Nei M. 1973. Analysis of genetic diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70: 3321–3323.
- Nei M., Li W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76 (10): 5269–5273.
- Nevo E. 2001. Evolution of genome–phenome diversity under environmental stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (11): 6233–6240.
- Nybom H. 2004. Comparison of different nuclear DNA marker for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* 13: 1143–1155.
- Nybom H., Bartish I.V. 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 3 (2): 93–114.
- Nybom H., Schall B.A. 1990. DNA „fingerprints“ reveal genotypic distributions in natural populations of blackberries and raspberries (*Rubus*, Rosaceae). *American Journal of Botany* 77(7): 883–888.
- Nordborg M., Innan H. 2002. Molecular population genetics. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 69–73.

- Olmos S.E., Lavia G., Renzo M.D., Mroginski L., Echenique V. 2002. Genetic analysis of variation in micropropogated plants of *Melia azedarach* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 38 (6): 617–622.
- Owuor E.D., Fahima T., Beiles A., Korol A.B., Nevo E. 1997. Population genetic response to microsite ecological stress in wild barely, *Hordeum spontaneum*. *Molecular Ecology* 6: 1177–1187.
- Owuor E.D., Fahima T., Beharav A., Korol A.B., Nevo E. 1999. RAPD divergence caused by microsite edaphic selection in wild barely. *Genetica* 105: 177–192
- Owuor E.D., Beharav A., Fahima T., Kirzher V.M., Korol A.B., Nevo E. 2003. Microscale ecological stress causes RAPD molecular selection in wild barley Neve Yaar microsite, Israel. *Genetic Resources and Crop Evolution* 50 (2): 213–225.
- Ozolinčius R. 2004. Lietuvos autochtoninės dendrofloros vertinimas pagal Elenbergo indikatorinę skalę. *Ekologija* 4: 13–22.
- Pašakinskienė I., Griffiths C.M., Bettany A.J.E., Paplauskienė V., Humphreys M.W. 2000. Anchored simple–sequence repeats as primers to generate species–specific DNA markers in *Lolium* and *Festuca* grasses. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 384–390.
- Paterson A.H. 1996. Genome mapping in plants. California: Academic Press, Texas. 330.
- Peakall R., Smouse P. 2006. GenAlEx v.6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288–295.
- Persson H.A., Gustavsson B.A. 2001. The extent of clonality and genetic diversity in lingonberry (*Vaccinium vitis–idaea* L.) revealed by RAPDs and leaf–shape analysis. *Molecular Ecology* 10: 1385–1397.
- Pluess A.R., Stöcklin J. 2004. Population genetic diversity of the clonal plant *Geum reptans* (Rosaceae) in the Swiss Alps. *American Journal of Botany* 91 (12): 2013–2021.

- Pons J., Baltzer H., Langsdorf A., Köhler W. 1998. Population genetics: genetic analysis and modeling of natural populations. *Progress in Botany* 59: 194–226.
- Powell W., Bonar N., Baird E., Russell I., Waugh R. 1994. Molecular marker techniques for barley genome analysis and breeding. Annual Report Scottish Crop Research Institute, Dundee: 48–58.
- Pukacki P.M., Kamińska–Rożek E. 2004. Effect of water stress on chlorophyll a fluorescence and electrical admittance of shoots in Norway spruce seedlings. *Trees* 19: 539–544.
- Ramdane D. 2005. Crops: Quality, Growth and Biotechnology. WFL Publisher. Finland. 1360.
- Rao V.R., Hodgkin T. 2002. Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell, Tissue and Organe Culture* 68: 1–19.
- Reisch C., Poschlod P., Wingender R. 2003. Genetic differentiation among populations of *Sesleria albicans* Kit. ex Schultes (Poaceae) from ecologically different habitats in central Europe. *Heredity* 91: 519–527.
- Reisch Ch., Anke A., Röhl M. 2005. Molecular variation within and between ten populations of *Primula farinosa* (Primulaceae) along an altitudinal gradient in the northern Alps. *Basics and Applied Ecology* 6: 35–45.
- Ren H.X., Wang Z.L., Chen X., Zhu Y.L. 1999. Antioxidative responses to different altitudes in *Plantago major*. *Environmental and Experimental Botany* 42: 51–59.
- Rival A., Bertrand L., Beule T., Combes M.C., Trouslot P., Lashermes P. 1998. Suitability of RAPD analysis for the detection of somaclonal variants in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). *Plant Breeding* 117: 73–76.
- Ryabova D. 2007. Population evaluation in crop wild relatives for *in situ* conservation: a case study for raspberry *Rubus idaeus* L. in the Leningrad region, Russia. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54: 973–980.
- Roach F.A. 1987. Cultivated fruits of Britain: their origin and history. Blackwell Publishing, Oxford. 358.

- Rodriguez J.M., Berke T., Engle L., Nienhuis J. 1991. Variation among and within *Capsicum* species revealed by RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 99: 147–156.
- SAS Institute Inc. 1999. SAS/STAT[®], Cary, NC, USA.
- Scandalios J.G. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutase. *Journal of Plant Physiology* 101: 7–12.
- Schulman A.H., 2007. Molecular markers to assess genetic diversity. *Euphytica* 18: 313–321.
- Semagn K., Bjornstad A., Stedje B., Bekele E. 2000. Comparison of multivariate methods for the analysis of genetic resources and adaptation in *Phytolacca dodecandra* using RAPD. *Theoretical Applied Genetics* 101: 1145–1154.
- Sensoy S., Büyükalaca, Abak K. 2007. Evaluation of genetic diversity in Turkish melons (*Cucumis melo* L.) based on phenotypic characters and RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54: 1351–1365.
- Shrestha M.K., Golan–Goldhirsh A., Ward D. 2002. Population genetic structure and the conservation of isolated populations of *Acacia raddiana* in the Negev Desert. *Biological Conservation* 108: 119–127.
- Sliesaravičius A., Stanys V. 2005. Žemės augalų biotechnologija. Vlnius. Enciklopedija. 234.
- Smith J.S.C., Smith O.S. 1992. Fingerprinting crop varieties. *Advances in Agronomy* 47: 85–140
- Sokal R.R., Michener C.M. 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Science Bulletin* 38: 1409–1438.
- Soltis E.D., Soltis P.S. 2000. Contributions of plant molecular systematics to studies of molecular evolution. *Plant Molecular Biology* 42: 45–75.
- Staniulytė R., Žvingilė D., Kuusienė S. 2004. Paprastosios eglės (*Picea abies* (L.) Karst.) plusinių medžių klonų genetinės įvairovės ir tapatumo įvertinimas AAPD metodu. *Miškininkystė* 2 (56): 5–12.
- StatSoft, Inc. 2004. STATISTICA (data analysis software system, version 7).

- Steiner J.J., Garcia de los Santos G. 2001. Adaptive ecology of *Lotus corniculatus* L. genotypes: I. Plant morphology and RAPD marker characterizations. *Crop Science* 41: 552–563.
- Tingey S.V., del Tufo J.P. 1993. Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA markers. *Plant Physiology* 101 (3): 349–352.
- Tirmenstein D. 1990. *Rubus idaeus*. Fire effects information system (Online – <http://www.fs.fed.us/database/feis>).
- Tollefsrud M.M., Bachmann K., Jakobsen K.S., Brochmann C. 1998. Glacial survival does not matter – II: RAPD phylogeography of Nordic *Saxifraga caespitosa*. *Molecular Ecology* 7: 1217–1323.
- Torimaru T., Tomaru N., Nishimura N., Yamamoto S. 2003. Clonal diversity and genetic differentiation in *Ilex leucoclada* M. patches in an old-growth beech forest. *Molecular Ecology* 12: 809–818.
- Van de Peer Y., De Wachter R. 1994. Treecon for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Windows environment. *Comput Applic Biosci* 10: 569–570.
- Van de Zande L., Bijlsma R. 1995. Limitations of the RAPD technique in phylogeny reconstruction in *Drosophila*. *Journal of Evolutional Biology* 8: 645–656.
- Van Hintum T.J.L., Van Treuren R. 2002. Molecular markers: tools to improve genebank efficiency. *Cellular & Molecular Biology Letters* 7: 737–744.
- Van Tienderen P.H. 1990. Morphological variation in *Plantago lanceolata*: limits of plasticity. *Evolution Trends in Plants* 4: 35–43.
- Virk P.S., Zhu J., Newbury H.J., Bryan G.J., Jackson M.T., Ford-Lloyd B.V. 2000. Effectiveness of different classes of molecular marker for classifying and revealing variation in rice (*Oryza sativa*) germplasm. *Euphytica* 112: 275–284.
- Vitorello V.A., Capaldi F.R., Stefanuto V.A. 2005. Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17 (1): 129–143.

- Volis S., Yakubov B., Shulgina I., Ward D., Zur V., Mendlinger S. 2001. Tests for adaptive RAPD variation in population genetic structure of wild barley, *Hordeum spontaneum* Koch. *Biological Journal of the Linnean Society* 74: 289–303.
- Volis S., Yakubov B., Shulgina I., Ward D., Mendlinger S. 2005. Distinguishing adaptive from nonadaptive genetic differentiation: comparison of Q_{ST} and F_{ST} at two spatial scales. *Heredity* 95: 466–475.
- Wang J. L., Gao Y.B., Zhao N.X., Ren A.Z., Ruan W.B., Chen L., Liu J.L., Li Ch.L. 2006. Morphological and RAPD analysis of the dominant species *Stipa krylovii* Roshev. in Inner Mongolia steppe. *Botanical Studies* 47: 23–35.
- Watson L.E., Parker R.W., Polster D.F. 1980. Manual of plant species suitability for reclamation in Alberta. Vol. 2. Forbs, shrubs and trees. Edmonton, AB. Land Conservation and Reclamation Council. 537.
- Weising K., Nybom H., Wolff K., Kahl G. 2005. DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications. Taylor & Francis. 444.
- Welsh J., McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18 (24): 7213–7218.
- Wen C.S., Hsiao J.Y. 1999. Genetic differentiation of *Lilium longiflorum* Thunb. var. *scabrum* Masam. (*Liliaceae*) in Taiwan using Random Amplified Polymorphic DNA and morphological characters. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 40: 65–71.
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18 (22): 6531–6535.
- Williams J.G.K., Hanafey M.K., Rafalski J.A., Tingey S.V. 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods in Enzymology* 218: 704–740.
- Wolfe K.H., Li W.H., Sharp P.M. 1987. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 84: 9054–9058.

Wright B.D. 1997. Crop genetic resource policy: the role of *ex situ* genebanks. *The Australian Journal of Agricultural and Resource Economics* 41 (1): 81–115.

www.fruit.cornell.edu

Zeidler M. 2000. Electrophoretic analysis of plant isozymes. *Biologica* 38: 7–16.

Zhang D.X., Hewitt G.M. 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology* 12: 563–584.

Zhao N.X., Gao Y.B., Wang J.L., Ren A.Z. 2006. Genetic diversity and population differentiation of the dominant species *Stipa krylovii* in the Inner Mongolia steppe. *Biochemical Genetics* 44 (11/12): 513–526.

Zhou S.L., Xiong G.M., Li Z.Y., Wen J. 2005. Loss of genetic diversity of domesticated *Panax notoginseng* F.H. Chen as evidenced by ITS sequence and AFLP polymorphism: a comparative study with *P. stipuleanatus* H.T. Tsai & K.M. Feng. *Journal of Integrative Plant Biology* 47 (1): 107–115.

Zhu D., Scandalios J.G. 1994. Differential accumulation of manganese-superoxide dismutase transcripts in maize in response to abscisic acid and high osmoticum. *Plant Physiology* 106: 173–178.

Žvingila D., Verbylaitė R., Abraitis R., Kuusienė S., Ozolinčius R. 2002. An assessment of genetic diversity in plus tree clones of *Pinus sylvestris* L. using RAPD markers. *Baltic Forestry* 8: 2–7.

Бараненко В.В. 2006. Супероксиддисмутаза в клетках растений. *Цитология*. 48 (6): 465–474.

Давлетшина Г.Т., Уланова Н.Г. 1996. Малина обыкновенная. Биологическая флора Московской области. Москва. Аргус. 12: 89–112.

Грюнер Л.А. Классификатор рода *Rubus* L. подрода *Eubatus* Focke (ежевика). 1993. Санкт–Петербург. 26.

Augalų lietuviški pavadinimai nurodyti pagal: Botanikos vardų žodynas. Sud. Jankevičienė R. 1998. Botanikos instituto leidykla. Vilnius. 523.

PRIEDAI

1 lentelė. Paprastosios avietės kolekcijos pavyzdžių augaviečių dirvožemio rodikliai

Kolekcijos pavyzdžio numeris	pH _{KCl}	Humuso kiekis, %	Visas azotas, %	Laisvas P ₂ O ₅ , mg/kg	Laisvas K ₂ O, mg/kg	Kolekcijos pavyzdžio numeris	pH _{KCl}	Humuso kiekis, %	Visas azotas, %	Laisvas P ₂ O ₅ , mg/kg	Laisvas K ₂ O, mg/kg
JL01	7,12	6,20	0,48	123,30	130,70	JL34	7,05	4,58	0,24	95,30	175,60
JL02	4,12	5,90	0,23	106,70	112,60	JL35	5,58	7,35	0,38	27,00	63,50
JL03	5,46	3,94	0,26	95,00	254,10	JL36	4,01	28,52	1,93	90,10	708,20
JL04	6,14	5,75	0,37	116,30	230,10	JL37	5,76	6,41	0,40	190,60	347,20
JL05	7,02	7,48	0,42	59,20	132,20	JL39	5,45	8,26	0,50	56,20	74,50
JL06	5,48	3,33	0,22	64,60	136,80	JL40	7,35	5,49	0,28	69,90	70,20
JL07	4,69	3,07	0,15	192,40	238,90	JL41	6,96	7,75	0,50	121,50	54,50
JL08	5,62	8,12	0,58	252,50	101,60	JL42	5,81	8,30	0,41	118,00	118,50
JL09	6,60	4,58	0,22	129,20	260,80	JL43	4,94	3,30	0,20	90,60	103,50
JL10	4,01	5,06	0,28	59,60	80,20	JL44	3,20	25,17	1,24	133,00	225,50
JL11	5,15	7,48	0,48	25,40	53,00	JL45	4,85	1,80	0,13	145,50	103,00
JL12	5,97	2,78	0,24	68,60	67,90	JL47	7,20	7,33	0,38	327,00	237,20
JL13	5,09	3,06	0,17	91,50	77,90	JL52	3,42	24,74	1,10	158,80	428,20
JL14	4,75	28,96	3,06	161,00	238,60	JL54	4,36	27,96	1,83	108,70	279,20
JL15	4,02	1,80	0,04	130,50	22,30	JL56	7,71	3,36	0,11	180,90	64,80
JL16	3,05	5,28	0,13	17,80	55,40	JL61	4,40	7,20	0,51	54,80	67,00
JL17	3,12	8,76	0,41	250,00	169,80	JL64	4,81	8,52	0,58	18,70	356,3
JL18	4,75	0,97	0,02	65,70	28,50	JL65	4,65	7,62	0,43	13,00	150,10
JL19	4,45	2,67	0,16	178,00	158,50	JL72	3,80	27,57	2,31	127,10	597,20
JL20	3,60	4,36	0,11	41,90	61,10	JL76	5,23	8,17	0,85	70,80	70,80
JL22	3,56	4,32	0,20	24,60	53,80	LB01	4,28	7,93	0,40	309,30	251,10
JL23	3,39	5,35	0,23	28,80	64,40	LB02	4,64	29,30	2,30	117,40	724,50
JL25	4,59	1,46	0,04	151,30	55,10	SS01	6,78	9,57	0,73	386,90	416,0
JL32	5,20	3,49	0,25	22,20	137,20	IŽ01	4,10	8,23	0,22	461,90	176,90
JL33	3,56	6,04	0,31	9,90	99,50						

2 lentelė. 36–ių oligonukleotidinių pradmenų, naudotų informatyviausių RAPD fenotipų atrankai, sekos

Pradmuo	Pradmens seka 5'→3'	Pradmuo	Pradmens seka 5'→3'
A3	GACAGACAGA	270-9	GCTCTCACCG
A4	CGGGTACCAA	270-10	TGCACGGACG
A5	GGGAACCCGT	380-1	ACGCGCCAGG
A6	GACCCGTCCC	380-2	ACTCGGCCCC
A7	GAAACGGGTG	380-3	GGCCCCATCG
B6	TGCTCTGCCC	380-4	CGCGAGGTGC
B7	GGTGACGCAG	380-6	CCCGACTGCC
MP2	AGTCGTCCCC	380-7	GGCAAGCGGG
MP3	CCATCCCCCA	380-8	CGCACCGCAC
MP4	GGTGAACGCT	380-9	ACGGCGGCTC
MP5	GTCATGCCTGGA	470-1	GCCCCTCTTG
MP7	TCGGCACGCA	470-3	CTGTTCGGCTC
P1	GACAGACACA	470-4	GGACCGCTAG
270-1	GTCTCGTCGG	470-6	GCACGTGAGG
270-3	GTGTAGGGCG	470-7	CTATCGCCGC
270-5	GCCCTCTTCG	470-8	GAGAGGGAGG
270-6	CAGGGGCATC	470-9	CCGGGGTTAC
270-7	GAGACCTCCG	470-10	CGCAGACCTC
270-8	GGCCTTCAGG		

3 lentelė. Paprastosios avietės 20–ies kolekcijos pavyzdžių Nei ir Li genetiniai atstumai

	JL01	JL02	JL04	JL05	JL22	JL36	JL45	JL18	JL52	SS01	JL03	JL06	JL08	JL09	JL10	JL11	JL12	JL14	JL15
JL02	0,44																		
JL04	0,46	0,40																	
JL05	0,39	0,40	0,38																
JL22	0,40	0,37	0,41	0,39															
JL36	0,47	0,39	0,41	0,44	0,47														
JL45	0,44	0,38	0,33	0,39	0,43	0,38													
JL18	0,42	0,38	0,37	0,37	0,46	0,39	0,35												
JL52	0,43	0,39	0,34	0,37	0,32	0,43	0,39	0,39											
SS01	0,51	0,4	0,37	0,46	0,44	0,39	0,41	0,34	0,37										
JL03	0,46	0,43	0,45	0,46	0,44	0,39	0,42	0,41	0,42	0,41									
JL06	0,51	0,42	0,40	0,44	0,45	0,36	0,40	0,38	0,45	0,39	0,45								
JL08	0,42	0,41	0,37	0,46	0,42	0,43	0,44	0,37	0,38	0,40	0,45	0,42							
JL09	0,47	0,41	0,43	0,42	0,43	0,44	0,42	0,34	0,34	0,43	0,49	0,38	0,44						
JL10	0,45	0,38	0,44	0,33	0,44	0,37	0,44	0,35	0,40	0,42	0,43	0,35	0,39	0,43					
JL11	0,44	0,38	0,40	0,37	0,36	0,34	0,38	0,36	0,39	0,44	0,43	0,39	0,43	0,44	0,37				
JL12	0,35	0,33	0,34	0,40	0,36	0,39	0,33	0,39	0,33	0,38	0,40	0,39	0,38	0,41	0,44	0,36			
JL14	0,43	0,38	0,36	0,41	0,28	0,43	0,41	0,39	0,36	0,40	0,45	0,39	0,40	0,43	0,42	0,34	0,39		
JL15	0,44	0,35	0,36	0,41	0,40	0,41	0,33	0,34	0,36	0,40	0,43	0,38	0,42	0,36	0,40	0,34	0,38	0,36	
JL16	0,46	0,38	0,45	0,35	0,45	0,44	0,42	0,39	0,42	0,45	0,39	0,42	0,39	0,48	0,38	0,35	0,38	0,39	0,42

5 lentelė. Paprastosios avietės genetinės kolekcijos pavyzdžių kai kurie kokybiniai požymiai

Kolekcijos pavyzdžio numeris	Primokanai			Lapas				Lapkotis		Viršūninis lapelis	Vaisius			
	Dyg-liai	Erdvinis išsidėstymas	Spalva	Viršaus spalva	Blizge-sys	Apačios spalva	Pakraščio danteliai	Plaukeliai	Dyg-liai	Forma	Taurėlapiai prie vaisiaus	Plauke-liai*	Blizge-sys	Forma
JL01	+	išsiraite	ruda	tamsiai žalia	+	pilkai žalia	stambūs	+	+	rombiškas	atsilošę	1	+	netaisykl. apvali
JL02	+	išsiraite	ruda	tamsiai žalia	-	pilka	smulkūs	+	+	kiaušiniškas	priglude prie kotelių	2	-	apvali
JL03	-	statūs	ruda	tamsiai žalia	-	pilkai žalia	smulkūs	+	-	kiaušiniškas	užsirieta	1	+	apvali
JL04	-	išsiraite	šviesiai ruda	šviesiai žalia	-	pilka	stambūs	+	-	linijiškas	užsirieta	2	+	apvali
JL05	+	išsiraite	raudonai ruda	šviesiai žalia	+	pilkai žalia	stambūs	+	-	rombiškas	užsirieta	2	-	apvaliai kūgiška
JL06	+	statūs	tamsiai ruda	žalia	-	pilka	smulkūs	+	-	rombiškas	užsirieta	2	+	kūgiška
JL08	+	išsiraite	tamsiai ruda	žalia	-	pilkai žalia	stambūs,	-	-	kiaušiniškas	atsilošę	2	-	apvaliai kūgiška
JL09	-	išsiraite	žaliai ruda	tamsiai žalia	-	pilka	smulkūs	+	-	kiaušiniškas	užsirieta	2	-	kūgiška
JL10	-	statūs	žaliai ruda	tamsiai žalia	-	pilkai žalia	smulkūs	+	+	kiaušiniškas	atsilošę	2	+	apvaliai kūgiška
JL11	+	statūs	žaliai ruda	šviesiai žalia	-	pilkai žalia	stambūs	-	+	kiaušiniškas	užsirieta	2	-	netaisykl. apvali
JL12	-	išsiraite	raudonai ruda	žalia	+	pilka	stambūs	+	+	rombiškas	atsilošę	2	-	netaisykl. kūgiška
JL13	-	statūs	ruda	šviesiai žalia	-	pilka	smulkūs	+	-	rombiškas	užsirieta	2	-	kūgiška
JL14	+	išsiraite	žaliai ruda	žalia	+	pilka	smulkūs	+	-	kiaušiniškas	atsilošę	2	-	netaisykl. kūgiška
JL15	+	išsiraite	ruda	žalia	-	pilkai žalia	smulkūs	+	+	rombiškas	užsirieta	3	-	apvali
JL16	+	išsiraite	raudona	tamsiai žalia	-	pilka	smulkūs	+	-	apvalus	užsirieta	3	-	kūgiška

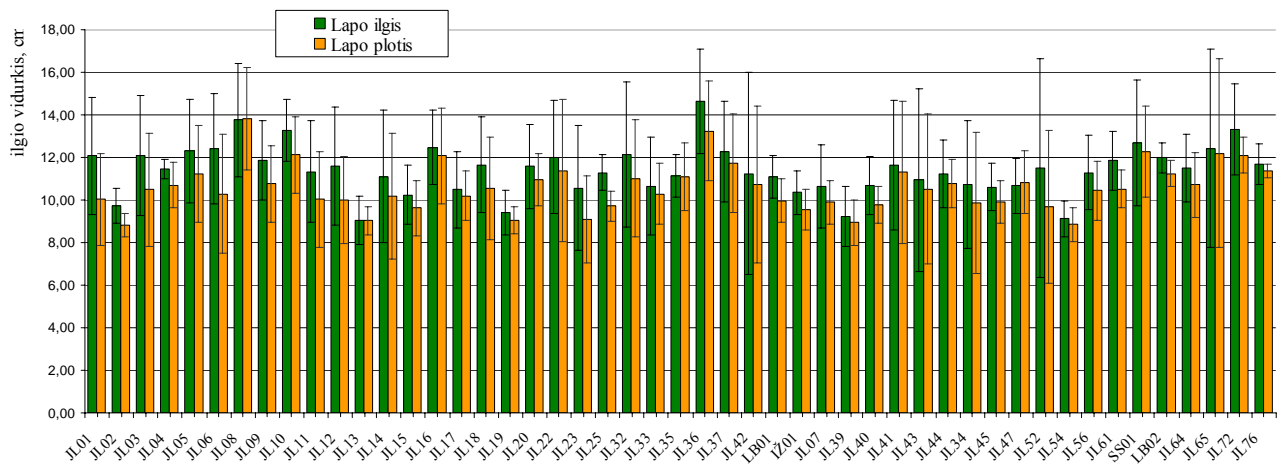
5 lentelės tęsinys

Kolekcijos pavyzdžio numeris	Primokanai			Lapas				Lapkotis		Viršūninis lapelis	Vaisius			
	Dyg-liai	Erdvinis išsidėstymas	Spalva	Viršaus spalva	Blizge-sys	Apačios spalva	Pakraščio danteliai	Plaukeliai	Dyg-liai	Forma	Taurėlapiai prie vaisiaus	Plauke-liai*	Blizge-sys	Forma
JL17	+	išsiraite	raudonai ruda	tamsiai žalia	+	pilka	stambūs	+	+	rombiškas	užsirieta	2	-	apvali
JL18	+	išsiraite	raudonai ruda	žalia	-	pilka	smulkūs	+	+	rombiškas	užsirieta	2	-	apvali
JL20	+	išsiraite	raudonai ruda	tamsiai žalia	-	pilka žalia	smulkūs	+	+	trikampiškas	atsilošę	2	+	apvaliai kūgiška
JL22	+	išsiraite	raudonai ruda	tamsiai žalia	-	pilka žalia	stambūs	+	+	rombiškas	atsilošę	2	+	apvaliai kūgiška
JL23	-	išsiraite	šviesiai ruda	šviesiai žalia	-	žalia	stambūs	+	+	kiaušiniškas	atsilošę	2	-	apvaliai kūgiška
JL25	-	statūs	šviesiai ruda	tamsiai žalia	-	pilka žalia	stambūs	-	-	rombiškas	užsirieta	2	+	apvali
JL32	+	išsiraite	šviesiai ruda	tamsiai žalia	-	pilka	smulkūs	+	+	kiaušiniškas	užsirieta	3	-	apvali
JL33	+	išsiraite	raudonai ruda	tamsiai žalia	+	pilka žalia	smulkūs	+	+	rombiškas	užsirieta	2	+	apvali
JL35	+	išsiraite	raudonai ruda	tamsiai žalia	+	pilka žalia	smulkūs	+	+	kiaušiniškas	priglude prie kotelių	2	-	kūgiška
JL36	+	išsiraite	raudonai ruda	žalia	-	pilka	smulkūs	+	-	rombiškas	užsirieta	2	+	kūgiška
JL37	-	išsiraite	raudonai ruda	žalia	+	pilka	smulkūs	+	-	apvalus	priglude prie kotelių	1	+	apvali
JL42	+	išsiraite	šviesiai ruda	šviesiai žalia	-	pilka žalia	smulkūs	+	-	trikampiškas	užsirieta	2	-	apvaliai kūgiška
LB01	-	išsiraite	šviesiai ruda	žalia	-	pilka	smulkūs	+	-	apvalus	užsirieta	3	-	apvaliai kūgiška
IŽ01	-	išsiraite	raudonai ruda	tamsiai žalia	-	pilka	stambūs	+	-	trikampiškas	užsirieta	1	+	apvali
JL07	+	išsiraite	raudonai ruda	tamsiai žalia	-	pilka žalia	smulkūs	+	+	kiaušiniškas	užsirieta	2	+	apvaliai kūgiška
JL39	+	išsiraite	raudonai ruda	tamsiai žalia	-	pilka	smulkūs	+	-	kiaušiniškas	užsirieta	2	+	apvaliai kūgišk
JL40	+	išsiraite	šviesiai ruda	tamsiai žalia	-	pilka žalia	smulkūs	-	-	rombiškas	priglude prie kotelių	2	-	apvali

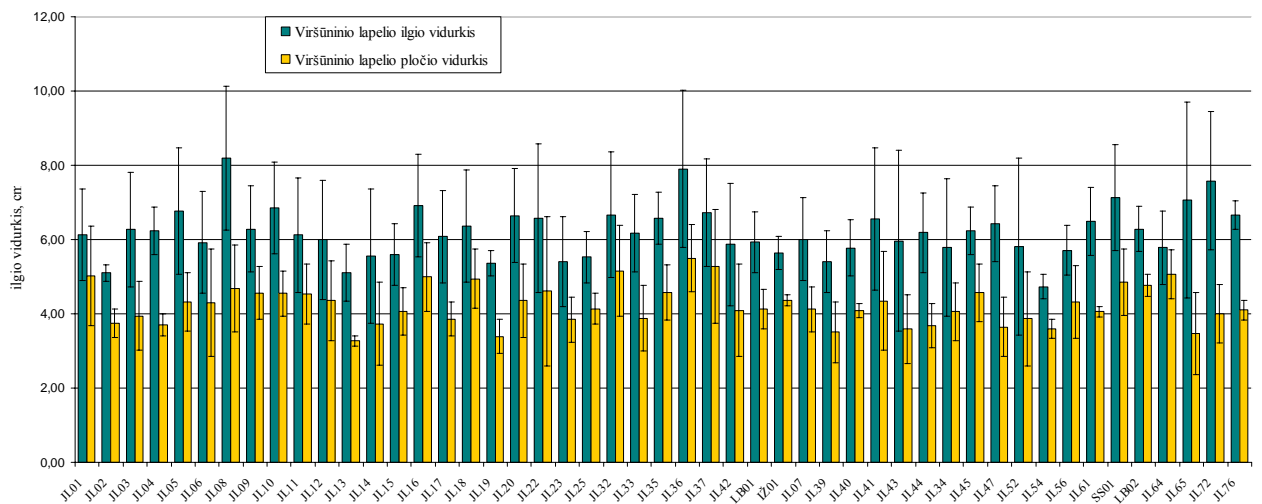
5 lentelės tęsinys

Kolekcijos pavyzdžio numeris	Primokanai		Lapas					Lapkotis		Viršūninis lapelis	Vaisius			
	Dyg-liai	Erdvinis išsidėstymas	Spalva	Viršaus spalva	Blizge-sys	Apačios spalva	Pakraščio danteliai	Plau-keliai	Dyg-liai	Forma	Taurėlapiai prie vaisiaus	Plauke-liai*	Blizge-sys	Forma
JL41	+	išsiraitę	šviesiai ruda	tamsiai žalia		pilkai žalia	stambūs	-	-	kiaušiniškas	užsiritę	2	+	apvali
JL43	-	išsiraitę	žaliai ruda	pilkai žalia	-	pilka	smulkūs	-	-	rombiškas	užsiritę	2	-	apvali
JL44	+	išsiraitę	šviesiai ruda	žalia	-	pilka	smulkūs	+	-	trikampiškas	užsiritę	2	-	apvali
JL45	+	išsiraitę	raudonai ruda	šviesiai žalia	-	pilka	smulkūs	-	-	apvalus	užsiritę	1	-	kūgiška
JL47	+	statūs	ruda	žalia	-	žalia	smulkūs	-	-	rombiškas	užsiritę	2	-	apvali
JL52	+	statūs	žaliai ruda	tamsiai žalia	-	pilkai žalia	smulkūs	-	-	rombiškas	užsiritę	2	-	apvaliai kūgiška
JL54	+	išsiraitę	raudonai ruda	šviesiai žalia	-	pilka	smulkūs	+	-	kiaušiniškas	užsiritę	1	+	apvali
JL56	+	išsiraitę	ruda	pilkai žalia	-	pilka	smulkūs	+	+	kiaušiniškas	užsiritę	3	-	kūgiška
JL61	+	statūs	raudonai ruda	šviesiai žalia	-	žalia	smulkūs	-	-	kiaušiniškas	užsiritę	2	+	kūgiška
SS01	+	statūs	raudonai ruda	žalia	-	žalia	stambūs	+	+	kiaušiniškas	atsilošę	2	+	kūgiška
LB02	+	statūs	ruda	šviesiai žalia	-	pilka	smulkūs	+	+	rombiškas	užsiritę	2	+	apvali
JL64	-	išsiraitę	raudonai ruda	žalia	-	pilka	smulkūs	+	+	trikampiškas	priglundę prie kotelių	3	-	kūgiška
JL65	+	išsiraitę	šviesiai ruda	šviesiai žalia	-	pilkai žalia	dvigubi	+	-	linijiškas	užsiritę	2	-	apvaliai kūgiška
JL72	+	statūs	šviesiai ruda	tamsiai žalia	-	pilka	stambūs	+	+	kiaušiniškas	užsiritę	2	-	kūgiška
JL76	+	išsiraitę	šviesiai ruda	tamsiai žalia	-	pilkai žalia	smulkūs	-	+	rombiškas	užsiritę	1	+	kūgiška

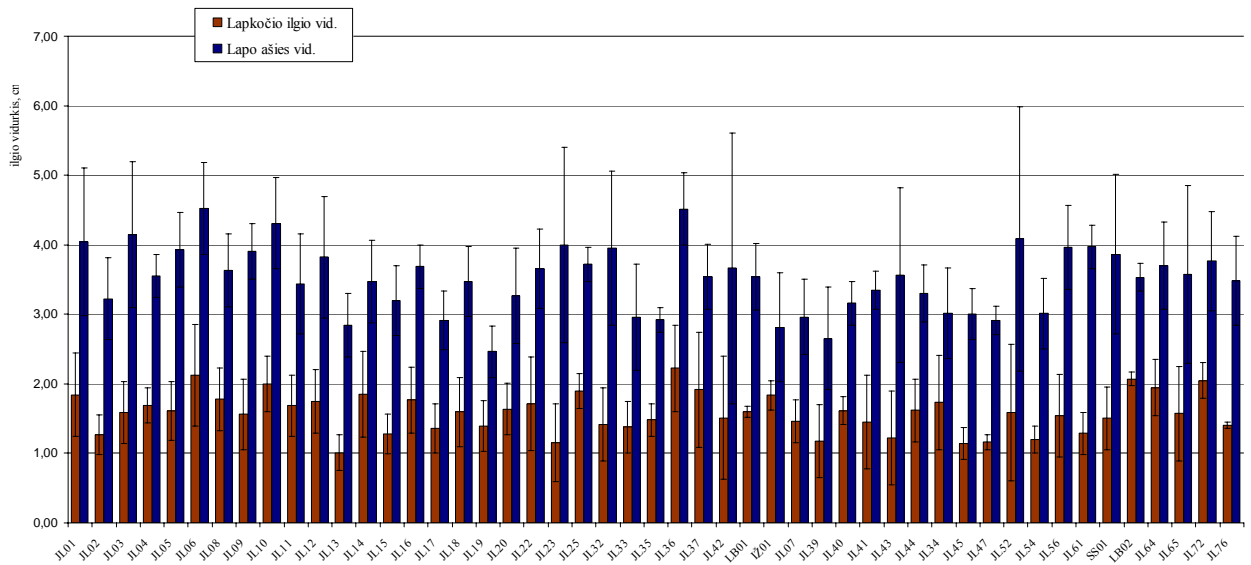
+/- – tam tikro morfologinio požymio buvimas/nebuvimas; * – plaukuotumo intensyvumas įvertintas balais: 1 – mažai plaukuotas, 2 – vidutiniškai, 3 – labai plaukuotas.



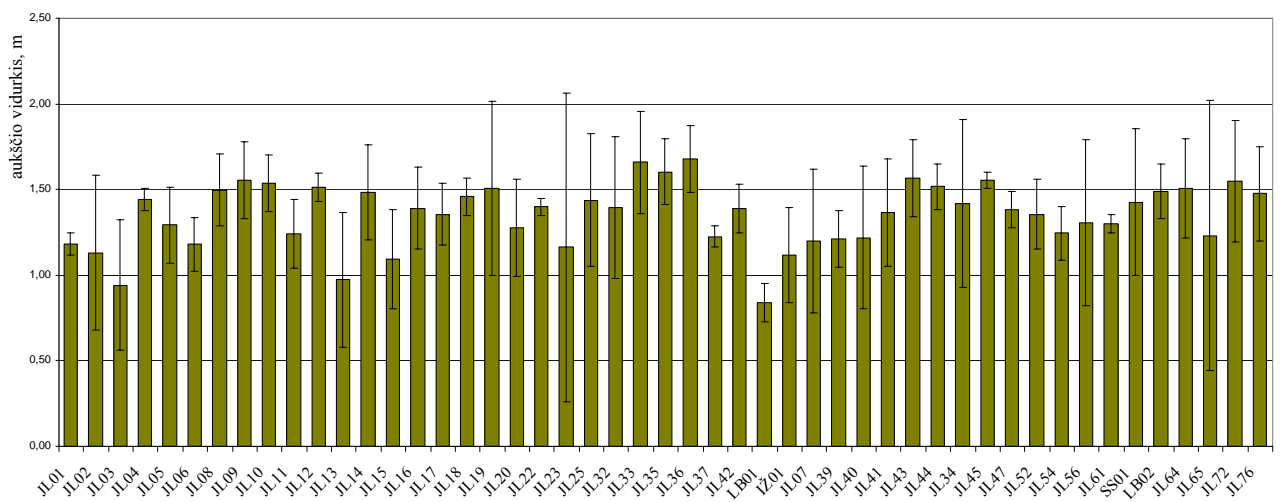
1 pav. Paprastosios avietės kolekcijos pavyzdžių vidutinis lapo ilgis ir plotis



2 pav. Paprastosios avietės kolekcijos pavyzdžių vidutinis viršūninio lapelio ilgis ir plotis



3 pav. Paprastosios avietės kolekcijos pavyzdžių vidutinis lapkočio ir rachio ilgis



4 pav. Paprastosios avietės kolekcijos pavyzdžių vidutinis florikano aukštis

8 lentelė. Nei genetiniai atstumai tarp paprastosios avietės populiacijų

	Juodkrantė	Šėta	Vilkiautinis	Vilnius	Ilgiai	Salos	Prienai	Linkuva	Dieveniškės	Kurtuvėnai	B. Vokė	Melekonys	Švarcgiris	Zokniai	Margiai	Šiulgos	Nemirseta	Anaičiai
Šėta	0,103																	
Vilkiautinis	0,114	0,129																
Vilnius	0,163	0,089	0,140															
Ilgiai	0,142	0,137	0,081	0,137														
Salos	0,144	0,161	0,116	0,176	0,045													
Prienai	0,113	0,115	0,088	0,130	0,107	0,129												
Linkuva	0,178	0,170	0,140	0,127	0,146	0,174	0,156											
Dieveniškės	0,217	0,177	0,196	0,151	0,242	0,282	0,237	0,207										
Kurtuvėnai	0,147	0,145	0,139	0,148	0,145	0,161	0,144	0,127	0,134									
B. Vokė	0,174	0,159	0,175	0,139	0,166	0,174	0,198	0,142	0,175	0,111								
Melekonys	0,180	0,137	0,135	0,145	0,146	0,188	0,150	0,111	0,172	0,145	0,129							
Švarcgiris	0,201	0,224	0,203	0,173	0,183	0,212	0,214	0,198	0,203	0,177	0,200	0,167						
Zokniai	0,212	0,242	0,158	0,211	0,176	0,213	0,207	0,169	0,224	0,179	0,220	0,221	0,195					
Margiai	0,198	0,175	0,167	0,187	0,169	0,178	0,083	0,205	0,285	0,184	0,230	0,188	0,246	0,254				
Šiulgos	0,189	0,158	0,185	0,185	0,185	0,182	0,119	0,192	0,225	0,162	0,198	0,169	0,269	0,261	0,068			
Nemirseta	0,182	0,215	0,186	0,200	0,240	0,241	0,207	0,212	0,157	0,174	0,219	0,243	0,220	0,215	0,201	0,187		
Anaičiai	0,174	0,239	0,175	0,210	0,234	0,220	0,210	0,210	0,153	0,164	0,198	0,231	0,210	0,235	0,241	0,204	0,074	
Rokai	0,205	0,167	0,207	0,135	0,225	0,223	0,150	0,171	0,205	0,142	0,187	0,207	0,207	0,257	0,165	0,138	0,166	0,136

9 lentelė. Geografiniai atstumai (km) tarp tirtų paprastosios avietės populiacijų

	Juodkrantė	Šėta	Vilkiautinis	Vilnius	Ilgiai	Salos	Prienai	Linkuva	Dieveniškės	Kurtuvėnai	B. Vokė	Melekonys	Švaregiris	Zokniai	Margiai	Šiulgos	Nemirseta	Anaičiai
Šėta	201,88																	
Vilkiautinis	247,02	128,90																
Vilnius	280,92	90,37	100,99															
Ilgiai	315,02	131,67	231,39	137,63														
Salos	310,08	111,46	188,72	90,45	50,49													
Prienai	208,32	75,43	56,04	85,16	192,56	157,11												
Linkuva	186,87	94,87	220,85	177,84	138,70	153,15	165,13											
Dieveniškės	323,05	145,21	100,41	57,58	183,36	133,05	115,58	235,19										
Kurtuvėnai	121,06	99,49	198,69	189,35	195,05	195,90	144,46	68,00	242,05	-								
B. Vokė	284,71	101,17	88,84	17,01	154,29	106,46	82,29	191,54	44,08	198,64								
Melekonys	284,71	101,17	88,84	17,01	154,29	106,46	82,29	191,54	44,08	198,64	-							
Švaregiris	117,52	99,01	134,31	165,76	228,45	210,19	90,93	137,61	205,58	83,15	168,10	168,10						
Zokniai	147,90	89,14	202,60	179,17	170,04	174,87	146,81	40,85	234,32	27,37	190,31	190,31	101,43					
Margiai	311,90	117,34	124,37	31,63	133,96	83,62	116,06	198,47	49,43	216,82	36,18	36,18	197,25	204,44				
Šiulgos	311,90	117,34	124,37	31,63	133,96	83,62	116,06	198,47	49,43	216,82	36,18	36,18	197,25	204,44	-			
Nemirseta	35,39	212,82	273,06	296,99	315,73	316,45	230,18	181,20	342,78	121,24	302,53	302,53	139,83	145,72	327,14	327,14		
Anaičiai	33,46	211,27	271,01	295,27	314,72	315,15	228,24	180,47	340,93	120,10	300,75	300,75	137,84	144,75	325,45	325,45	2,13	
Rokai	221,28	19,40	128,96	75,22	117,32	93,12	79,72	103,96	131,79	117,20	87,85	87,85	117,08	104,42	100,16	100,16	231,99	230,46

10 lentelė. Daugiametė vidutinė oro temperatūra*

Populiacija ir jai priskirta meteorologinė stotis	Žiema				Pavasaris				Vasara				Ruduo				Metinė
	XII	I	II	Vid.	III	IV	V	Vid.	VI	VII	VIII	Vid.	IX	X	XI	Vid.	
Nida (Juodkrantė)	-0,1	-3,2	-2,9	-2,1	-0,1	4,9	11,0	5,3	15,3	17,2	17,3	16,6	13,7	9,2	3,9	8,9	7,18
Kėdainiai (Šėta)	-2,4	-4,9	-4,6	-4,0	-0,4	6,0	12,6	6,1	16,0	17,1	16,2	16,4	11,9	7,0	2,0	7,0	6,38
Druskininkai (Vilkiautinis)	-2,4	-5,3	-4,3	-4,0	-0,1	6,2	12,7	6,3	16,2	17,5	16,4	16,7	11,9	6,8	2,2	7,0	6,48
Vilniaus miestas (Vilnius)	-2,2	-5,5	-4,5	-4,1	-0,1	6,4	13,3	6,5	16,7	18,0	17,0	17,2	12,3	7,2	1,9	7,1	6,71
Dusetos (Ilgiai)	-3,2	-6,1	-5,4	-4,9	-1,4	5,3	12,0	5,3	15,6	16,8	15,9	16,1	11,3	6,6	1,3	6,4	5,73
Salos (Salos)	-3,0	-5,7	-5,1	-4,6	-1,4	5,2	11,6	5,1	15,4	16,7	16,0	16,0	11,5	6,5	1,5	6,5	5,77
Prienai (Prienai)	-2,6	-5,0	-4,3	-4,0	0,0	6,6	13,3	6,6	16,4	17,5	16,9	16,9	12,4	7,7	2,5	7,5	6,78
Joniškis (Linkuva)	-2,2	-5,1	-4,6	-4,0	-0,8	5,5	11,9	5,5	15,6	17,0	16,3	16,3	11,8	7,2	2,3	7,1	6,24
Varėna (Dieveniškės)	-2,8	-5,8	-4,6	-4,4	-0,7	6,0	12,3	5,9	15,7	16,9	16,2	16,3	11,7	6,8	1,9	6,8	6,13
Šiauliai (Kurtuvėnai)	-2,6	-5,1	-4,7	-4,1	-1,0	5,2	11,8	5,3	15,5	16,7	16,1	16,1	11,7	7,0	1,8	6,8	6,03
Vilnius (B. Vokė, Melekonys)	-3,2	-6,4	-5,2	-4,9	-0,9	5,5	12,3	5,6	15,6	16,7	16,0	16,1	11,3	6,3	0,9	6,2	5,74
Kybartai (Švarcgiris)	-1,9	-4,4	-3,7	-3,3	0,2	6,2	12,4	6,3	15,7	16,9	16,5	16,4	12,4	7,8	2,5	7,6	6,72
Šiauliai (Zokniai)	-2,6	-5,1	-4,7	-4,1	-1,0	5,2	11,8	5,3	15,5	16,7	16,1	16,1	11,7	7,0	1,8	6,8	6,03
Vilniaus užmiestis (Margiai, Šiulgos)	-2,9	-6,1	-4,8	-4,6	-0,6	5,7	12,5	5,9	15,8	16,9	16,3	16,3	11,6	6,6	1,2	6,5	6,02
Palanga (Nemirseta, Anaičiai)	-0,3	-2,9	-2,8	-2,0	0,4	5,1	10,7	5,4	14,3	16,0	16,5	15,6	12,7	8,6	3,8	8,4	6,84
Ukmergė (Rokai)	-2,8	-5,7	-4,8	-4,4	-0,8	5,9	12,5	5,9	15,7	16,8	16,2	16,2	11,8	7,0	1,8	6,8	6,13

* Lietuvos Hidrometeorologijos Tarnybos duomenys

11 lentelė. Daugiametis vidutinis kritulių kiekis*

Populiacija ir jai priskirta meteorologinė stotis	Žiema				Pavasaris				Vasara				Ruduo				Metinis
	XII	I	II	Iš viso	III	IV	V	Iš viso	VI	VII	VIII	Iš viso	IX	X	XI	Iš viso	
Nida (Juodkrantė)	63	45	28	136	34	33	41	108	52	77	82	211	83	79	84	246	701
Kėdainiai (Šėta)	43	36	28	107	31	40	60	131	62	73	66	201	53	46	47	146	585
Druskininkai (Vilkiautinis)	50	41	31	122	36	43	64	143	85	82	69	236	60	48	52	160	661
Vilniaus miestas (Vilnius)	54	40	30	124	38	46	55	139	79	79	71	229	64	54	54	172	664
Dusetos (Ilgiai)	56	45	36	137	39	42	59	140	72	75	66	213	66	55	60	181	671
Salos (Salos)	55	43	31	129	38	42	55	135	75	85	73	233	66	54	54	174	671
Prienai (Prienai)	59	49	34	142	39	42	51	132	82	81	72	235	62	55	64	181	690
Joniškis (Linkuva)	38	30	21	89	29	41	44	114	63	72	65	200	58	50	48	156	559
Varėna (Dieveniškės)	50	38	32	120	37	43	60	140	75	76	72	223	61	53	53	167	650
Šiauliai (Kurtuvėnai)	44	33	24	101	32	38	47	117	60	74	77	211	60	53	58	171	600
Vilnius (B. Vokė, Melekonys)	56	42	34	132	38	44	58	140	77	79	72	228	67	53	58	178	678
Kybartai (Švarcgiris)	58	46	31	135	39	37	50	126	72	80	83	235	57	50	65	172	668
Šiauliai (Zokniai)	44	33	24	101	32	38	47	117	60	74	77	211	60	53	58	171	600
Vilniaus užmiestis (Margiai, Šiulgos)	55	41	38	134	39	46	62	147	77	78	72	227	65	53	57	175	683
Palanga (Nemirseta, Anaičiai)	68	50	31	149	39	36	39	114	56	74	83	213	89	80	90	259	735
Ukmergė (Rokai)	54	31	23	108	31	40	52	123	67	66	72	205	56	45	51	152	588

* Lietuvos Hidrometeorologijos Tarnybos duomenys