

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Donatas Naugžemys

**SAUSMEDŽIO (*LONICERA L.*) GENTIES ATSTOVŲ  
GENETINĖS ĮVAIROVĖS IR FILOGENETINIAI TYRIMAI DNR  
ŽYMENŲ METODAIS**

Daktaro disertacija

Biomedicinos mokslai, biologija (01 B)

Vilnius, 2011

Disertacija rengta 2006 – 2010 metais Vilniaus universitete.

**Mokslinis vadovas:**

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

**Konsultantas:**

**dr. Silva Žilinskaitė** (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai,  
biologija – 01 B)

## TURINYS

SANTRUMPOS .....	5
ĮVADAS .....	7
I. LITERATŪROS APŽVALGA .....	13
1. Sausmedžio genties apžvalga .....	13
1.1. <i>Lonicera</i> L. genties sistematikos istorija ir problemos.....	15
1.2. <i>Lonicera</i> L. genties kilmė.....	21
2. Molekuliniai žymenys ir augalų filogenetiniai tyrimai .....	24
2.1. RAPD metodo taikymas augalų sistematikoje .....	26
2.2. Chloroplastų DNR nekoduojančių specifinių regionų tyrimas sekoskaitos metodu.....	31
2.3. <i>Lonicera</i> L. genties filogenetikos molekuliniai tyrimai .....	35
3. Šiuolaikiniai bioinformatikos metodai filogenetikoje .....	36
3.1. Duomenų apdorojimas molekulinėje filogenetikoje.....	37
3.2. Filogenetinių dendrogramų sudarymas ir principai.....	38
3.3. Filogenetinių medžių patikimumo analizė .....	43
3.4. Duomenų bazės.....	44
3.5. DNR sekų palyginimas.....	46
4. Augalų genetiniai ištekliai, jų tyrimas ir išsaugojimas.....	48
II. TYRIMŲ OBJEKTAS IR METODAI .....	53
1. Tyrimų objektas – <i>Lonicera</i> L. genties augalai .....	53
1.1. VU Botanikos sodo sausmedžių kolekcija .....	53
1.1.1. <i>Lonicera</i> L. genties rūšys.....	54
1.1.2. <i>L. caerulea</i> porūšiai .....	55
1.1.3. <i>L. caerulea</i> veislės .....	56
1.1.4. <i>L. caerulea</i> genetinės linijos.....	57
2. Tyrimų metodika .....	59
2.1. Cheminės medžiagos .....	59
2.2. Tirpalai ir jų paruošimas.....	60
2.3. <i>Lonicera</i> L. genties augalų DNR skyrimo metodikos optimizavimas...60	
2.4. DNR koncentracijos ir kokybės nustatymas.....	62
2.5. PGR vykdymas .....	63
2.5.1. RAPD pradmenų parinkimas sausmedžio kolekcijos tyrimams.....63	
2.5.2. Specifinių pradmenų sukūrimas <i>Lonicera caerulea</i> L. rūšies identifikavimui.....	64
2.5.3. Chloroplastų DNR nekoduojančių specifinių regionų PGR vykdymas.....	65

2.5.4. Tiriamų cpDNR specifinių regionų trumpas apibūdinimas.....	66
2.6. RAPD produktų frakcionavimas agarozės gelyje.....	68
2.7. cpDNR sekų analizė naudojant klonavimą.....	68
2.7.1. DNR fragmentų išskyrimas ir paruošimas klonavimui .....	69
2.7.2. <i>Escherichia coli</i> transformacija ir transformantų analizė.....	69
2.7.3. Klonuoto DNR fragmento nukleotidų sekų nustatymas ir panašių sekų paieška duomenų bazėse .....	70
2.8. Duomenų analizė .....	71
III. REZULTATAI .....	73
1. VU Botanikos sodo <i>Lonicera</i> L. kolekcijos tyrimai DNR žymenų metodais .....	73
1.1. Sausmedžio genetinių linijų galimybių įvertinimas veislių genetinei bazei praplėsti .....	78
1.2. Sausmedžio pavyzdžių atranka filogenetinei analizei .....	87
1.3. Chloroplastų DNR specifinių sekų tyrimas sekoskaitos metodu.....	91
2. <i>Lonicera caerulea</i> L. filogenetinių ryšių tyrimas .....	100
2.1. <i>L. caerulea</i> L. filogenetiniai tyrimai RAPD metodu .....	101
2.2. Filogenetinių ryšių nustatymas naudojant cpDNR sekoskaitos duomenis .....	104
2.3. Filogenetinių ryšių analizė panaudojant originalius ir duomenų bazėse registruotų giminingų taksonų cpDNR sekoskaitos duomenis.....	105
IV. REZULTATŲ APTARIMAS .....	115
1. <i>Lonicera</i> L. genties pavyzdžių polimorfizmas VU Botanikos sodo kolekcijoje.....	115
2. Melsvaugio sausmedžio genetinių linijų selekcinės galimybės .....	117
3. Sausmedžių filogenetiniai tyrimai .....	122
3.1. RAPD metodo panaudojimas sausmedžių filogenetiniams tyrimams.....	122
3.2. Filogenetinė analizė naudojant sekoskaitos tyrimo duomenis .....	123
IŠVADOS .....	129
MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS.....	131
PADĖKA.....	134
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	135
PRIEDAI .....	164

## **SANTRUMPOS**

A, C, G, T – adeninas, citozinas, guaninas, timinas

AFLP – amplifikuotų fragmentų ilgio polimorfizmas (angl. *Amplified Fragments Length Polymorphism*)

AGI – augalų genetiniai ištekčiai

AMOVA – genetinės įvairovės molekulinės variacijos analizė (angl. *Analysis of MOlecular VAriance*)

BLAST – pagrindinis vietinis išlyginamosios paieškos įrankis (angl. *Basic Local Alignment Search Tool*), naudojamas nukleotidų sekų palyginimui su NCBI duomenų bazėje registruotomis sekomis

bp – bazių pora, nukleorūgšties ilgio vienetas, lygus vienai bazių porai

BS – Vilniaus universiteto Botanikos sodas

cpDNR – chloroplastų DNR

DDBJ – DNR duomenų bankas Japonijoje (angl. *DNA Data Bank of Japan*)

DNR – deoksiribonukleorūgštis

E – tikimybės reikšmė (angl. *Expectation value*)

EMBL-EBI – Europos molekulinės biologijos laboratorija – bioinformatikos institutas (angl. *European Molecular Biology Laboratory – European Bioinformatics Institute*)

GD<sub>xy</sub> – genetinis atstumas tarp individų (angl. *Genetic Distance*)

GRIN – JAV augalų sistematikos duomenų bazė (angl. *Germplasm Resources Information Network*)

GSS – genomo sekoskaitos apžvalgos duomenų bazė (angl. *Genome Survey Sequences*)

IPNI – Tarptautinė augalų vardų bazė (angl. *The International Plant Names Index*)

IPTG – izopropil-β-D-tiogalaktopiranozidas

IR – invertuotas pasikartojimas (angl. *Inverted Repeat*)

ISSR – paprastų pasikartojančių sekų intarpai (angl. *Inter-Simples Sequence Repeats*)

ITS – vidinis transkribuotas tarpiklis (angl. *Internal Transcribed Spacer*)

IUPAC – tarptautinė teorinės ir taikomosios chemijos sąjunga (angl. *The International Union of Pure and Applied Chemistry*)

kb – kilobazė, nukleorūgščių ilgio vienetas, lygus  $10^3$  bazių porų arba bazių

LB – Luria-Bertani mitybinė terpė

LSC – chloroplasto genomo didžioji vienkopijinė sritis (angl. *Large Single Copy*)

ME – mažiausios evoliucijos metodas (angl. *Minimum Evolution*)

MEGA – molekulinės evoliucijos genetinės analizės programa (angl. *Molecular Evolutionary Genetic Analysis*)

ML – didžiausio tikėtimumo algoritmas (angl. *Maximum Likelihood*)

MP – didžiausio taupumo algoritmas (angl. *Maximum Parsimony*)

NCBI – nacionalinis biotechnologijos informacijos centras (angl. *National Center for Biotechnology Information*)

NJ – kaimynų grupavimo algoritmas (angl. *Neighbor-joining*)

nt – nukleotidai/nukleotidas

OTV – operacinis taksonominis vienetas (angl. *Operational Taxonomic Units*)

PGR – polimerazinė grandininė reakcija (angl. *PCR, Polymerase Chain Reaction*)

RAPD – atsitiktinai pagausinta polimorfinė DNR (angl. *Random Amplified Polymorphic DNA*)

RFLP – restrikcijos fragmentų ilgio polimorfizmas (angl. *Restriction Fragment Length Polymorphism*)

SCAR – pagausinto žinomos sekos regiono žymuo (angl. *Sequence Characterized Amplified Regions*)

SMC – paprasto atitikimo koeficientas (angl. *Simple Matching Coefficient*)

SSCP – viengrandės DNR struktūros polimorfizmas (angl. *Single-stranded Confirmation Polymorphism*)

SSR – paprastosios pasikartojančios sekos (angl. *Simple Sequence Repeats*)

UPGMA – angl. *Unweighted Pair-Group Methods with Arithmetic Mean*

VIR – N.I. Vavilovo Rusijos augalininkystės institutas (rus. *Всероссийский Институт Растениеводства, им. Н.И. Вавилова*)

VNP – vieno nukleotido polimorfizmas

VU – Vilniaus universitetas

X-Gal – 5-bromo-4-chloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozidas

## ĮVADAS

Daug augalų rūšių, kurios praicityje nebuvo labai vertinamos ir kultivuojamos, dabar intensyviai tiriamos norint jas plačiau panaudoti žmonių reikmėms (Badenes et al., 2004). Dažnai tokie augalai pasižymi unikaliomis biologinėmis ir agronominėmis savybėmis (pvz., atsparumu biotiniam ir abiotiniam stresui). Viena iš tokių rūšių, kurios selekcija susidomėta tik praėjusio amžiaus viduryje, yra melsvauogis sausmedis.

Melsvauogis sausmedis (*Lonicera caerulea* L.) – vidutinio dydžio daugiametis krūmas, subrandinantis melsvos spalvos valgomas uogas, paplitęs borealiniuose Eurazijos ir Šiaurės Amerikos miškuose. Tetraploidinės ( $2n=4x=36$ ) melsvauogio sausmedžio formos užima didžiąją arealo dalį Eurazijoje, o diploidinės ( $2n=2x=18$ ) rūšies formos sutinkamos tik pietiniame arealo pakraštyje (Tetsuo et al., 2007). *L. caerulea* kaip komercinė rūšis yra palyginti nauja, pradėta kultivuoti XIX a. Rusijoje (Plekhanova, 2000; Куikliна, 2006). Sausmedžio mokslinė selekcija prasidėjo XX a. viduryje Tarybų Sąjungoje (Janick, Paull, 2008). Nuo tada Rusijoje sukurta daugiau kaip šimtas sausmedžio veislių. Selekcinės programos, panaudojant vietinius genetinius šios rūšies išteklius, vėliau buvo pradėtos Japonijoje, Kinijoje ir Kanadoje. Daugelis kitų šalių (Rumunija, Čekija, Latvija, Švedija, Kanada, JAV ir kt.) sausmedžio selekcijai naudoja iš Rusijos gautą genetinę medžiagą.

Dėl didelio atsparumo šalčiui (žiedai ištveria  $-8^{\circ}\text{C}/-10^{\circ}\text{C}$ ) bei ankstyvo derėjimo melsvauogis sausmedis yra vertinga selekciniu požiūriu uogakrūmių rūšis. Nuo seno Rusijoje, Japonijoje ir Kinijoje sausmedžių uogos naudojamos liaudies medicinoje ir kulinarijoje. Jose gausu fenolinių junginių, flavonoidų ir antocianinų, kurie nulemia antibakterines, antioksidantines ir priešuždegimines sausmedžio vaisių savybes (Chaovanalikit et al., 2004; Стрельцина и др., 2006; Svarcova et al., 2007).

Melsvauogio sausmedžio, perspektyvios naujos sodo augalų kultūros, tyrimai Lietuvoje prasidėjo 1979 m., sukaupus Vilniaus universiteto Botanikos sodo sausmedžių kolekciją (Žilinskaitė et al., 2007). Šiuo metu joje yra 28

veislės ir 35 genetinės linijos bei keturių *L. caerulea* porūšių pavyzdžiai. Genetinių linijų kolekcija įkurta naudojant gamtinių sausmedžio populiacijų iš Rusijos Altajaus regiono sėklinę medžiagą (Žilinskaitė et al., 2007).

VU Botanikos sodo sausmedžių kolekcijos efektyvesniam tvarkymui bei genetinių linijų tolesniam gerinimui be klasikinių metodų reikalingi ir šiuolaikiniai, kurie pagrįsti genomo DNR analize ir nepriklauso nuo aplinkos poveikio bei individo raidos stadijos. Veislių tyrimams ir selekcijai pasaulyje plačiai naudojami DNR žymenų metodai (Wünsch, Hormaza, 2002; Semagn et al., 2006), iš kurių vienas populiariausių yra RAPD (angl. *Random Amplified Polymorphic DNA*) metodas, nes yra efektyvus, palyginti pigus ir dėl naudojamų atsitiktinės sekos pradmenų nereikalauja pradinės informacijos apie tiriamos rūšies genomo sekas (Williams et al., 1990; Williams et al., 1993; Atienzar, Jha, 2006).

Dėl savo polimorfiškumo ir didelio užimamo arealo melsvauogis sausmedis įdomus ir taksonominiu požiūriu, nes iki šiol ginčijamasi, ar tai viena rūšis, sudaryta iš kelių porūšių ir varietetų, ar tai skirtingų rūšių grupė (Плеханова, Ростова, 1994; Pojarkova, 1999; Janick, Paull, 2008). Iki šiol šios problemos sprendimui buvo naudojama daug klasikinių metodų (Плеханова, Ростова, 1994). Pastaruoju metu tiek augalų, tiek kitų gyvų organizmų sistematikai plačiai naudojami branduolio ir organoidų DNR analizės metodai (Soltis, Soltis, 1998; Harris, 1999; Soltis, Soltis, 2000; Shaw et al., 2005; 2007). Sistematiu požiūriu yra perspektyvi chloroplastų DNR (cpDNR) regionų sekoskaita, kadangi nukleotidų pakaitų dažnis chloroplastų genome yra mažesnis nei branduolio ir didesnis nei mitochondrijų genome (Wolfe et al., 1987). Dėl to RAPD metodo ir cpDNR sekoskaitos panaudojimas *L. caerulea* analizei gali suteikti naujos vertingos informacijos ir patikslinti melsvauogio sausmedžio, kaip polimorfinės rūšies, statusą, pašalinti kai kuriuos prieštaravimus šios rūšies sistematikoje. Molekulinių genetinių metodų panaudojimas tiriant *Lonicera* L. genties genomą turėtų atverti naujas galimybes sprendžiant daugelį teorinių ir praktinių uždavinių, tvarkant ir



naudojant sausmedžių genetinę medžiagą bei padidinti naujų veislių selekcijos efektyvumą.

## **DARBO TIKSLAS**

Ištirti VU Botanikos sodo sausmedžio (*Lonicera* L.) kolekcijos genetinę įvairovę, atlikti vidurūšinę ir tarprūšinę filogenetinę analizę molekuliniais žymenų metodais, palyginti sekoskaitos rezultatus su cpDNR sekomis, registruotomis duomenų bazėse.

## **PAGRINDINIAI TYRIMŲ UŽDAVINIAI**

1. Genotipuoti VU Botanikos sodo melsvauogio sausmedžio kolekcijos pavyzdžius RAPD metodu.
2. Nustatyti tirtų genotipų giminingumo laipsnį ir, remiantis šiais duomenimis, patikslinti kai kurių pavyzdžių kilmę.
3. Nustatyti genetinių linijų kolekcijos pavyzdžių ir elitinių veislių genetinės diferenciacijos lygį.
4. Įvertinti genetinių linijų panaudojimo melsvauogio sausmedžio selekcijai ir naujai kuriamų veislių genetinės įvairovės didinimui galimybes.
5. Nustatyti *L. caerulea* L. rūšiai savitus RAPD žymenis, ištirti jų DNR sekų polimorfizmą, įvertinti jų molekulinę prigimtį, atlikti panašių sekų paiešką duomenų bazėse.
6. Remiantis RAPD analizės ir cpDNR sekoskaitos rezultatais atlikti *Lonicera* L. genties keletą rūšių ir porūšių filogenetinę analizę šiuolaikinės bioinformatikos metodais.
7. Palyginti tirtų sausmedžio genties atstovų genetinio panašumo medžius, nubraižytus RAPD duomenų pagrindu, su medžiais, nubraižytais remiantis cpDNR nekoduojančių regionų sekoskaitos duomenimis. Gautą informaciją palyginti su kitų autorių gautais sausmedžio filogenetinių tyrimų rezultatais.

8. Pateikti rekomendacijas, kaip pagerinti tolesnius melsvauogio sausmedžio kolekcijos tvarkymo ir selekcijos darbus.

### **DARBO NAUJUMAS**

Pirmą kartą melsvauogio sausmedžio (*L. caerulea* L.) genetinės įvairovės tyrimams bei vidurūšinės taksonomijos problemoms spręsti buvo panaudoti DNR žymenų metodai (RAPD ir cpDNR nekoduojančių regionų sekoskaita). Nustatyta, kad *L. caerulea* L. atstovams būdingas didelis DNR polimorfizmas. Identifikuotas ir sekvenuotas RAPD žymuo, savitas šiai polimorfinei kompleksinei rūšiai. Pirmąkart atlikta *Lonicera* L. genties dvylikos atstovų cpDNR šešių nekoduojančių regionų (*trnH-psbA*, *5'rpS12-rpL20*, *trnL-trnF*, *trnS-trnG*, *rpS16*, *trnS-psbZ*) sekoskaita. cpDNR nekoduojančių sekų filogenetinė analizė parodė, kad mokslinėje literatūroje aprašyti melsvauogio sausmedžio porūšiai nesudaro vienos klados, o grupuojasi su kitais diskutuotino statuso taksonais ir kartu su jais sudaro monofiletinę grupę.

Šie molekuliniai tyrimai patvirtina A. Rehder'io (1903) ir M. Plekhanovos (1994) nuomonę apie tai, kad *L. caerulea* L. yra polimorfinė rūšis, kuriai be porūšių *L. subsp. kamtschatica*, *L. subsp. stenantha*, *L. subsp. pallasii*, *L. subsp. altaica* galima priskirti ir kai kurių autorių išskiriamas rūšis – *L. venulosa* (Maxim.) Worosh., *L. edulis* Turcz. ex Freyn, *L. emphylocalyx* (Maxim.) Nakai, *L. boczkarnikowae* Plekhanova.

### **DARBO PRAKTINĖ REIKŠMĖ**

Nustatyti oligonukleotidiniai pradmenys, kurie tinka melsvauogio sausmedžio (*L. caerulea* L.) genetinės įvairovės tyrimams ir filogenetinei analizei. Su jais genotipuota šimtas VU Botanikos sodo sausmedžio kolekcijos pavyzdžių. Palyginus VU Botanikos sodo melsvauogio sausmedžio genetinių linijų ir elitinių veislių genetinę įvairovę, įvertintą RAPD metodu, nustatyta, kad šios genetinės linijos gali būti naudojamos kaip papildomas genetinės įvairovės šaltinis naujoms sausmedžių veislėms kurti. *L. caerulea* L. rūšiai nustatytas savitas RAPD žymuo gali būti naudojamas melsvauogio sausmedžio

ir kitų rūšių hibridų analizei. Dvylikos *Lonicera* L. genties atstovų cpDNR šešių nekoduojančių regionų (*trnH-psbA*, *5'rpS12-rpL20*, *trnL-trnF*, *trnS-trnG*, *rpS16*, *trnS-psbZ*) sekos bus užregistruotos ir papildys NCBI duomenų bazę. Kultūrinių augalų filogenetiniai tyrimai, jų taksonomijos patikslinimas yra svarbu kaupiant ir naudojant rūšies genetinius išteklius, prognozuojant genų introgresijos iš giminingų rūšių sėkmę.

### **GYNIMUI PRISTATOMI TEIGINIAI**

1. RAPD metodas yra tinkamas *Lonicera* L. kolekcijos genetinei įvairovei tirti ir *L. caerulea* L. pavyzdžiams genotipuoti.
2. Melsvauogiui sausmedžiui (*L. caerulea* L.) yra būdingas didelis DNR polimorfizmas.
3. *L. caerulea* L. veislių giminingumo dendrogramos, sudarytos RAPD žymenų pagrindu, neprieštarauja veislių kilmės duomenims.
4. Kai kurie melsvauogio sausmedžio (*L. caerulea* L.) monomorfiniai RAPD lokusai gali būti panaudoti kaip rūšiai saviti žymenys.
5. Remiantis sausmedžio chloroplastų DNR (cpDNR) nekoduojančių specifinių regionų sekoskaitos rezultatais, galima diferencijuoti artimai giminingus *Lonicera* L. genties atstovus.
6. *Lonicera* L. genties filogenetinės analizės rezultatai, gauti RAPD metodu ir cpDNR sekoskaitos duomenų pagrindu, yra panašūs.
7. *L. caerulea* L. rūšis sudaro monofiletinę grupę su kitais, valgomus vaisius vedančiais, sausmedžiais.
8. VU Botanikos sode išvestos sausmedžio genetinės linijos gali būti naudojamos *L. caerulea* L. elitinių veislių genetinei bazei praplėsti.

### **DARBO APROBAVIMAS**

Disertacijos tema paskelbti 2 moksliniai straipsniai ISI Master Journal List sąrašo žurnaluose. Vienas straipsnis priimtas spausdinti ISI Web of Science referuojamame žurnale, turinčiame citavimo indeksą. Tyrimų rezultatai pristatyti trijose tarptautinėse konferencijose.

## **DARBO APIMTIS**

Darbą sudaro santrumpų sąrašas, įvadas, literatūros apžvalga, tyrimo objekto ir metodų aprašymas, gautų rezultatų išdėstymas, rezultatų aptarimas, išvados, mokslinių darbų sąrašas, padėka ir literatūros sąrašas. Darbe pateikiamos 27 lentelės, 25 paveikslai ir 5 priedai. Darbo apimtis – 163 puslapiai (be priedų) ir 26 priedų puslapiai. Panaudoti 305 literatūros šaltiniai.

# I. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1. Sausmedžio genties apžvalga

Pagal šiuolaikinę nomenklatūrą sausmedinių šeima (*Caprifoliaceae* Juss.) skirstoma į du pošeimius: *Lonicera* ir *Caprifolium* (Плеханова, Ростова, 1994). *Lonicera* pošeimyje išskiriamos *Isoxylosteum*, *Isika* ir *Lonicera* sekcijos, kurios apjungia tiesiai augančius krūmus, o *Nintooa* sekcija reprezentuoja daugiausia vijoklinius augalus. *Caprifolium* (23 rūšys) pošeimis apjungia *Phenianthus*, *Cypheolae*, *Caprifolium* sekcijas su vijokliniais ir šliaužiančiais krūmais (Куклина, 2007).

Sausmedinių šeimos augalai – tai krūmai, lianos, nedideli medeliai. Žievė neretai atpleišėjusi, lupasi plonomis skiautelėmis. Pumpurai kryžmiškai priešiniai, kartais serijiniai, tai yra sukrauti vienas virš kito po kelis. Lapai paprasti, ištisiniai arba banguotai skiautėti, dažniausiai be prielapių. Vainikėlis dažniausiai netaisyklingas. Žiedai dvilyčiai, balti, gelsvi, rausvi arba raudoni, dažniausiai smulkūs, apdulkinami vabzdžių (Thompson, Chaovanalikit, 2003). Mezginė apatinė arba vidurinė, su 1-3 lizdais. Vaisius – uoga arba sausa dėžutė (Navasaitis ir kt., 2003; Navasaitis, 2005). Sausmedžiai yra medingi, žydi nuo balandžio iki spalio mėnesio. Savaiminis sausmedžių arealas apima visą Šiaurės pusrutulį. Pati didžiausia sausmedžių įvairovė yra Kinijoje, o Europoje ir Šiaurės Amerikoje – tik apie 20 vietinių rūšių. Labiausiai rūšine sudėtimi ir savaiminiu paplitimu išsiskiria *Isika* sekcijos sausmedžiai (Куклина, 2007).

*Lonicera* L. gentis priklauso sausmedinių *Caprifoliaceae* Juss. šeimai, *Isika* Lebed sekcijai:

Karalystė:	Augalai ( <i>Plantae</i> )
Skyrius:	Magnolijūnai ( <i>Magnoliophyta</i> Cronquist)
Klasė:	Magnolijainiai ( <i>Magnoliopsida</i> Brongn.)
Poklasis:	Astražiedžiai ( <i>Asteridae</i> Takht.)
Eilė:	Karšuliečiai ( <i>Dipsacales</i> Dumort.)
Šeima:	Sausmediniai ( <i>Caprifoliaceae</i> Juss.)
Gentis:	<i>Lonicera</i> L.

Genties sistematika pateikta remiantis USDA (angl. *United States Department of Agriculture*), GRIN (angl. *Germplasm Resources Information Network*), IPNI (angl. *The International Plant Names Index*), NCBI (angl. *National Center for Biotechnology Information Taxonomy Browser*) informacija. Neatitikimas su Lietuvoje naudojama sistematika yra poklasyje, visa *Dipsacales* eilė priskiriama erškėčiažiedžių *Rosidae* Takht. poklasiui (Gudžinskas, 1999).

*Lonicera* L. genčiai lotynišką pavadinimą suteikė švedų sistematikas K. Linėjus (Carl von Linné), pagerbdamas vokiečių botaniką ir gydytoją A. Lonicerą (Жолобова, Прищепина, 2003). Įvairių autorių duomenimis sausmedžių gentyje priskaičiuojama nuo 150 iki 200 rūšių (Rehder, 1903; Гидзюк, 1978; 1981; Плеханова, 1990; Куминов, 1994; Скворцов, Куклина, 2002), iš kurių 10 – 15 turi valgomus vaisius ir priskiriamos *Isika* Rehd. sekcijai, *Caeruleae* Rehd. posekcijai (Витковский, 2003).

*Lonicera caerulea* L. rūšių sausmedžiai būna tetraploidai ( $2n=4x=36$ ), kurie dažniausiai paplitę Šiaurės Eurazijoje bei diploidai ( $2n=2x=18$ ), kurie aptinkami mažose endeminėse vietose, dažniausiai pietų Azijos regione (Tetsuo et al., 2007). Chromosomų skaičius turi svarbią reikšmę kariosistematikoje (Пименов, 2001). Apibendrinus sausmedžio iš 180 arealų sistematinius tyrimus pagal chromosomų skaičių, galima teigti, kad tokiu plačiu kintančiu chromosomų skaičiumi pasižymi ne kiekviena augalų gentis (Ретина, 1969; Мочалова, Плеханова, 1986; Плеханова и др., 1989; 1992; Плеханова, Ростова, 1994). Iš atliktų tyrimų matyti, kad melsvauogio sausmedžio daugumos arealų Europoje ir Azijoje augalai pasižymi tetraploidiškumu. Diploidiškumas būdingas augalams iš Buriatijos, Amūro, Chabarovsko ir Primorės regionų, taip pat Kazachstano (Ретина, 1969; Санкина, Жолобова, 1981; Плеханова и др., 1992).

Plechanova ir Rostova teigia, kad *L. caerulea* L. yra vienas polimorfinis 4x kompleksinis darinys, sudarytas iš aštuonių porūšių (Плеханова, Ростова, 1994). Plechanova ir kt. nurodo, kad rūšys, kurios skiriasi kariotipu, bet morfologiškai labai panašios, yra tos pačios rūšys (Плеханова и др., 1992).

Kadangi chromosomų skaičiaus padidėjimas nustatytas daugelyje sausmedžių rūšių, tai neteisinga rūšį, turinčią skirtingą kariotipą, laikyti atskira rūšimi (Пименов, 2001). Visgi kiti autoriai teigia, kad skirtingas kariotipas yra pakankama priežastis atskirti rūšis vieną nuo kitos (Löve, Löve, 1982).

*Lonicera* L. genties augalai yra palyginti nereiklūs aplinkos sąlygoms (pakantūs pavėsiui, nereiklūs dirvožemiui, atsparūs ligoms, kenkėjams ir t.t.), tinkami pramoniniam naudojimui. Susidaręs sausmedžių pomiškis plačialapiuose miškuose yra vertingas maisto šaltinis įvairiems gyvūnams. Kai kurių rūšių uogos išsilaiko net iki pat vėlyvo rudens ir yra maisto šaltinis paukščiams. Sausmedžio mediena pasižymi geromis techninėmis savybėmis, naudojama meno verslui. Iš kai kurių rūšių lapų gaunami geltoni dažai, o iš uogų – rožiniai, violetiniai maisto dažai. Sausmedinių šeimos augalai noriai auginami soduose, naudojami teritorijų apželdinimui ir miško apsauginėms juostoms. Kai kurie sausmedžiai pasižymi dideliu dekoratyvumu. Visžalės rūšys, atsparios žiemos šalčiams, tinkamos auginti priekalnėse. Vijoklinėmis rūšimis apželdinamos namų sienos, terasos. Didžiausia pramoninė sausmedinių šeimos augalų reikšmė – valgomas uogas brandinančios rūšys ir veislės. Sausmedžių uogos subręsta anksčiau už kitų augalų uogas, jose yra vertingų vitaminų, fenolinių rūgščių, flavonoidų, antocianinų. Taip pat jos gali būti naudojamos kaip natūralus antioksidantų ir įvairių pigmentų šaltinis (Plekhanova, 2000; Chaovanalikit et al., 2004; Svarcova et al., 2007).

### **1.1. *Lonicera* L. genties sistematikos istorija ir problemos**

Melsvauogis sausmedis (*Lonicera caerulea* L.), kaip savita rūšis, išsiskiria iš kitų sausmedžių. Kaip atskira rūšis, ji žinoma dar iki Linėjaus epochos. Pirmuosius sausmedžių aprašymus galima aptikti jau XVI a. (Clusius, 1583). Labai tikėtina, kad Linėjus (Linnaeus, 1753) pats nematė šių augalų natūraliomis sąlygomis, o *L. caerulea* rūšį aprašė pagal kitų autorių duomenis (Skvortsov, 1986).

Po Linėjaus įvairūs autoriai bandė atskirti ir aprašyti dar kitas sausmedžių mėlynomis uogomis rūšis. Žemiau pateikiama rūšių aprašymo chronologija (Скворцов, Куклина, 2002):

1753 m. *Lonicera caerulea* L. Sp. pi.: 239 – Šveicarija.

1784 m. *Lonicera altaica* Pallas, Fl. Ross. 1.1. tab. 37 (sine descr.) – Altajus.

1803 m. *Xylosteum villosum* Michx Fl. Bor.-Amer. 1: 106. – Kanada. – *Lonicera villosa* (Michx.) Roemer et Schultes, 1819. Syst. Veget. 5: 26.

1817 m. *Xylosteum solonis* Eaton, Manual bot. N. Amer.: 26. – Anglija. – *Lonicera solonis* (Eaton) Sprengel, 1825. Syst. Veget. 1: 759.

1821 m. *Lonicera pallasii* Ledeb., Index sem. Horti Dorpat. Append.: 20 – Sibiras.

1830 m. *Lonicera velutina*. DC. Prodr. 4: 337 – Kanada.

1877 m. *Lonicera reticulata* Maxim., Bull. Acad. Sci. S. Petersb. 24: 40. – Japonija.

1880 m. *Lonicera venulosa* Maxim., Bull. Acad. Sci. S. Petersb. 26: 542. – Nom. nov. pro *L. reticulata* Maxim. 1877, non Champion. 1852.

1882 m. *Lonicera reticulata* Borbas, Erdeszeti Lapok 16: 164 et Osterr. Bot. Z. 32: 136. – Croatija. – *Caprifolium borbasianum* O. Kuntze, 1891, Rev. Gener. Pl. 1: 247. – *Lonicera borbasiana* (O. Kuntze) Degen in Javorka, 1925. Magyar Pl.: 1049.

1886 m. *Lonicera emphylocalyx* Maxim., Bull. Acad. Sci. S. Petersb. 31: 58 – Japonija.

1902 m. *Lonicera edulis* (Turcz.) Freyn, Osterr. Bot. Z. 52: 111 – Transbaikalas.

1925 m. *Lonicera cauriana* Fernald, Rhodora, 27, 313: 10 – Šiaurės Amerika.

1935 m. *Lonicera stenantha* Pojark., Ботан. журнал. 20, N 2: 1455 – Vidurio Azija.

1958 m. *Lonicera kamtschatica* (Sevast.) Pojark., Флора СССР. 23: 730 – Kamčiatka, Sachalinas.



1958 m. *Lonicera baltica* Pojark., Флора СССР. 23: 731 – Šiaurės-vakarų Europinė dalis, Švedija.

1958 m. *Lonicera turczaninowii* Pojark., Флора СССР. 23: 731 – Pietų-vakarų Sibiras, Primorė, Šiaurės-vakarų Kinijos dalis.

1958 m. *Lonicera buschiorum* Pojark., Флора СССР. 23: 733 – Kaukazas.

1958 m. *Lonicera iliensis* Pojark., Флора СССР. 23: 734 – Pietų-vakarų Kazachstanas, Kinijos Džiungurijos regionas.

1958 m. *Lonicera x subarctica* Pojark. (= *L. altaica* x *L. pallasii*), Флора Мурманской обл. 5: 424 – Šiaurinė Europinė dalis, Vakarų Sibiras.

1975 m. *Lonicera regeliana* Boczkar., Тр. ВИР. 54. № 1: 241 (= *L. bozchkarnikova* Plekhanova, Ботан. журнал. 1994. 79. № 6: 60) – Pietų Primorė.

Rehder 1903 m. savo monografijoje aprašydamas *Lonicera* L. gentį, išskyrė posekciją *Caeruleae* Rehd., ir teigė, kad ji susideda tik iš vienos polimorfinės holarktinės *L. caerulea* L. rūšies, kurią sudaro aštuoni skirtingi porūšiai ir formos. Tokios pat nuomonės buvo ir P. Kirillow (1849) bei kiti (Вольф, 1899; Говорухин, 1937; Гроссгейм, 1949; Попов, 1959; Petersone 1959; Ramanauskas, 1976). Tuo tarpu G. Krüssmann (1977) *Lonicera* L. gentyje išskyrė 4 sekcijas ir 20 posekcijų.

Kai kurių autorių nuomone Šiaurės Amerikoje auga *L. caerulea* L. (= *L. villosa* Muhl.) rūšis, kuri identiška melsvauogiui sausmedžiui iš Europos ir Sibiro (Torrey, Gray, 1838). Pietų Korėjoje išleistame leidinyje „Korėjos flora“ (Nakai, 1921) nurodoma *L. caerulea* su varietetais: var. *edulis* (Turcz.) Regel, var. *glabrescens* Rupr., var. *venulosa* (Maxim.) Rehd., var. *altaica* (Pall.) Sweet. Vėliau Japonijos sistematikai leidinyje „Japonijos flora“ (Ohwi, 1965) taip pat išskyrė *Lonicera caerulea* su trimis varietetais: var. *edulis* Turcz. et Herder (Šiaurės Japonija, Kamčiatka, Kurilų salos, Sachalinas, Sibiras), var. *emphylocalyx* (Maxim.) Nakai (Šiaurės ir Vidurio Japonija), var. *venulosa* (Maxim.) Rehd. (Japonija, Šiaurės Amerika).

Po Rehder darbų vis labiau plėtėsi bandymai atrasti naujas rūšis poseksijoje *Caeruleae*. Kaip rašoma „Флора СССР“ (Пояркова, 1958), buvusios Sovietų Sąjungos respublikų teritorijose yra 10 sausmedžių rūšių: *L. caerulea* L., *L. altaica* Pall., *L. pallasii* Ledeb., *L. edulis* Turcz. ex Freyn., *L. stenantha* Pojark., *L. buschiorum* Pojark., *L. baltica* Pojark., *L. turczaninowii* Pojark., *L. kamtschatica* (Sevast.) Pojark., *L. iliensis* Pojark. Šiame leidinyje aprašytų rūšių užimami arealai persidengia vienas su kitu.

Bočkarnikova (Бочкарникова, 1975) aprašė *L. regeliana* Boczkar. rūšį, kurios vėliau kai kurie autoriai nepripažino (Ворошилов, 1982; Недолужко, 1984, 1986) dėl to, kad šis rūšies pavadinimas anksčiau buvo panaudotas kitai vakarų Azijos rūšiai *L. chrysantha* (f. *regeliana*) iš sekcijos *Coeloxylosteum* Rehd. pavadinti. Vėliau Plekhanova (Плеханова, 1994b) pakeitė nesėkmingai pavadintų rūšių vardus, pvz., *L. regeliana* pakeitė į *L. boczkarnikovae* Plekhanova. 1979 m. Bočkarnikova aprašė Pietų Primorėje rastą dar vieną rūšį – *L. emphylocalyx* Maxim. (Бочкарникова, 1979), kurią jau anksčiau (1886 m.) apibūdino Maximowicz. Kaip rašo kiti autoriai (Недолужко, 1984), jei šią rūšį charakterizuoti kaip Japonijos rasę (naudojant siauresnį rūšies apibrėžimą), tai jos teisingesnis pavadinimas būtų *L. venulosa* Maxim.

Žinomi bandymai suskaldyti aukščiau minėtas rūšis į porūšius (Скворцов, Куклина, 2002):

- *L. caerulea* subsp. *edulis* (Turcz.) Hulten (Hultén, 1930);
- *L. caerulea* subsp. *pallasii* (Ledeb.) Browicz. (Browicz, 1974);
- *L. caerulea* subsp. *hirsuta* (Regel) (Куваев, 1980);
- *L. caerulea* subsp. *venulosa* (Maxim.) Worosch. (Ворошилов, 1982);
- *L. caerulea* subsp. *villosa* (Michx.) (Löve, Löve, 1982).

Taip pat nėra vieningos nuomonės apie sausmedžių, paplitusių Šiaurės Amerikoje, sistematiką. Fernald (1925), charakterizuodamas melsvauogius sausmedžius Šiaurės Amerikoje (JAV vakaruose), pripažįsta *L. villosa* (Michx.) Roemer et Schultes rūšį su 5 varietetais: var. *villosa*, var. *solonis* (Eaton) Fernald, var. *calvescens* (Fernald et Wieg) Fernald, var. *tonsa* Fernald,

var. *fulleri* Fernald ir rūšį *L. cauriana* Fernald – JAV rytuose, nes pastaroji turi raudonas uogas. Veikale „Šiaurės-vakarų JAV ir Kanados flora“ (1963) Gleason, kaip ir Fernaldas, pripažįsta tik *L. villosa* (Michx.) Roemer et Schultes su tais pačiais varietetais: var. *villosa*, *solonis*, *calvescens*, *tonsa*, *fulleri*. Tokią sausmedžių sistematinę padėtį Šiaurės Amerikoje pripažįsta ir Hultenas su Skoganu (Hultén, 1971; Scoggan, 1979).

Paskutiniaisiais dešimtmečiais pasirodė publikacijų, kuriose pateikiama kitokia sausmedžių sistematika. Pavyzdžiui, Wang ir Gu, tyrinėdami *L. edulis* rūšį, nusprendė būtinai išskirti naują gentį *Metalonicera* M. Wang et A.G. Gu ir pakeisti *L. caerulea* į *Metalonicera edulis* (Turcz.) M. Wang et A.G. Gu. Tokią išvadą ir pasiūlymą autoriai grindžia remdamiesi uogų morfologiniais požymiais (Wang, Gu, 1988; Wang, Gu, 1990). Šių mokslininkų nuomonę taip pat palaiko ir kai kurie rusų sistematikai (Черепанов, 1995).

Hara savo monografijoje (Hara, 1983) apie *Caprifoliaceae* šeimos augalus Japonijos teritorijoje, visus melsvauogio sausmedžio atstovus priskiria *L. caerulea* subsp. *edulis* (Turcz.) Hulten., nors išoriniai šios rūšies augalų požymiai labai varijuoja. Be vyraujančios formos (*var. edulis*) autorius išskiria dar du varietetus – *var. emphylocalyx* (Maxim.) Nakai ir aukštai kalnuose sutinkamą *var. venulosa* (Maxim.) Rehd.

Vorošilovas (Ворошилов, 1992) pripažino penkias sausmedžių rūšis: holarktinę rūšį *L. caerulea* (kartu su Amerikos rasėmis ir sausmedžiais iš Europos, Sibiro ir Kamčiatkos), *L. altaica* (Europinė Rusijos sritis, Vakarų Sibiras), *L. stenantha* (kalnuota Vidurinė Azija, Kaukazas, Altajus), *L. venulosa* (Amūras, Sachalinas, Primorė, Kurilai, Šiaurės-vakarų Kinija ir Japonija) bei *L. iliensis*. Šis autorius minėtas rūšis išskyrė remdamasis morfologiniais požymiais (žiedo forma ir lapų plaukuotumu), ignoruodamas chromosomų skaičių. Iš porūšių Vorošilovas pripažįsta tik *L. caerulea* subsp. *pallasii* (Ledeb.) Browicz ir, savo ruožtu, siūlo išskirti dar tris porūšius: *L. altaica* subsp. *subarctica* (Pojark.) Worosch., *L. venulosa* subsp. *edulis* (Turcz. ex Freyn) Worosch., *L. venulosa* subsp. *emphylocalyx* (Maxim.) Worosch.

Plekhanova (Плеханова, 1994a), spręsdama sausmedžio sistematikos problemas, pasiūlė atsižvelgti į chromosomų skaičių ir išskirti vieną tetraploidinę polimorfišką *L. caerulea* rūšį, kurios arealas labai platus, ir tris endemines diploidines rūšis: *L. edulis*, *L. bozkarnikovae* ir *L. iliensis*. Tačiau taip traktuojant melsvauogio sausmedžio sistematiką, *L. edulis* atžvilgiu gaunama paradoksali situacija, nes, kaip teigia ir pati Plekhanova (Плеханова и др., 1992), ši rūšis Jakutijoje, Čitinsko ir Amūro srityse yra diploidinė, o kitur aptinkama morfologiškai identiška tetraploidinė *L. edulis* rūšis. Plekhanova taip pat siūlė *L. caerulea* rūšies viduje išskirti keletą porūšių – *caerulea*, *emphyllocalyx*, *pallasii*, *kamtschatica*, *venulosa*, *altaica*, *stenantha*, teigdama, kad šios rūšies vidurūšinei sistematikai būtini detalesni tyrimai (Плеханова, Ростова, 1994).

Toks *Caeruleae* posekcijos, kaip turinčios daug rūšių (priskaičiuojama apie 20), traktavimas yra sietinas su tradiciniu požiūriu, paremtu tipologiniu taksono supratimu, kai esant bet kokiam morfologiniam skirtumui ir netiriant molekulinės biologijos metodais, augalai, turintys didesnius skirtumus, vertinami kaip skirtingų rūšių atstovai. Laikantis šios pozicijos, aprašoma daug rūšių, bet nėra išskiriamos aiškios jų arealų ribos. Išskiriami morfotipai, kurie būdingi konkreitiems arealams (Altajaus, Kamčiatkos). Tai patogiu atliekant praktinius selekcinis darbus, tačiau nesant aiškių kriterijų nustatant sausmedžio rūšis, atsiranda dideli netikslumai turimose kolekcijose.

Šiuo metu Rusijos mokslininkai laikosi vienos nuomonės, kad bent jau Eurazijoje posekcijoje *Caeruleae* galima išskirti ne daugiau kaip dvi rūšis – *L. caerulea* L. ir *L. iliensis* Pojark (Плеханова, Ростова, 1994; Скворцов, Куклина, 2002). Taigi, *L. caerulea* rūšyje priskaičiuojama daug ekologinių-geografinių rasių ir klimatinių tipų, sujungiančių tarpusavyje pereinamas formas, kurių negalima tiksliai apibūdinti morfologiškai ir priskirti apribotam arealui tam, kad būtų galima laikyti atskiru taksonu. Skvorcov ir Kuklina (Скворцов, Куклина, 2002) siūlo tokią *L. caerulea* rūšies vidurūšinę sistematiką: *L. caerulea subsp. caerulea* (= *L. emphyllocalyx* Maxim., *L. venulosa* Maxim., *L. reticulata* Maxim., *L. altaica* Pall., *L. pallasii* Ledeb., *L.*

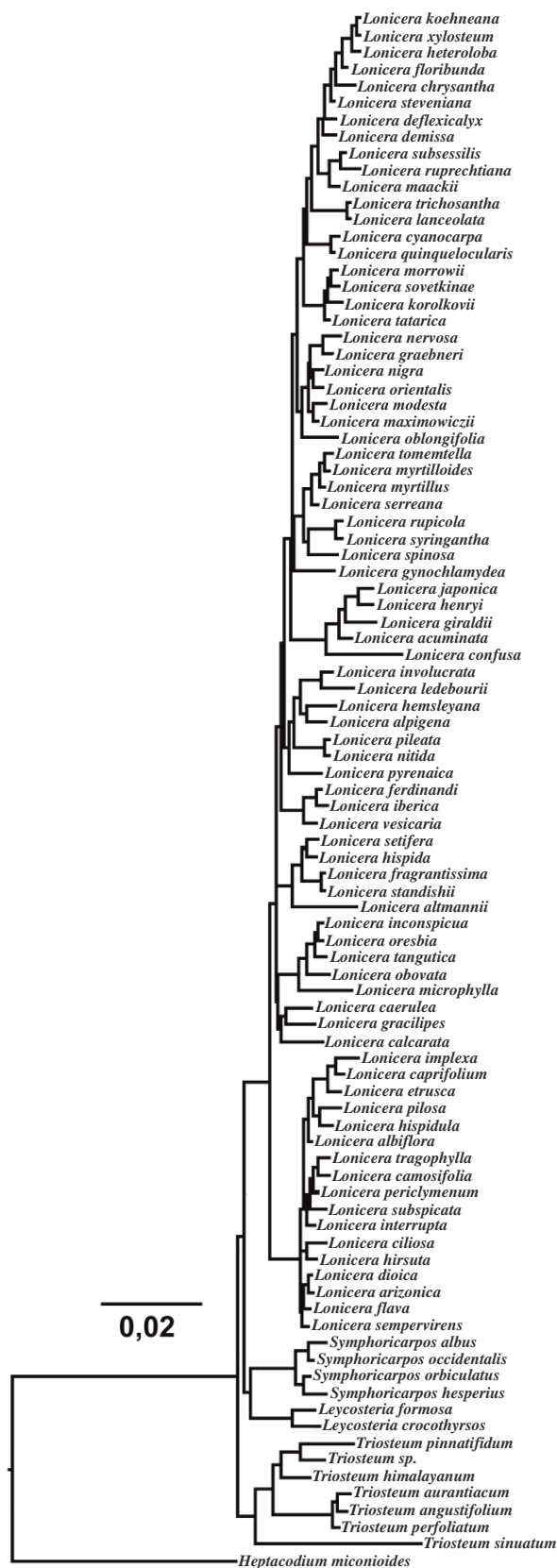
*edulis* Turcz. ex Freyn, *L. baltica* Pojark., *L. buschiorum* Pojark., *L. turczaninowii* Pojark., *L. kamtschatica* (Sevast.) Pojark., *L. x subarctica* Pojark., *L. regeliana* Boczkarn.). Ši rūšis auga Centrinėje Europoje, Europinėje Rusijos dalyje, Baltijos šalyse, Kaukaze, Vakarų ir Rytų Sibire, Tolimuose Rytuose ir Japonijoje.

Kaip matyti, sausmedžių sistematikoje pirmenybė teikiama morfologiniams, ekologiniams-geografiniams ir iš dalies citologiniams metodams. Požiūris į rūšių sistematiką keitėsi, kai buvo pradėti naudoti biocheminiai, imunocheminiai ir matematinės statistikos metodai.

Šiuolaikinė sistematika yra neatsiejama nuo augalų pavadinimų, registruojamų duomenų bazėse, tokiose kaip JAV sistematikos duomenų bazė GRIN (angl. *Germplasm Resources Information Network*) ir Tarptautinė augalų vardų bazė IPNI (angl. *The International Plant Names Index*). Tačiau ir šiose duomenų bazėse galima aptikti *Lonicera* L. genties rūšių skaičiaus neatitikimų. Trūkstant genetinių tyrimų, augalai tradiciškai klasifikuojami remiantis morfologiniais požymiais. Todėl, naudojant šiuolaikinius prieinamus molekulinis žymenis, galima patikslinti sistematinius rangus, nustatyti filogenetinius ryšius. Be to, daugelis mokslininkų botanikų, aprašydami *Lonicera* L. genties sausmedžių tyrimus, nesilaiko tarptautinės botanikos nomenklatūros normų: ta pati rūšis pavadinama skirtingais vardais, skiriasi taksonominis jos traktavimas ir t.t.

## **1.2. *Lonicera* L. genties kilmė**

Didelė sausmedžio rūšių įvairovė liudija apie sudėtingą šios augalų genties evoliuciją. Naujausi fitogeografiniai tyrimai, paremti cpDNR regionų ir ITS sekoskaita, rodo, kad gaubtasėklių augalų *Caprifolieae* (*Caprifoliaceae*) klada (angl. *clade*), kuriai priklauso ir *Lonicera* gentis, yra tikriausiai kilusi iš Azijos, kur ir vyko rūšių diversifikacija. Vėliau, matyt, vyko daugkartinis plitimas į Europą ir Šiaurės Ameriką. Manoma, kad kai kurios *Lonicera* rūšys atsirado prieš 21 – 36 mln. metų (Smith, 2009) (1 pav.).



1 pav. Caprifoliaceae šeimos filogenetinė dendrograma sudaryta naudojant *atpB-rbsL*, *ITS*, *petN-psbM*, *psbM-trnD*, *rpoB-trnC* ir *trnS-trnG* cpDNR tarpgeninius regionus, pagal Smith (2009) gautus duomenis

Remiantis šiuolaikinių *Lonicera* L. genties augalų daugiamečiais tyrimais (Рябова, 1980), išskiriami 2 kilmės rajonai. Teigiama, kad vijokliniai sausmedžiai galėjo kilti tropinių miškų zonose nuo Pietų-Rytų Azijos iki Pietų Europos ir Šiaurės Amerikos (iki Š. Amerikos ir Eurazijos kontinentų atsiskyrimo). Stačius krūmus turinčių rūšių centras yra Rytų Azijoje, Kinijoje (auga 42 rūšys, priklausančios 14 posekcijų). Klimatui atšalus, Šiaurės pusrutulyje išnyko daug sausmedžio rūšių, o po ledyno atsitraukimo daugelyje Eurazijos vietų paplito posekcijos *Caeruleae* rūšys, pastarajai priskiriamas ir melsvauogis sausmedis iš *Lonicera* genties.

Šiuo metu turimi duomenys apie *Lonicera* L. genties evoliuciją nekelia abejonių: pirminis kilmės centras, iš kurio ir paplito šios genties atstovai, buvo miškingi Vakarų ir Pietvakarių Azijos rajonai. Manoma, kad pirminės sausmedžių formos evoliucionavo dabartinės Kinijos teritorijoje, nes augalams iš Kinijos yra būdingi visi augalų iš Vidurio Azijos, Užbaikalės ir Japonijos požymiai (Skvortsov, 1986). Sausmedžio rūšys, o tuo labiau posekcijos *Caeruleae* porūšiai, yra palyginti jauni (Хохряков, 1975; Рябова, 1980; Недолужко, 1986). Šie augalai paplito borealinėje dalyje, toliau už kitas rūšis išplito į šiaurę, todėl pasižymi išskirtiniu atsparumu šalčiui ir ekologiniu plastiškumu. Nedoluzko nuomone (Недолужко, 1986), sausmedžių protėviai anksčiau buvo sutinkami spygliuočių medžių pomiškyje. Tuo galima paaiškinti jų labai ankstyvą žydėjimą.

Kaip mano Bobrovas (Бобров, 1983), prasidėjus visuotiniam atšilimui, šiaurės miškuose prasidėjo introgresinė hibridizacija tarp Vakarų Europos ir Sibiro sausmedžių populiacijų individų, todėl atsirado hibridai, kurie plačiai paplito Šiaurėje. Tėvinės formos, kurios davė pradžią dabartiniam porūšiui *Lonicera caerulea* subsp. *stenantha*, išplito Centrinės Azijos kalnais iki Kaukazo, kur susidarė uždaros *L. buschiorum* populiacijos. Vis dėlto, augalai iš Kaukazo labiau panašūs į sausmedžius iš Sibiro. Todėl manoma, kad dabartiniai sausmedžiai pakartotinai išplito kalnų rajonuose, esančiuose Vidurio Azijoje. Jeigu laikytis nuomonės, kad sausmedžių diploidiskumas yra antrinis ir diploidinės rūšys išsivystė iš tetraploidinių rūšių, tai galima teigti,

kad *L. iliensis* rūšis atsirado nedideliuose plotuose kalnų papėdėse, kur ji prisitaikė ir įgavo kserofitinių savybių. *L. iliensis* ir *L. caerulea* kilmę iš bendro protėvio patvirtina ir šių rūšių morfologinis panašumas bei plastiškumas, prisitaikant prie tam tikrų ekologinių sąlygų (pvz., abiejų rūšių augalai gali augti rūgščiose dirvose) (Куклина, Скворцов, 1990).

## 2. Molekuliniai žymenys ir augalų filogenetiniai tyrimai

Filogenetika (*gr. phylon* – gentis, veislė, rūšis + *genetikos* – susijęs su kilme, gimimu) yra genetikos mokslo sritis, kuri tiria įvairių grupių organizmų raidos dėsnius ir jų tarpusavio ryšius. Istoriskai filogenetiniai ryšiai ir skirtumai tarp gyvų organizmų buvo tiriami naudojant morfologinius žymenis. Atsiradus naujoms molekulinės biologijos techninėms galimybėms, nustatoma vis daugiau įvairių organizmų genomų, o sekos dažniausiai skelbiamos viešai. Dėl to atsiranda galimybė tirti įvairių organizmų panašumą molekuliniam lygmenyje, nubraižyti filogenetines dendrogramas, kurios yra žymiai tikslesnės už tas, kurios sudaromos remiantis vien morfologiniais ar cheminiais požymiais (Shui, 2008). Filogenija paremta klasifikacija grupuoja organizmus pagal jų evoliucinius ryšius.

Iki šiol morfologiniai skirtumai išlieka svarbiu kriterijumi augalų sistematikoje, o taip pat vertinant mutacijas ir nustatant filogenetinius ryšius. Vis dėlto, morfologiniai požymiai ne visada suteikia pilną informaciją apie skirtumus tarp augalų rūšių ir rūšių tarpusavio ryšius, nes šiems požymiams didelę įtaką daro aplinkos sąlygos ir jie pasireiškia dažniausiai vėlesnėse ontogenezės stadijose. Be to, nepakankama morfologinių žymenų įvairovė apsunkina jų panaudojimą selekcijoje, ypač pagal ūkiškai naudingas augalo savybes (pvz., produktyvumą, derlingumą, atsparumą biotiniams ir abiotiniams stresams ir kt.). Todėl kartu su morfologiniais žymenimis naudojami ir biocheminiai žymenys – izofermentų ir atsarginių baltymų polimorfizmas. Metodai, kurie panaudojami augalų biocheminiam polimorfizmui tirti, taip pat turi trūkumų, nes baltymai yra genų produktai, kurių susidarymui įtakos turi



aplinkos veiksniai, audinio specifiškumas arba net vidiniai veiksniai, pavyzdžiui, augalo amžius (Stegemann et al., 1973; Hosaka et al., 1985). Be to, kai kurių veiksnių (pvz., skirtingų augimo sąlygų, užsikrėtimo virusinėmis ligomis ir kt.) poveikis gali pasireikšti kaip kokybinis ar kiekybinis pakitimas to paties genotipo baltymų elektroforegramose.

Filogenetiniuose tyrimuose daug perspektyvesni yra tiesioginės DNR analizės arba DNR žymenų metodai, iš kurių vienas pirmųjų pradėtas naudoti – restrikcijos fragmentų ilgio polimorfizmas – RFLP (angl. *Restriction Fragment Length Polymorphism*). Šis metodas paremtas specifinių endonukleazių vykdomu savitu DNR skaldymu ir jos hibridizacija su žymėtu DNR zonu (Botstein et al., 1980). RFLP polimorfizmas atsiranda tada, kai dėl vienos bazių poros mutacijos prarandama arba atsiranda papildoma restrikcijos vieta arba kai dėl insercijos/delecijos pakinta restrikcijos fragmento dydis. Šie pakitimai nustatomi autoradiogramoje. Tokius pakitimus savitame geno lokuse galima panaudoti augalų rūšims ar, kai kuriais atvejais, net atskiriems augalams atskirti. RFLP buvo bene pirmasis DNR žymenų metodas, panaudotas filogenetiniuose tyrimuose (Song et al., 1988; Havey, Muehlbauer, 1989; Gawel et al., 1992). Naudojant RFLP žymenis sudaryti daugelio daugiamečių sodo augalų rūšių genolapiai: obelų (Nybom, Shaal, 1990), citrusinių (Fang et al., 1997), vyšnių (Wang et al., 2000) ir kt. Tačiau RFLP metodas reikalauja didelių darbo sąnaudų, susideda iš daugelio etapų, naudojami radioaktyvūs izotopai, reikalingi labai geros kokybės DNR pavyzdžiai. Išvardinti metodo trūkumai stipriai apriboja RFLP naudojimą augalų genomui tirti. Daug plačiau augalų filogenetikoje ir filogeografijoje naudojama šio metodo modifikacija – PCR-RFLP (Gravendeel et al., 2001; Xiang et al., 2004; Maliouchenko et al., 2007).

Didelis molekulinės biologijos proveržis analizuojant augalų genomą buvo pasiektas pradėjus naudoti molekulinis žymenis, paremtus polimerazinės grandininės reakcijos (PGR) principu. PGR – tai DNR pagausinimas *in vitro*, kai per trumpą laiką  $10^8$  kartų padidėja tam tikro DNR fragmento kiekis (Mullis, Faloona, 1987). Šiuo metu žinoma apie keturiasdešimt tipų DNR

žymenų, iš kurių daugelio nustatymas pagrįstas PGR. Ypač populiarūs tokie metodai, kuriuose PGR naudojami nespecifiniai pradmenys. Nespecifinių pradmenų pagalba galima tirti daug augalų rūšių, apie kurių genomą yra mažai duomenų. Iki šiol dažniausiai naudojamas šio tipo metodas yra RAPD (angl., *Random Amplified Polymorphic DNA*), kuris buvo sukurtas 1990 m. (Williams et al., 1990). RAPD žymenys nepriklauso nuo aplinkos, organizmo raidos stadijos, pasižymi dideliu polimorfiškumu, tolygiai pasiskirstę genome, greitai ir gana pigiai nustatomi (Žvingila, 2009). Šis metodas, nepaisant kai kurių trūkumų, iki šiol taikomas sprendžiant įvairius augalų taksonomijos klausimus.

1993 m. Paran ir Michelmores sukūrė naujo tipo DNR žymenis, kurie ištaisė keletą tradicinio RAPD metodo trūkumų. Naujas žymuo buvo gautas klonuojant ir sekvenuojant RAPD metodu pagausintas kai kurias DNR sekas. Sekoskaitos pagrindu buvo sukurti iki 24 nt ilgio oligonukleotidiniai pradmenys komplementarūs konkrečiaus RAPD fragmento galams. Panaudojus tradicinį PGR metodą, šitaip sukurti pradmenys pagamina vieną savitą analizuojamo pavyzdžio genominės DNR fragmentą. Naujai sukurti žymenys buvo pavadinti SCAR (angl. *Sequence Characterized Amplified Regions*). Nors SCAR žymenys imlūs darbo ir laiko sąnaudoms, jie turi pranašumą palyginti su RAPD. SCAR žymenis galima panaudoti genolapių sudarymui, nes juos naudojant galima pritaikyti griežtas PGR sąlygas, kurios pašalintų bet kokį atsitiktinį pradmenų prisijungimą prie genominės DNR. Taip pat SCAR žymenys yra specifiški analizuojamam lokusui, tai palengvina gauto fragmento nustatymą. Kadangi šie žymenys patikimesni nei RAPD, jie gali būti naudojami tam tikriems genotipams identifikuoti savitų RAPD juostų pagrindu.

## **2.1. RAPD metodo taikymas augalų sistematikoje**

RAPD metodas naudojamas nustatant DNR fragmentų polimorfizmą (Hadrys et al., 1992; Newbury, Ford-Lloyd, 1993). RAPD priskiriamas MAAP (angl. *Multiple Arbitrary Amplicon Profiling*) metodams (Welsh, McClelland,

1990; Caetano-Anollés, 1993; 1994). Kiti tos pačios kategorijos metodai, kuriuose atliekama PGR ir naudojami labai trumpi pradmenys, yra AP-PCR (angl. *Arbitrary Primed PCR*) (Welsh; McClelland, 1990) ir DAF (angl. *DNR Amplification Fingerprinting*) (Caetano-Anollés et al., 1991).

Pasak S. Harris (1999), idealūs žymenys, tinkami filogenetiniams tyrimams, turi tenkinti šiuos reikalavimus:

- 1) jų kintamumas turi būti stebimas tam tikrame taksoniniame lygmenyje;
- 2) turi nepriklausyti nuo aplinkos poveikio ir organizmo raidos stadijos;
- 3) kodominuojantis paveldėjimas;
- 4) neturi sąveikauti su kitų žymenų lokusais;
- 5) turi būti patikimi/atsikartojantys;
- 6) turi būti tolygiai pasiskirstę genome;
- 7) vienodą arba panašią žymenų būseną (pvz., DNR juostų padėti elektroforegamoje) turi apspręsti bendra kilmė.

Idealus žymuo suteikia galimybę vienareikšmiškai apibūdinti taksoną (Harris, 1999). RAPD žymenys nuo pat jų sukūrimo naudojami augalų filogenetikoje (Demeke et al., 1992; Adams, Demeke, 1993; Böhm et al., 1993; Stewart, Porter, 1995; Fu et al., 2002; Rao et al., 2007; Vir et al., 2009). RAPD žymenys naudojami sistematikoje ir dėl jų santykinai nebrangaus nustatymo, didelio lokusų skaičiaus, atsitiktinės pradmens sekos (Williams et al., 1993; Weising et al., 1995).

Norint įvertinti šio metodo tinkamumą filogenetikos problemoms spręsti, reikia suprasti jo mechanizmus, o taip pat metodo privalumus ir trūkumus. Nepaisant plataus šio metodo taikymo, yra labai nedaug publikacijų, kuriose aiškinami jo mechanizmai ir esmė (Caetano-Anollés et al., 1992; Venugopal et al., 1993; Wagner et al., 1994). Pavyzdžiui, Venugopal ir kt. (1993) teigia, kad galimą RAPD polimorfizmą apsprendžia daugybė po genomą išsibarsčiusių sričių, kurias supa taisyklingos arba išsigimusios invertuotos pasikartojančios sekos, prie kurių ir jungiasi pradmuo. Tokios pradmenų prisijungimo vietos pasklidę tiek branduolio, tiek organoidų genomuose (Williams et al., 1993;

Aagaard et al., 1995), tiek koduojančioje, tiek ir nekoduojančioje DNR (Caetano-Anollés et al., 1993). Caetano-Anollés su kolegomis (1992; 1993) pasiūlė gana sudėtingą RAPD mechanizmą, pagrįstą įvairiai prisijungusių pradmenų ir DNR molekulių tarpusavio sąveika bei jos įtaka galutinių produktų susidarymui. Tai, autorių nuomone, susiję su dviem genomines „atrankos“ lygiais. Pirmiausia vyksta pradmenų prisijungimo vietų atranka, kurią nulemia pradmens savybės ir reakcijos sąlygos. Antrajame atrankos lygyje skirtingai pagausinami pradiniai amplifikacijos produktai. Šiai atrankai įtaką daro DNR koncentracija ir DNR matricos seka. Suprantama, kad tokia sudėtinga stochastinė ir dinaminė pusiausvyra daro RAPD metodą labai jautrų eksperimento sąlygoms ir priklausomą nuo pagausinamų DNR RAPD lokusų. DNR molekulių RAPD polimorfizmą lemia daugelis priežasčių:

- 1) nukleotidų pakaitos, dėl kurių išnyksta arba susidaro naujos pradmenų prisijungimo sritys;
- 2) antrinės struktūros susidarančios tarp šių sričių (Bowditch et al., 1993);
- 3) intarpai-iškritos ar inversijos tiek pradmenų prisijungimo vietose, tiek tarpuose tarp šių vietų (Williams et al., 1993).

Stebimi RAPD juostų ryškumo skirtumai priklauso nuo produkto kopijų skaičiaus, konkurencijos tarp PGR produktų, heterozigotiškumo, pradmenų dalinio prisijungimo prie „išsigimusio“ saito (Adams, Demeke, 1993; Venugopal et al., 1993; Dowling et al., 1996).

RAPD metodo trūkumai ir būdai juos sumažinti gana plačiai aptarti mokslinėje literatūroje (Smith et al., 1994; Rieseberg, 1996; Staub et al., 1996; Pérez et al., 1998; Hansen et al., 1998; Harris, 1999; Atienzar, Jha, 2006). Sprendžiant filogenetikos klausimus, susiduriama su pagrindiniais metodo trūkumais – juostų atsikartojamumu ir homologijos tarp jų nebuvimu. Nežiūrint to, daugelis autorių nurodo, jog griežtai kontroliuojant sąlygas toje pačioje laboratorijoje, galima gauti patikimus rezultatus. Vis dėlto tų pačių žymenų panaudojimas skirtingose laboratorijose gali būti sudėtingas, ypač jeigu naudojami skirtingi termocikleriai ir elektroforezės sistemos (Staub et al., 1996). RAPD juostų homologija grindžiama prielaida, kad vienodo dydžio

DNR fragmentai, migruojantys gelyje vienodu greičiu, yra homologiški. Tačiau, kaip rodo tyrimai, taip yra ne visada. Rieseberg (1996) nustatė, kad iš 220 komigruojančių RAPD produktų 91% buvo homologiški trijose *Helianthus* rūšyse. Nepaisant tokio gana optimistinio rezultato, autorius mano, kad apie 13% šių juostų, matyt, yra paralogai, o ne ortologai. Problemas, susijusias su homologijos nustatymu, galima bent dalinai išspręsti naudojant didesnės skiriamosios gebos gelius, taikant hibridizaciją pagal Southern'ą, atliekant restrikcinę analizę arba RAPD juostų sekoskaitą. Tačiau paralogų ir ortologų atskyrimo klausimas lieka atviras (Stothard, 1997). Deja, panašiais trūkumais pasižymi ir daugelis kitų populiarių DNR žymenų metodų (AFLP, SSRs, SSCP) (Harris, 1999; Goulão et al., 2001).

Kritinis RAPD metodo vertinimas nereiškia, kad jis nėra tinkamas augalų sistematikos tyrimams. Metodo vertę atskleidžia gausios publikacijos ir jose pateikti vertingi duomenys (Gimenes et al., 2000; Raina et al., 2001; Nkongolo et al., 2002; Kochieva et al., 2002; Fu et al., 2002; Ma et al., 2004; Yamagishi et al., 2005; Rao et al., 2007; Minoos et al., 2008; Ram et al., 2008; Yang et al., 2008; Vir et al., 2009). Kai kuriais atvejais – tai vienintelis tinkamas metodas. Ypač svarbu pažymėti, kad juo nustatomi DNR lokusai gana tolygiai pasiskirstę po visą genomą (Harris, 1999). RAPD duomenys vertingi diferencijuojant giminingas rūšis, nustatant tarprūšinės hibridizacijos atvejus (Sale et al., 1996; Sedgley et al., 1996; Zamora et al., 1996; Fu et al., 2002; Yang et al., 2008; Vir et al., 2009). Rieseberg (1996) taip pat pripažino, kad RAPD gali būti naudojamas vidurūšiniams ir artimai giminingų rūšių tyrimams.

**RAPD duomenų analizės metodai.** RAPD duomenys dažniausiai registruojami atsižvelgiant į juostos (PGR produkto) buvimą (+ alelis arba 1) arba nebuvimą (- alelis arba 0). Kadangi nėra aiškių vertinimo kriterijų, juostų intensyvumas neregistruojamas (Harris, 1999). Staub ir kt. (1996) pasiūlė RAPD profilius vertinti pagal tokią schemą:

- registruoti tik tam tikro dydžio juostas;

- registruoti tik ryškius amplifikacijos produktus, nes, kaip rodo praktika, jų atsikartojamumas yra geresnis, nei neryškių;
- vertinti juostas, esančias gelio dalyje, kurią apriboja sunkios ir lengvos monomorfinės juostos, nes pagal pastarųjų buvimą ar nebuvimą galima spręsti apie amplifikacijos kokybę.

Laikantis šių atrankos kriterijų, sumažėja registruojamų juostų skaičius, tačiau padidėja jų patikimumas. RAPD duomenų patikimumą padidina ir pakartotinis DNR išskyrimas, RAPD pakartojimai, reikiamos kontrolės panaudojimas RAPD atsikartojamumui ir užteršimo nebuvimui įvertinti.

Dažniausiai naudojamas RAPD duomenų apdorojimo būdas – panašumo nustatymas, kurį galima atlikti trimis metodais:

1) apskaičiuojant paprasto atitikimo koeficientą SMC (angl. *Simple Matching Coefficient*) (Sneath, Sokal, 1973), kai nustatoma esančių ir nesančių juostų RAPD profiliuose sutapimo dalis;

2) apskaičiuojant Jaccard'o koeficientą J (angl. *Jaccard's coefficient*), kuris nustato lyginamuose profiliuose esančių juostų proporciją (Jaccard, 1908);

3) apskaičiuojant Dice (1945) arba Nei ir Li koeficientą NL (angl. *Nei and Li coefficient*), kuris parodo produkto, amplifikuoto viename pavyzdyje, amplifikacijos tikimybę kitame pavyzdyje (Nei, Li, 1979).

SMC, J ir NL koeficientai remiasi skirtingomis prielaidomis. SMC atveju skaičiuojami visi bendri (sutampantys) žymenys (1 ir 0), neatsižvelgiant į priežastis, dėl kurių išnyko ta ar kita juosta. NL apskaičiavimas jau turi tam tikrą biologinį pagrindą (kilmė iš to paties protėvio gali nulemti bendrų juostų skaičiaus proporciją), tačiau šiuo atveju aktuali RAPD produktų homologijos problema.

Vertinant RAPD duomenis įvairiais metodais svarbu išsiaiškinti, kaip klaidos, būdingos RAPD, veikia skirtingus panašumo koeficientus. RAPD klaidos yra dviejų tipų:

- 1) klaidingas teigiamas alelis (produktas yra, nors jo neturėtų būti);
- 2) klaidingas neigiamas alelis (produkto nėra, nors turėtų būti).

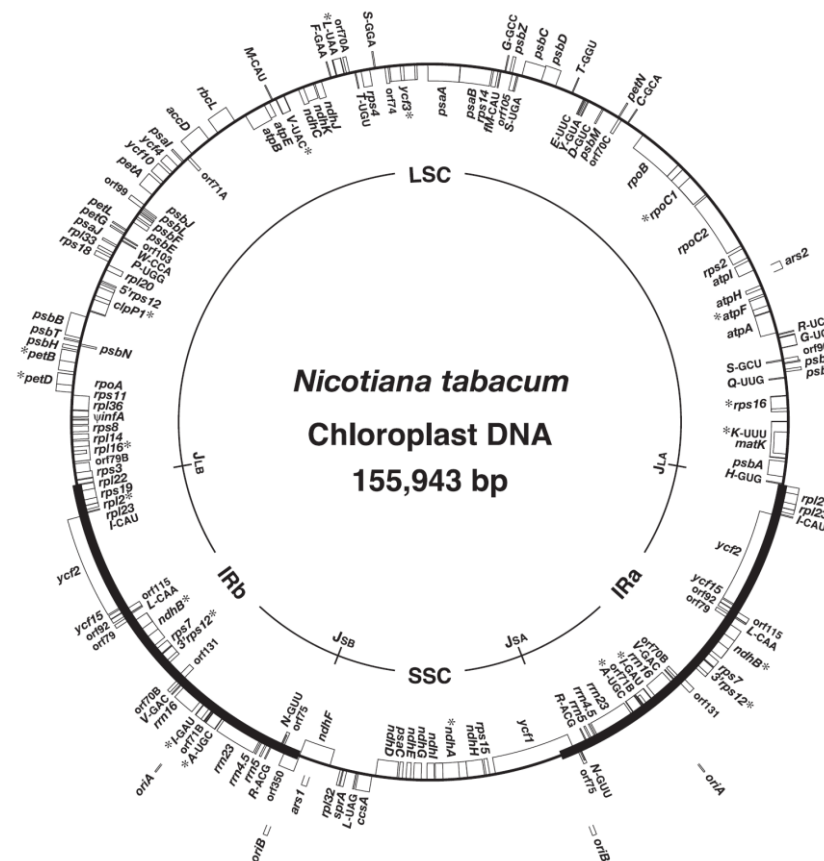
Teigiami aleliai nustatomi klaidingai, kai nehomologiški DNR fragmentai yra to paties dydžio, o klaidingai neigiami yra tuomet, kai PGR produktai patenka už gelio skiriamosios gebos ribų (Smith et al., 1994). Šių klaidų poveikį SMC, J ir NL skaičiavimams tyrė Lamboy (1994a; 1994b). Jo skaičiavimai rodo, kad NL yra bene tinkamiausias būdas panašumams pagal turimus RAPD duomenis skaičiuoti, nes šis metodas turi biologinę prasmę, vertinamos tik bendros esančios juostos. Matyt, SMC netinkamas negiminingiems taksonams, nes juostų nebuvimą dviejų palyginamų individų RAPD spektruose gali nulemti skirtingos priežastys. Link ir kt. (1995) bei Zeid ir kt. (2003) rekomendavo atsisakyti SMC ir dominuojantiems žymenims naudoti J koeficientą, kodominuojantiems – NL. Tai iš esmės prieštarauja anksčiau pateiktai Lamboy (1994a) nuomonei. Nepaisant teorinių ir praktinių J ir NL koeficientų neatitikimų, yra nemažai publikacijų, kuriose stebima stipri genetinio panašumo koreliacija, apskaičiuota naudojant šiuos koeficientus (Link et al., 1995; Zeid et al., 2003; Patamsytė et al., 2008). Šių koeficientų naudojimą gali sąlygoti ir rūšies biologija (Zeid et al., 2003; Laurentin, 2009).

RAPD klaidos, nesvarbu kokios kilmės jos bebūtų, daro didelį poveikį skaičiuojant genotipų panašumus bei atliekant klasterių analizę (Lamboy, 1994a). Iš metodų, kurie naudojami RAPD pagrindu vykdomai klasterių analizei, geriausiai tinka UPGMA (angl. *Unweighted Pair-Group Methods with Arithmetic Mean*) (Sneath, Sokal, 1973) ir NJ (angl. *Neighbour-joining*) (Saitou, Nei, 1987). Dendrogramų patikimumui vertinti Rieseberg (1996) rekomendavo įkėlų metodą (angl. *bootstrap*), kurį pasiūlė Felsenstein (Felsenstein, 1985).

## **2.2. Chloroplastų DNR nekoduojančių specifinių regionų tyrimas sekoskaitos metodu**

Sausumos augalų chloroplastų genomų sandara labai konservatyvi (Yukawa et al., 2005). Daugelio šių augalų chloroplastų genomai sudaryti iš keturių dalių: dviejų didžiojo invertuoto pasikartojimo (angl. *Inverted Repeats*

– IR) kopijų, atskirtų dviem unikaliais rajonais (2 pav.). Pastarieji sudaryti iš unikalinių genų ir skiriasi savo dydžiu. Dėl šios priežasties jie vadinami mažuoju ir didžiuoju vienkopijiniu rajonu (angl. *Small Single Copy region, SSC*; *Large Single Copy region, LSC*). Pagal cpDNR sekų atliekamą funkciją chloroplastų genomą galima suskirstyti į baltymus koduojančius genus, intronus ir tarpgeninius tarpikius (Shaw et al., 2007).



**2 pav.** *Nicotiana tabacum* cpDNR genolapis (Yukawa et al., 2005). Genai, pavaizduoti vidinėje žiedo pusėje, iššifruoti pagal laikrodžio rodyklę, o išorinėje – prieš laikrodžio rodyklę. tRNR genai pavaizduoti viena amino rūgšties kodono raide kartu su antikodonu. Žvaigždutėmis pažymėti pertrauktos sandaros genai

Sausumos augalų chloroplastų genomuose yra apie 110-130 skirtingų genų. Dauguma šių genų koduoja baltymus (apie 80), kurie svarbūs fotosintezai ir genų raiškai. Likusieji koduoja tRNR (maždaug 30 genų) ir rRNR (4 genai). Dėl prokariotinės chloroplastų kilmės daugelis jų genų sudaro operonus. Nors cpDNR sandara ir genų skaičius yra konservatyvūs, tačiau gali vykti įvairūs pokyčiai: genų ir jų intronų iškritos, inversijos, invertuotų



pasikartojančių sekų mutacijos ir kt. Intronai ir tarpgeniniai tarpikliai nekoduoja baltymų ir vadinami nekoduojančiais regionais. Remiantis *Nicotiana* chloroplastų genolapiu (Wakasugi et al., 1998) nustatyta, kad apie 43% LSC ir SSC rajonų yra nekoduojantys. Penkiolika intronų sudaro apie 10,6% vienkopijinės cpDNR, o 92 tarpgeniniai tarpikliai – 32,3% (Shaw et al., 2007)

Chloroplastų genomo sekoskaita plačiai naudojama komplikuotiems filogenetiniams ryšiams išaiškinti (Shaw et al., 2005; 2007; Theis et al., 2008). Chloroplastų genome mažas struktūrinių pokyčių dažnis, jiems būdingas konservatyvus nukleotidų pakaitų greitis (Zurawski et al., 1984). Be to, cpDNR sudaro gana žymią augalų genomo dalį ir ją nesunku išskirti. Vertinant cpDNR pagal nukleotidų sekas labai svarbu ir tai, kad aukštesniųjų augalų chloroplastų genomai yra homologiški. Pirmuosius šio pobūdžio darbus apsunkino būtinybė klonuoti nuskaitomus genus, nes nebuvo universalių pradmenų, o brangios sekoskaitos nustatymo reakcijos buvo atliekamos rankomis. PGR ir kitų metodų pritaikymas, automatinė naujos kartos sekoskaita sukūrė prielaidas sekvenuoti daug daugiau taksonų ir ištirti chloroplastų įvairių sekų tinkamumą filogenetiniams tyrimams (Raubeson, Jansen, 2005). Daugeliu atžvilgių cpDNR evoliucija atspindi branduolio genų evoliuciją, bet chloroplastų baltymus koduojantys genai evoliucionuoja apie penkis kartus lėčiau (Wolfe et al., 1987; 1989). Tai bandoma paaiškinti jų savita replikacijos sistema. Viena iš evoliucijos ypatybių – transpozonų aktyvumo nebuvimas. Dėl uniparentalinio (dažniausiai) paveldėjimo pobūdžio cpDNR evoliucijai nesvarbus ir rekombinacijos procesas. Vis tik cpDNR nukleotidų pakaitų dažnis yra didesnis nei mitochondrijų genome (Wolfe et al., 1987). Pakaitų dažnis mažesnis IR sekose, kuriose jis maždaug lygus mutacijų dažniui mitochondrijų unikaliuose genuose (Gaut, 1998). Nėra vienareikšmių rezultatų apie nukleotidų mutacijų dažnį koduojančiuose ir nekoduojančiuose cpDNR regionuose. Pavyzdžiui, Kelchner (2000) duomenimis, nukleotidų pakaitų greitis koduojančiuose cpDNR rajonuose yra daug mažesnis nei nekoduojančiuose. Tuo tarpu Manen ir Natali (1995) atlikti tyrimai rodo, kad

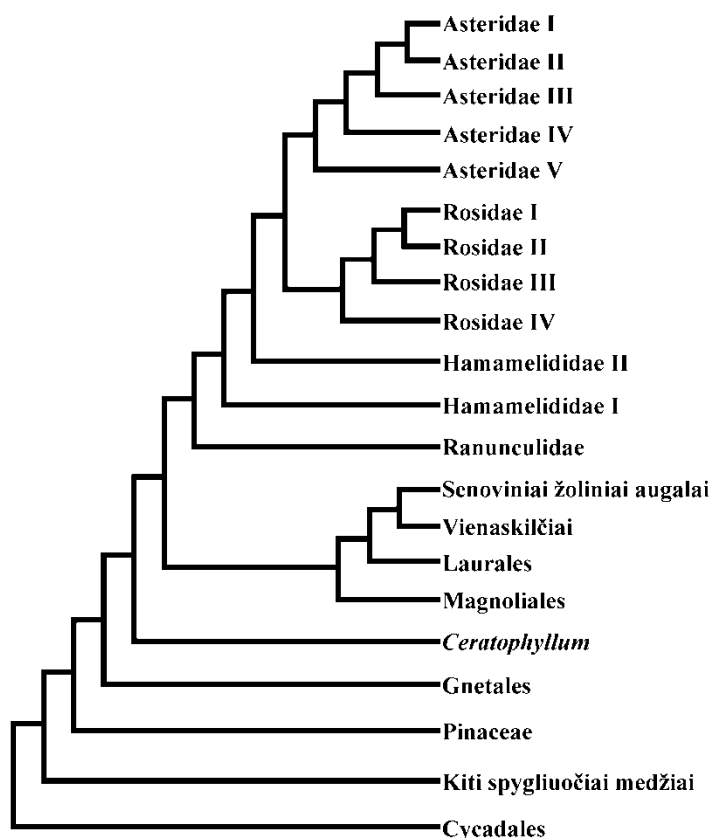
kai kurie nekoduojantys cpDNR rajonai evoliucionuoja lėčiau nei koduojantys. Manoma, kad tokį neatitikimą gali nulemti cpDNR kilmė. Pavyzdžiui, varpinių augalų nekoduojančios cpDNR nukleotidų pakaitų dažnis didesnis nei tabako ar pušies (Muse, Gaut, 1997; Matsuoka et al., 2002). Dažniau pokyčiai aptinkami genuose, kurių transkriptai yra redaguojami (Shields, Wolfe, 1997; Bock, Hagemann, 2000).

Jeigu filogenetiniuose tyrimuose yra lyginamos sekos, kuriose per mažai pakaitų, gaunami medžiai neišsiskyrusiomis (angl. *unresolved*) šakomis. Per didelis kintamumas gali lemti per didelį homoplazijos lygį ir neteisingą giminingumo nustatymą (Manhart, 1994). Be to, per didelis sekų kintamumas apsunkina jų sugretinimą.

Paskelbta daug straipsnių, kuriuose aprašomas cpDNR sekų panaudojimas filogenetikoje (Raubeson, Jansen, 2005; Bell, 2004; Smith, 2009; Moore et al., 2010; Jacobs et al., 2010). Vienas ankstyvesnių reikšmingų tyrimų buvo sėklinių augalų 499 rūšių cpDNR *rbcL* genų sekų analizė (Chase et al., 1993). Šį tyrimą atliko net 42 mokslininkai. Gautas filogenetinis medis pasižymėjo aiškia šakų struktūra (3 pav.). Šio medžio teisingumą patvirtinto ir vėlesni tyrimai (Soltis, Soltis, 2000).

Įdiegus į cpDNR tyrimus automatinę sekoskaitą, chloroplastų genų tyrimai labai išsiplėtė. Dažniausiai sekvenuojami šie genai – *rbcL*, *atpB*, *matK*, *ndhF* (Raubeson, Jansen, 2005). *atpB* ir *rbcL* genų nukleotidų sekos labai konservatyvios, todėl šie genai gali būti naudojami aiškinantis filogenetinius ryšius tarp stambių augalų taksonominių grupių. *matK*, *ndhF* genai pasižymi 2-4 kartus didesniu pokyčių skaičiumi, dėl to jie gali būti naudojami analizuojant mažiau divergavusių taksonų genetinius ryšius.

cpDNR nekoduojančios sekos yra svarbus molekulinės sistematikos duomenų šaltinis. Jų naudojimas augalų filogenetikoje prasidėjo XX a. paskutiniame dešimtmetyje (Taberlet et al., 1991; Morton, Clegg, 1993). Tuo metu jau buvo nustatyti trijų augalų rūšių (*Marchantia polymorpha*, *Nicotiana tabacum* ir *Oryza sativa*) chloroplastų genomai, kurių sekoskaitos duomenys ir buvo panaudoti filogenetiniuose tyrimuose.



**3 pav.** Sėklinių augalų 499 rūšių filogenetinės dendrogramos, sukonstruotos remiantis *rbcL* geno sekoskaita, pagrindinės šakos (Chase et al., 1993)

Daugelis filogenetinių tyrimų atliekami tiriant vienakopijinius rajonus, nes invertuoti pasikartojantys cpDNR rajonai evoliucionuoja lėčiau už vienakopijinius rajonus (Perry, Wolfe, 2002). Be to, vienos iš pirmųjų išanalizuotų sričių (pvz., *rbcL*, *atpB*, *trnL-trnF*) buvo lokalizuotos LSC rajone (Shaw et al., 2007).

### **2.3. *Lonicera L.* genties filogenetikos molekuliniai tyrimai**

Per pastaruosius dvidešimt metų atlikti filogenetiniai tyrimai, panaudojant molekulinis ir morfologinius duomenis, labai papildė mūsų supratimą apie *Caprifolieae* tribos, kuriai priklauso ir *Lonicera L.*, filogeniją. Šios didelės rūšių grupės išskyrimas iš kitų pagrįstas tiek morfologinių tyrimų (Judd et al.,

1994), tiek ir DNR sekų analizės (Donoghue et al., 2003) rezultatais. Iš *Caprifolieae* tribos keturių genčių, *Lonicera* L. genties tyrimai vyko intensyviausiai. 1903 m. Rehder išskyrė šioje gentyje dvi pogentes: *Chamaecerasus* (= *Lonicera*) ir *Perichymentum* (= *Caprifolium*) (Rehder, 1903). Šiuo metu viena iš labiausiai nagrinėjamų temų – *Lonicera* L. genties monofiletiškumas. Theis ir kt. *Caprifolieae* ir *Lonicera* filogenetiką tyrė pasitelkdami branduolio (ribosominės DNR *ITS* regiono) ir cpDNR penkių nekoduojančių regionų (*rpoB-trnC*, *atpB-rbcL*, *trnS-trnG*, *petN-psbM* ir *psbM-trnD* tarpiklių) sekoskaitos duomenis (Theis et al. 2008). Šiame darbe buvo nustatyta, kad pagrindinis skilimas *Lonicera* L. gentyje yra tarp *Lonicera* ir *Caprifolium* pogenčių rūšių. Tai patvirtina ir anksčiau minėtą Rehder idėją. Sekcijos *Coeloxylosteum*, *Isoxylosteum* ir *Nintooa* grupuojasi *Lonicera* pogentėje tarp parafiletinės *Isika* sekcijos rūšių. *Nintooa* sekcija taip pat gali būti ne monofiletinė. Šis tyrimas atskleidė ir kai kurių morfologinių požymių (pvz., tuščiaavidurio stiebo) homoplaziją *Caprifolium* pogentėje ir *Lonicera* pogentės *Coeloxylosteum* sekcijoje. *Lonicera* ir kitų *Caprifolieae* genčių monofiletiškumą patvirtino Smith (Smith, 2009) tyrimas, kuriame taip pat buvo naudojami *ITS* ir cpDNR nekoduojančių regionų sekoskaitos duomenys (1 pav.). Tačiau, šis tyrimas, kaip ir ankstesnis, nesumažino įvairių neaiškumų *Lonicera* genties viduje.

### **3. Šiuolaikiniai bioinformatikos metodai filogenetikoje**

Pagrindiniai filogenetiniai tyrimo metodai yra skirti gyviems organizmams klasifikuoti. Skirtingai nei tradicinė klasifikacija, kurią pasiūlė Karlas Linėjus, sugrupavęs skirtingas rūšis pagal morfologinius požymius, šiuolaikinė sistematika vis dažniau remiasi molekulinės filogenetikos tyrimų rezultatais. Naudojant šiuolaikinius bioinformatikos metodus, palyginamos skirtingų grupių organizmų nukleorūgščių ir/ar baltymų sekos (Shui, 2008). Šios giminingų organizmų grupių makromolekulės yra labai panašios, o sistematiniu požiūriu nutolusių organizmų grupių akivaizdžiai skiriasi.

Molekulinė filogenetika remiasi makromolekulių skirtumais (polimorfizmu), o tyrimų metodai parenkami tokie, kuriuos naudojant iš gautų duomenų būtų galima sudaryti giminingumo dendrogramas, palyginti ir klasifikuoti norimus organizmus (Baxevanis, Ouellette, 2004). Be to, duomenys, gauti remiantis šiuolaikinės filogenetikos principais, yra naudojami išaiškinant naujų genų funkcijas, nustatant genų vietą giminingų organizmų chromosomose bei juos klonuojant (Peng et al., 1999; Brown, 2006).

### **3.1. Duomenų apdorojimas molekuliniėje filogenetikoje**

Naudojant duomenis, gautus tyrimo metu, svarbu, kad jie būtų tinkami filogenetinei analizei, būtų homologiniai ir turėtų bendrus evoliucinius ryšius. Filogenetinė analizė susideda iš keturių etapų:

- 1) sekų išlyginimo ar kitų duomenų suvienodinimo;
- 2) algoritmo parinkimo;
- 3) filogenetinės dendrogramos sudarymo;
- 4) filogenetinės dendrogramos įvertinimo (Baxevanis, Ouellette, 2004).

Kiekvienas iš šių etapų yra svarbus ir turi būti teisingai įvykdytas, nes nuo to priklausys gautos dendrogramos galutinis vertinimas.

Pirmiausia reikia atitinkamai apdoroti gautus duomenis. Pavyzdžiui, RAPD duomenis reikia suvesti į binarinę matricą, pateikti tinkamu algoritmu bioinformacinei programai apdoroti. Sekoskaitos duomenys tvarkomi apkarpančias sekas, suvienodinant jų galus pagal naudotus pradmenis, o esant daugybiniam sekų palyginimui, jas būtina išlyginti norint įvertinti analizuojamose sekose esančius nukleotidų vietų skirtumus. Norint ieškoti panašių pagal gautus duomenis nukleotidų sekų, kurias būtų galima įtraukti į filogenetinę analizę, galima pasinaudoti duomenų bazėmis, pvz., NCBI, EMBL-EBI ir kt. Esant galimybei ir turint ilgas koduojančias sekas, geriausia būtų atlikti baltymų analizę. Baltymų aminorūgščių sekos yra konservatyvesnės, leidžia palyginti labiau nutolusias organizmų grupes.

### 3.2. Filogenetinių dendrogramų sudarymas ir principai

Filogenetinė dendrograma (medis) – tai struktūra, kuri vaizduoja evoliucinius ryšius tarp genų, organizmų ar taksonominių grupių. Dendrogramoje, sudarytoje iš gautų duomenų, galima matyti, kurie genai ar organizmai yra giminingiausi. Tyrimo objektai, t.y. individualūs pavyzdžiai, kurie pavaizduoti dendrogramoje, yra vadinami operaciniais taksonominiais vienetais – OTV (angl. OTU – *Operational Taxonomic Units*) (Lemey et al., 2009). OTV vaizduojami dendrogramoje kaip išorinės filogenetinio medžio atšakos, o vidinės atšakos vertinamos kaip hipotetiniai taksonominiai vienetai (HTV), pažymint, kad jie yra OTV pirmtakai. Bendrą kilmę turinti ir tai pačiai šakai priklausanti taksonų grupė vadinama monofiletine grupe. Šakojimosi tvarka filogenetiniame medyje yra vadinama medžio topologija. Norint paversti filogenetinę diagramą evoliuciniu medžiu, reikia nustatyti, kurie pokyčiai įvyko anksčiau, o kurie vėliau. Kai nurodoma kryptis visiems pokyčiams, sakoma, kad medis turi šaknį. Toks medis turi kryptį ir unikalų mazgą, kuris atitinka bendrą protėvį. Bešaknis medis iliustruoja tik medžio šakų panašumą, tačiau nedaro jokių prielaidų apie bendrus protėvius. Filogenijoje pokyčių kryptis nustatoma pridendant nepriklausantį grupei OTV. Daugeliu atvejų yra naudojami keli nepriklausantys grupei OTV, tai leidžia gauti tikslesnius duomenis. Pasirenkant nepriklausantį grupei OTV reikia užtikrinti, kad jis būtų artimas analizuojamiems pavyzdžiams, bet tuo pačiu skirtusi nuo kitų analizuojamų grupės narių. Filogenetinio medžio šaknis yra ten, kur nepriklausantis grupei OTV prisijungia prie medžio. Tik turint filogenetinį medį su šaknimi galima pasakyti, kurios grupės yra monofiletinės kilmės (Judd et al., 2007).

Filogenetinės dendrogramos sudarymas, naudojant molekulinis duomenis, nėra paprastas. Daugeliu atvejų netgi nėra įmanoma patvirtinti tai, kad rekonstrukcija yra tikroji išvada. Kai sekos išlyginamos, parenkamas algoritmas dendrogramai sudaryti. Kadangi dar nesukurtas universalus metodas, tinkantis visiems atvejams, tai siekiant optimizuoti tyrimus, buvo

sukurti filogenetinių dendrogramų sudarymo dauginiai algoritmai. Šie metodai gali būti grupuojami keliais būdais priklausomai nuo to, ar jie naudoja diskrečias požymių būsenas, ar atstumų, gautų palyginus skirtumus poromis, matricą. Pastarieji metodai pasižymi mažesne kompiuterine apkrova, tačiau juos naudojant prarandama pradinė informacija apie taksonų požymius, todėl neįmanoma rekonstruoti protėvinių taksonų požymių būsenų. Filogenetinių medžių sudarymo metodai gali būti klasifikuojami ir pagal tai, ar OTV yra grupuojami palaipsniui (žingsniais), ar yra patikrinami visi teoriškai įmanomi medžiai (nuodugnus tyrimas). Grupuojant palaipsniui, ištiriami daliniai medžiai ir sudaromas tik vienas geriausias medis. Pirmiausia šio tipo metodais surandami du giminingiausi OTV ir jie sugrupuojami. Tuomet ši grupė jau laikoma vienu OTV. Vėliau duomenys sumažinami vienu įrašu ir, kartojant procedūrą, programa sudaro filogenetinį medį. Palaipsniai grupavimo metodai yra greiti ir dažniausiai jais galima apdoroti didelius duomenų kiekius, tačiau šiuo atveju netaikomi patikimumo nustatymo metodai. Dažniausiai naudojamas palaipsnis grupavimo metodas yra kaimynų grupavimo metodas (Salemi, Vandamme, 2003).

Nuodugnaus tyrimo metodais patikrinami visi galimi filogenetiniai medžiai. Šio tipo metodai turi vieną ypač svarbų privalumą – jie sudaro daugybę skirtingų filogenetinių medžių ir įvertina tikrosios filogenijos tikimybę. Pagrindinis šių metodų trūkumas – didelis galimų medžių skaičius ir kartu skaičiavimo laiko eksponentinis pailgėjimas tuomet, kai padidinamas taksonų skaičius. Tai reiškia, kad daugiau nei dešimčiai OTV įmanoma patikrinti tik dalį galimų medžių. Labiausiai tikėtinam medžiui sudaryti yra naudojami įvairūs metodai, tačiau nėra algoritmo, kuris garantuotų, jog buvo patikrintas geriausias galimas medis. Dėl to rekomenduojama keletas skirtingų grupavimo metodų filogenetiniams ryšiams nustatyti. Filogenetinėms dendrogramoms sudaryti dažniausiai naudojami šie metodai: didžiausio tikėtimumo – ML (angl. *Maximum Likelihood*), kaimynų grupavimo (angl. *Neighbour-joining* – NJ), mažiausios evoliucijos – ME (angl. *Minimum Evolution*), neapkrautų porų grupavimo metodas su aritmetiniu vidurkiu

UPGMA (angl. *Unweighted Pair-Group Methods with Arithmetic Mean*), didžiausio taupumo – MP (angl. *Maximum Parsimony*). Atliekant duomenų analizę penkiais minėtais metodais, kartu naudojami ir pagalbiniai algoritmai (1 lentelė), kurie taikomi vertinant nukleotidų sekas (Nei, Kumar, 2000; Tamura et al., 2007).

**1 lentelė.** Modeliai ir metodai naudojami filogenetinių medžių sudarymui

Pagalbiniai modeliai	Metodas				
	ML	NJ	ME	UPGMA	MP
Tamura-Nei (Tamura, Nei, 1993)	+	+	+	+	
Jukes-Cantor (Jukes, Cantor, 1969)	+	+	+	+	
Kimura 2-parametras (Kimura, 1980)	+	+	+	+	
Tamura 3- parametras (Tamura, 1992)	+	+	+	+	
Hasegawa-Kishino-Yano (Hasegawa et al., 1985)	+				
ML kompozicinis (Tamura et al., 2004)		+	+	+	
Tajima-Nei (Tajima, 1989)		+	+	+	
p-atstumo		+	+	+	

Iš pirmoje lentelėje pateiktų duomenų matyti, kad ne visus modelius ir algoritmus galima naudoti. Pagalbiniai modeliai dažniausiai taikomi galimiems filogenetiniams medžiams iš visų gautų atrinkti ir nukleotidų sekoms iš sudarytos matricos paimti.

- 1920 m. R. A. Fisher'is sukūrė didžiausio tikėtinumo (**ML**) metodo principinį algoritmą, kurio esmė – visų galimų medžių sukūrimas ir labiausiai tikėtino medžio statistinė analizė (Fisher, 1920; Aldrich, 1997; Lemey et al., 2009). Šis metodas tinka mažam nukleotidų sekų skaičiui, tačiau kai sekų daug, tai sukurtų medžių skaičius būna toks didelis, jog tikėtinam medžių poaibiui atrinkti būtini specialūs pagalbiniai algoritmai. Didžiausio tikėtinumo metodas yra paremtas pokyčio nuo vienos požymio būsenos iki kitos tikimybių skaičiavimu, kuris parodo galimybę, kad pateikta šakojimosi diagrama veda prie tam tikro stebimo duomenų rinkinio ieškant labiausiai tikėtino filogenetinio medžio.
- 1987 m. Saitou ir Nei sukūrė, o 1988 m. Studier ir Kepper modifikavo kaimynų grupavimo metodą (**NJ**), kurio esmė – genetinių atstumų, kaip klasterizavimo algoritmų, panaudojimas bešakniam medžiui sukurti. Šiuo metodu, palaipsniui surandant kaimynines (giminingas) poras,



konstruojamas medis su sumažėjusiu vidinių šakų, o tuo pačiu ir viso medžio ilgiu, bet nesugrupuojami giminiškiausi OTV. Nepaisant to, kad NJ metodas yra vienas iš atstumų matricos metodų, teigiama, kad kriterijais paremtas metodas yra pranašesnis (Lemey et al., 2009).

- Mažiausios evoliucijos metodą (**ME**) kūrė keletas autorių (Kidd, Sgaramella-Zonta, 1971; Rzhetsky, Nei, 1993). Šio metodo principas – surasti medžio topologiją, kuri paaiškintų gautus duomenis mažiausiu pokyčių skaičiumi. Pokyčių skaičiaus analizė atliekama dviem etapais. Pirmiausia, nustatomas požymio būsenų skaičius arba medžio ilgis, reikalingas bet kokiam duotam medžiui. Antrasis etapas apima visų galimų medžių topologijos paiešką, siekiant surasti medį, kuris būtų trumpesnis. Pirmasis etapas yra paprastas ir trumpas, kai tuo tarpu antrasis – lėtai skaičiuojamas dėl labai didelio galimų medžių topologijų skaičiaus, kai tiriama daugiau nei keletas OTV (Nei, Kumar, 2000).
- **UPGMA** metodu sukuriamas šakninis medis, laikantis prielaidos, kad stebimas pokyčių tempas yra pastovus, t.y., kad atstumai nuo šaknies iki kiekvienos šakos yra vienodi, o sekose esantys nukleotidų ar aminorūgščių pakitimai evoliucijos požiūriu tokie patys visiems OTV (Sneath, Sokal, 1973). Tai dažniausiai netinkamas algoritmas filogenetinių medžių konstravimui, nes mažai tikėtina, kad skirtingų taksonų evoliucijos greitis būtų visiškai vienodas. Taikant šį metodą, naudojamas nuoseklus grupavimo algoritmas, kuriuo pirmiausia ieškoma didžiausios homologijos tarp dviejų OTV. Du sugrupuoti OTV laikomi vienu nauju OTV sekančiam grupavimui. Tokiu būdu grupuojami visi OTV pavyzdžiai tol, kol sugrupuojami labiausiai panašūs, šiuos jungiant į klasterius, prie kurių prijungiami mažiau panašūs OTV. Manoma, kad du arčiausiai sugrupuoti OTV ir yra labiausiai giminingi. Nežiūrint to, kad paskutiniuosius dvidešimt metų šis metodas buvo plačiai naudojamas, dabar daugelis autorių jo nerekomenduoja galutiniams filogenetiniams rezultatams vertinti (Sourdis, Krimbas, 1987; Huelsenbeck, Hillis, 1993). Remiantis eksperimentų rezultatais, gautais naudojant UPGMA metodą, įrodyta, kad

šis metodas labai jautrus nevienodo kitimo sritis turintiems pavyzdžiams. Vis dėlto šis metodas turi papildomų optimizavimo algoritmų, kurie padeda pašalinti šio metodo trūkumus (Lemey et al., 2009).

- Didžiausio taupumo metodu (**MP**) nustatomas trumpiausias hipotetinis pokyčių kelias, kuris yra laikomas pranašiausiu evoliucijos keliu, galinčiu paaiškinti esamą fenotipą (Nei, Kumar, 2000). Naudojamas algoritmas, kurio pagrindu sukuriama toks filogenetinis medis, kuriam reikia mažiausiai evoliucinių įvykių, norint paaiškinti gautus duomenis (Eck, Dayhoff, 1966; Fitch, 1971). Šiuo metodu siekiama naudoti minimalų evoliucinių laiptelių skaičių. Individų atsiskyrimo tvarka (medžio topologija) optimizuojama tokiu būdu, kad būtų maksimaliai sumažintas šakų ilgis, t.y. evoliucinių virsmų bendras kiekis medyje. Pavyzdžiui, jei žinoma, kad tam tikros aminorūgštys arba nukleotidai linkę mutuoti, tai daroma prielaida, kad pagrindinis evoliucijos šaltinis yra nukleotidų sekos, galinčios turėti įtakos genų ir baltymų pakitimui. Tokiu būdu galima nustatyti maksimalų genetinį panašumą su bendrais protėviais, suformuluoti geriausią filogenetinę hipotezę remiantis turima seka.

Konstruojant filogenetinius medžius biomolekulių pagrindu, svarbiausia problema – sudaryti aminorūgščių ar nukleotidų sekų dauginį sugretinimą tarp sekų. Turint sekų palyginimo rezultatus galima sukonstruoti filogenetinį medį. Tačiau kai kuriuose metoduose, pavyzdžiui, MP ir ML, dauginio sugretinimo nereikia atlikti. Pagrindinė problema – sekų homologijos įvertinimas. Turint tuos pačius sekų išlyginimo rezultatus, galima sukonstruoti skirtingas dendrogramas, be to, esant iškritoms/intarpams, negalima nustatyti, kur yra intarpas, o kur iškrita. Remiantis biomolekulių dauginiais sugretinimais, atstumų matricų metodais NJ ir UPGMA apskaičiuojamas genetinis atstumas tarp tiriamų OTV. Šiuos metodus lengva realizuoti, nes jie nenaudoja jokio specialaus evoliucijos modelio. Iš turimų duomenų konstruojama atstumų matrica, iš jos – filogenetinė dendrograma. Pagrindinis trūkumas – negalima

įvertinti esamos informacijos apie didelio kintamumo sekų sritis. ML, ME ir MP metodai grindžiami aiškiais evoliucijos modeliais (Павлинов, 2005).

### **3.3. Filogenetinių medžių patikimumo analizė**

Gautų filogenetinių medžių patikimumui įvertinti dažnai naudojamas Efron sukurtas bei vėliau patikslintas (Efron, 1979; Efron, Gong, 1983) įkėlų metodas (angl. *bootstrap analysis*). Šią patikimumo analizę pirmą kartą panaudojo Felsenstein (1985), įvertindamas filogenetinius ryšius, pagrįstus sekoskaitos duomenimis bei tikrindamas, kiek gauti duomenys sutampa su sukurtu modeliu (Lemey et al., 2009).

Įkėlų analizė susideda iš dviejų etapų, kurie jungia pradinių duomenų (viso filogenetinio medžio) ir atskirų jų poabių dauginius palyginimus. Po šių palyginimų nustatoma dažniausiai pasikartojančių analizės rezultatų proporcija (Baxevanis, Ouellette, 2004). Gautas įkėlų skaičius ar procentinė jų išraiška vertinama kaip patikimumo standartas. Filogenetinių medžių sudarymo patikimumo principas pagrįstas analizuojamos matricos duomenimis. Dalis imties duomenų yra pašalinami ir pakeičiami atsitiktinai sukurtais ekvivalentiškais duomenimis. Gauta pseudoseka analizuojama norint nustatyti, ar siūlomas evoliucinis modelis vis dar tinkamas. Imties pakeitimas sumaišo duomenis, bet jei yra aiškus ryšys tarp dviejų sekų, toks sumaišymas jo nepanaikina. Iš kitos pusės, jei dvi sekas jungiantis ryšys buvo klaidingas, sumaišymo metu jis gali pranykti, nes minėtas procesas keičia atskirų vietų dažnius. Iš gautų naujai suformuotų sekų tokiu būdu sudaromas filogenetinis medis ir įvertinama originalių atsišakojimų bei grupių proporcija (Van de Peer, 2003). Šiuo metodu galima įvertinti visų filogenetinių medžių sudarymo patikimumą. Dažniausiai rekomenduojama taikyti 200-2000 įkėlų iteracijas (Hedges, 1992; Zharkikh, Li, 1992). Dideliu patikimumu laikomas toks, kuris didesnis nei 70% arba 75%. Jei šakų patikimumo vertė mažesnė nei 70%, tokį patikimumą reikia vertinti atsargiai, nurodant ir įvertinant galimas to priežastis (nevienodas analizuojamų nt skaičius, didelės iškritų/intarpų vietos) (Van de

Peer et al., 2000; Felsenstein, 2004). Kiti autoriai, vertindami tuos pačius duomenis, gautus skirtingais algoritmais, ir esant skirtingoms patikimumo reikšmėms, siūlo laikyti mažai patikimais tuos, kurių patikimumas mažesnis nei 50% (Hillis, Bull, 1993). Manoma, kad įkėlų analizės patikimumo vertės interpretaciją reikia naudoti tada, kai filogenetinė analizė pakartotinai atliekama įvairiais dendrogramų sudarymo metodais, iš kurių pasirenkamas tinkamiausias konkrečiam eksperimentui įvertinti (Leipe et al., 1994).

### 3.4. Duomenų bazės

Pirmoji nukleotidų sekvenavimo duomenų bazė (GenBank<sup>®</sup>) buvo įkurta 1979 m. Los Almos nacionalinėje laboratorijoje (LANL) JAV. 1980 m. Europoje įkurta nukleorūgščių sekų duomenų bazė EMBL-Bank (angl. *European Molecular Biology Laboratory-Bank*), o 1991 m. Japonijoje buvo įkurtas DNR duomenų bankas DDBJ (angl. *DNA DataBank of Japan*) (Mount, 2004). Vėliau prasidėjo tarptautinis bendradarbiavimas (INSDC, angl. *International Nucleotide Sequence Database Collaboration*) ir sujungus šias duomenų bases buvo įkurtas Nacionalinis biotechnologijos informacijos centras NCBI (angl. *National Center for Biotechnology Information*), kurio skelbiamomis duomenų bazėmis galima naudotis tiesiogiai (<http://ncbi.nlm.nih.gov>).

Šiuo metu yra šie pagrindiniai duomenų bazių centrai – Nacionalinis genetikos institutas Japonijoje NIG/CIB (angl. *the National Institute of Genetics/Center for Information Biology*) ir Europos bioinformatikos institutas Jungtinėje Karalystėje EBI (angl. *the European Bioinformatics Institute*), kurie kartu su EMBL ir NCBI renka tiesioginius duomenis apie sekas ir skirsto juos taip, kad kiekvienas iš šių centrų turi visas sekų kopijas (Lemey et al., 2009). Taigi, kiekvieną naują sekos įrašą valdo tos duomenų bazės, kuriose jis buvo sukurtas ir atnaujintas. Sekos įrašo atnaujinimas visose duomenų bazėse yra įvykdomas per 24 val. Toks informacijos prieinamumas įgalina palyginti skirtingų mokslininkų gautus tyrimų rezultatus ir papildyti esamą informaciją.

Be šių duomenų bazių yra ir specializuotos duomenų bazės, kuriose kaupiama informacija, skirta tik vienai makromolekulių ar sekų informacijai apdoroti (Salemi, Vandamme, 2003).

Patogiausia gautą pradinę sekoskaitos informaciją patikrinti NCBI duomenų bazėje, nes didžiausias šios bazės privalumas – integralumas, kai vienoje vietoje pateikiama pagrindinė informacija apie sekas, autorius, publikacijas, fizinius ir biocheminius parametrus, nurodant informaciją apie nukleotidų ar aminorūgščių sekas, jų ryšį su kitose duomenų bazėse esančia informacija (Mizrachi, 2007). Norint surasti sekas ir jas analizuoti tokiose didelėse duomenų bazėse, būtina naudoti bioinformatikos programas, kurios padėtų objektyviai įvertinti gaunamą informaciją.

Naujų duomenų talpinimas į NCBI duomenų bazę yra skirstomas pagal pateikiamos informacijos pobūdį, t.y., kokia seka yra talpinama ir kokių tikslų ją norima užregistruoti.

Tyrimo metu gautos *Lonicera* L. genties augalų pavyzdžių unikalios SCAR sekos buvo užregistruotos GSS (angl. *Genome Survey Sequences*) duomenų bazėje, kurioje yra registruojamos trumpos, vientisos, funkciškai neidentifikuotos sekos iš GenBank® duomenų bazės, įskaitant atsitiktinių tyrimų metu gautas sekas.

Savo darbo metu gautų cpDNR sekų palyginimui su NCBI duomenų bazėje esančiomis sekomis naudojome pagrindinį lokalų išlyginamosios paieškos įrankį BLAST (angl. *Basic Local Alignment Search Tool*), kuris sukurtas dirbtinio intelekto pagrindu (Madden, 2003). Sekų paieškai ir palyginimui buvo panaudotas euristinis paieškos algoritmas. BLAST paieškos įrankis atlieka lokalų palyginimą, kurio metu visapusiškai įvertinama sekoje esanti informacija. Mūsų darbe buvo naudojamos ir specializuotos BLAST programos užklausos: MEGABLAST (nežinomų sekų paieška tiksliam palyginimui, į kurį neįtraukiamos mažiau panašios sekos) ir BLASTN (nukleotidų sekoms palyginti) (Altschul et al., 1990; 1997), pasirenkant standartinius paieškos palyginimo algoritmus pagal Karlin ir Altschul (1990) metodiką.

### 3.5. DNR sekų palyginimas

Remiantis tyrimų metu gautų DNR sekų ar jų fragmentų palyginimu, galima nustatyti nukleotidų nesutapimus ir analizuoti jų panašumus. Pagal palyginimo rezultatus galima nustatyti struktūrinius, funkcinis ir evoliucinius ryšius tarp sekų. Pagrindinis sekų lyginimo tikslas – nustatyti, kiek sekų turi tokį panašumą, kurio pakanka padaryti išvadą apie jų homologiškumą.

Galima atlikti paprastą sekų palyginimą, kai palyginamos dvi sekos (poros) ir daugybinį – kai palyginama daugiau sekų. Daugybiniam sekų palyginimui naudojami sudėtingi algoritmai, kurių pagalba galima palyginti analizuojamas sekas tarpusavyje, sugretinti genų ar sekų panašumus.

DNR sekų pokyčiai, kurie stebimi palyginant tiriamųjų organizmų DNR sekas su bendro protėvio DNR sekomis, gali atsirasti dėl nukleotidų pakaitų, iškritų, intarpų, taškinių mutacijų. Laikantis prielaidos, kad tiriamosios sekos turėtų būti homologiškos, galima teigti, kad atsiradę sekų (ar jų fragmentų) skirtumai – evoliucinių pokyčių rezultatas. Taksonomiškai artimų rūšių sekos skiriasi viena nuo kitos nežymiai (taškinėmis mutacijomis, iškritomis/intarpais). Dėl to filogenetiniuose tyrimuose dažniausiai palyginamos viena kitos atžvilgiu homologiškos sekų vietos, įvertinamas jų tarpusavio ryšys, padaromos išvados apie bendrą genų ar fragmentų evoliucinį ryšį (Salemi, Vandamme, 2003).

Daugybinis sekų palyginimo principas pagrįstas sekų nukleotidų ar aminorūgščių sugrupavimu stulpeliais, kurie sudaro palyginimo matricą. Pradiniam palyginimui priimtinausias yra stulpelių lyginimas vertikalčiai (2 lentelė, pagal Baxevanis, Ouellette, 2004). Iš antroje lentelėje pateiktų suvestinių duomenų matyti, kad pirmieji trys kriterijai turi aiškią biologinę prasmę, o ketvirtasis – neturi. Tačiau, jeigu sekos yra pakankamai panašios, tai galima naudoti daugybinį sekų palyginimą, kuris ir parodys trijų pirmųjų kriterijų ryšius tarp sekų.

**2 lentelė.** Aminorūgščių ir nukleotidų sekų palyginimo reikšmės ir rezultatų vertinimas

Panašumo kriterijus		Reikšmė palyginimui	Bioinformatikos programos atliekama sekų analizės funkcija
1	Struktūrinis	funkciškai konservatyvios a.r., nustatytos analizuojamose sekose, yra įterpiamos į tą patį stulpelį	atliekama naudojant papildomus algoritmus
2	Evoliucinis	visų sekų a. r. arba nukleotidai, susiję su galimai bendro protėvio ta pačia a. r. ar tuo pačiu nukleotidu, yra įterpiami į tą patį stulpelį	manoma, kad nė viena programa nenaudoja šio kriterijaus tiksliai, bet pateikia geriausią įvertinimo sugretinimą
3	Funkcinis	galimai tą pačią funkciją atliekantys nukleotidai ar a. r. įterpiami į tą patį stulpelį	automatiškai ši funkcija neveikia, todėl, norint įvertinti funkcinį kriterijų, būtina įvesti reikalingą informaciją
4	Sekų	a. r. arba nukleotidai, esantys tame pačiame stulpelyje, yra maksimaliai panašūs	praktiškai visos programos pirmiausia naudoja šį kriterijų, nes jis paprasčiausias ir manoma, kad jei sekos yra artimai susijusios, tai ir jų struktūrinis, funkcinis, evoliucinis kriterijai yra ekvivalentiški sekų panašumui

Jei sekų kilmė bendra ir laikomasi prielaidos, kad praeityje jos buvo identiškos, tai stebimų skirtumų atsiradimą galima paaiškinti iškritos/intarpo susikaupimu evoliucijos metu. Šios sekų sritys palyginimo metu užpildomos tarpais, dėl to iškritos/intarpai nelaikomi sekos pakitimu. Norint surasti tokių daugybinį sekų palyginimą, kurio vertė būtų didžiausia, reikia skaičiuoti kiekvienos palyginamos DNR sekų poros matricos vertę. Vis dėlto, neatmetama galimybė, kad, palyginus su didžiausia matricos verte, palyginys gali būti biologiškai netikslus (Lemey et al., 2009).

**Daugybinio sekų palyginimo algoritmai.** Daugybiniam sekų palyginimui naudojami algoritmai, kurie pirmiausia padeda išlyginti nevienodo ilgio sekas ir nustatyti esamą nukleotidų polimorfizmą visose analizuojamose sekose. Sekų suliginimui buvo sukurta daug skirtingų daugybinio palyginimo algoritmų. Paprasčiausi yra dinaminio programavimo algoritmai (Needleman, Wunsch, 1970; Gotoh, 1982), kurie nustato geriausią palyginį apskaičiuojant vertes visoms galimoms sekų poroms. Tačiau, naudojant šį algoritmą, sunku palyginti didelį kiekį sekų. Kitas daugybinio sekų palyginimo algoritmas pagrįstas progresiniu sekų palyginimu, kai pirmiausia palyginamos visos galimos poros, o vėliau, remiantis panašumais, sukuriamas galutinis rezultatas.

Patogus naudoti ir MUSCLE (angl. *MU*ltiple *Se*quence *Co*mparison *by* *Lo*g-*Ex*pectation) (Edgar, 2004a; 2004b) algoritmas, kuris veikia greitai, naudoja progresinį sekų sulyginimą, geriausiai tinka keliems šimtams sekų sulyginti. Dideliu tikslumu ir galimybe kombinuoti sekas pasižymi T-Coffee programos algoritmas (Notredame et al., 2000), kuriuo gaunami palyginimai yra tikslesni, bet palyginimo laikas žymiai ilgesnis. T-Coffee irgi naudoja progresinį algoritmą, tik ji lygina visos sekos rinkinio segmentus. Daugybiniam sekų palyginimui yra naudojama ir daugelis kitų algoritmų, tačiau jie pasižymi specifiškumu ir skirti konkrečiam tyrimui (Lemey et al., 2009).

Šiuo metu populiariausias yra ClustalW algoritmas (Thompson et al., 1994), kuris naudojamas populiariausiose duomenų bazėse ir yra integruotas į kompiuterines bioinformatikos programas. Šis algoritmas, kaip ir minėtas MUSCLE, sekų sugretinimui naudoja progresinį metodą, t.y., vienu metu lyginamos ne visos sekos, bet naudojantis programa pridedama po vieną seką. Šiuo atveju galutiniam rezultatui gali turėti įtakos tai, kokia eilės tvarka sekos yra įvedamos palyginimui. Naudojant ClustalW algoritmą nukleotidų sekų palyginimui, užtenka standartinių duomenų. Norint koreguoti rezultatus, galima koreguoti pačius duomenis, pvz., EMBL-EBI serveryje naudojant ClustalW algoritmą daugybinių sekų palyginimui.

#### **4. Augalų genetiniai ištekliai, jų tyrimas ir išsaugojimas**

Augalų genetiniai ištekliai (AGI) – tai augalai (arba galinčios reprodukuotis jų dalys), kurie turi potencialią ekonominę, mokslinę ar socialinę reikšmę žmonijai. Į AGI sąrašą patenka laukiniai augalai, kultūriniais augalams giminingi augalai, tradicinės ir/ar senosios augalų veislės, rajonuotos veislės, hibridai arba genetinės linijos. AGI – tai vieni vertingiausių gamtinių išteklių (Rao, Hodgkin, 2002).

AGI glaudžiai susiję su genetinė įvairove, kuri yra sudėtinė bioįvairovės dalis. Biologinę įvairovę galima apibūdinti kaip kintamumą, esantį visų gyvų



organizmų genomuose, rūšyse ir ekosistemose, kuriose jie gyvena (Rao, Hodgkin, 2002). Dėl to išskiriama:

- 1) genetinė įvairovė, kuri pagrįsta paveldimu kintamumu (genų ir genotipų kintamumas);
- 2) rūšių įvairovė (rūšių gausumas);
- 3) ekosistemų įvairovė (rūšių bendrijos tam tikroje aplinkoje).

Genetinio kintamumo visuma populiacijose yra selekcijos ir augalų gerinimo pagrindas, todėl genetinių išteklių išsaugojimas yra svarbus žmonijos gerovei šiandien ir ateityje. Pagrindiniai genetinių išteklių išsaugojimo principai buvo suformuluoti Biologinės Įvairovės Konvencijoje ir JTO Maisto ir žemės ūkio Visuotiniame veiksmų plane. Pagrindinės genetinių išteklių išsaugojimo aktualijos – suprasti ir iširti žmogui prieinamos genetinės įvairovės dydį ir pasiskirstymą augalų rūšyse tam, kad šis turtas būtų išsaugotas ir veiksmingai panaudotas (Rao, Hodgkin, 2002). Augalų genetinė įvairovė kinta laike ir erdvėje. Tai lemia rūšių evoliucija, dauginimosi būdai, ekologiniai ir geografiniai veiksniai, praeityje vykę procesai populiacijose, pavyzdžiui, „butelio kaklelio“ efektas, bei antropogeniniai veiksniai. Geresnis genetinės įvairovės supratimas ir jos pasiskirstymo nustatymas labai svarbus AGI išsaugojimui. AGI išsaugojimo problemų sprendimas padeda nustatyti, ką ir kur reikia saugoti, pagerina saugomos rūšies kilmės, evoliucijos ir taksonomijos supratimą. Tai betarpiškai siejasi su bet kurios rūšies ir jos laukinių giminaičių kolekcijų tyrimais. Tradiciškai tokie genetinės medžiagos ištekliai buvo naudojami selekcijoje gerinant kultūrinių augalų veisles, o dabar jie tapo reikšmingi ir mokslo pažangai apskritai (Harlan, 1975; Johnson, 2008; Sachs, 2009).

Praktiniu aspektu AGI išsaugojimas labai svarbus žemės ūkiui, maisto pramonei (maisto kokybės požiūriu) ir miškininkystei. Genetinės medžiagos gamtosauga susideda iš genetinės įvairovės palaikymo, aprašymo ir įvertinimo rūšies viduje (Laurentin, 2009). Palaikymas arba konservavimas vykdomas dviem būdais – *in situ* ir *ex situ* (Rao, 2004).

Pirmuoju atveju genetiniai išteklių saugomi natūraliose augavietėse (laukiniai augalai) arba tradiciniuose ūkininkų ūkiuose (kultūriniai augalai). *Ex situ* palaikymas vyksta už gamtinės augavietės ribų. Tai gali būti sėklų ir genų bankai, botanikos sodai ir kt. Aprašomas darbas labai svarbus, nes jis nustato kiekvieno pavyzdžio genetinį tapatumą kolekcijoje. Suprantama, kad nuo šio etapo labai priklauso vartotojui pateikiamos informacijos vertė. Tai susiję su pavyzdžio genotipavimu ir genotipo genetinio giminingumo nustatymu. Šis darbas atliekamas dviem būdais: naudojant morfologinius požymius arba molekulinis žymenis. Morfologinių požymių naudojimas turi daug trūkumų, be to, nepakankama šių požymių įvairovė neleidžia tiksliai atskirti pavyzdį nuo kitų tos pačios rūšies individų. Šių požymių (ypač kiekybinių) pasireiškimas labai priklauso nuo aplinkos sąlygų ir raidos stadijos (Rao, 2004; Weising et al., 2005). Biocheminiai žymenis (izofermentai, alozimai, atsarginiai baltymai) taip pat neleidžia nustatyti skirtumų tarp artimai giminingų individų, nes biocheminių žymenų pagalba įvertinama tik labai nedidelė genomo dalis. DNR žymenis neturi daugelio minėtų trūkumų, nes atskleidžia polimorfizmą DNR lygmenyje. Šiuo metu žinoma daugiau kaip keturiasdešimt įvairių DNR žymenų tipų. Kai kurių žymenų savybės pateiktos trečioje lentelėje.

**3 lentelė.** DNR žymenis dažniausiai naudojami augalų genetiniams ištekliams aprašyti ir įvertinti (pagal Ayad et al., 1997; Karp et al., 1997)

Žymenis	Kiekis	Kodomina ntiškumas	Polimorfiz- mas	Specifiškumas lokusui	Naudojamos aparaturės sudėtingumas	Kaina
Izofermentai	<100	+	mažas	+	nesudėtinga	maža
RFLP	neribotas	+	vidutinis	+	sudėtinga	vidutinė
RAPD	neribotas	+	vidutinis	-	nesudėtinga	maža
DAF	neribotas	+	l. didelis	-	nesudėtinga	maža
AP-PCR	neribotas	+	l. didelis	-	nesudėtinga	maža
SSR	neribotas	+	l. didelis	+	nesudėtinga <sup>2</sup>	maža <sup>2</sup>
SCAR	neribotas <sup>1</sup>	+ / -	mažas/vid.	+	vidutinė	maža
CAPS	neribotas <sup>1</sup>	+	mažas/vid	+	vidutinė	maža
ISSR	neribotas	+	didelis	+	vidutinė	vidutinė
AFLP	neribotas	+	didelis	+	vidutinė	vidutinė
Sekoskaita	neribotas	+	didelis	+ / -	sudėtinga	didelė
EST	neribotas	+	mažas/vid.	+	vidutinė	vidutinė
SNP	neribotas	+	l. didelis	+	sudėtinga	didelė

<sup>1</sup> – priklauso nuo jau turimų kitų žymenų

<sup>2</sup> – kai sekos jau nustatytos ir pradmenys sukonstruoti

Norint įvertinti ir atrinkti geriausiai tinkantį metodą, labai dažnai augalų tyrimuose yra naudojami keli metodai kartu. Tai leidžia palyginti gautus rezultatus ir atrinkti geriausią žymenų metodą. Kartu naudojami metodai yra veiksmingesni, pavyzdžiui, leidžia genotipuoti visus turimus individus. Naudojant tik vieną žymenų sistemą, būtų neįmanoma genotipuoti visų individų. Savo tyrimais tai patvirtino ir Regner su bendradarbiais (2001). Autoriai naudojo keturis molekulinį žymenų metodus (AFLP, ISSR, RAPD, SSR), kurių pagalba ištyrė 1200 *Vitis* genotipų. Jie sugebėjo nustatyti daugelio, šiuo metu dar kultivuojamų, vynuogių veislių kilmę, siekiančią viduramžius.

DNR žymenys labai tinka genetinės medžiagos, tinkamos saugojimui *in situ*, atrankai, *ex situ* genų bankų kūrimui, bazinių (angl. *core*) kolekcijų sudarymui ir perteklinių genotipų jose nustatymui (Weising et al., 2005). Genetinės medžiagos kolekcijų saugojimas *ex situ* dažnai labai brangus, ypač kultūrų, kurias būtina dauginti vegetatyviškai. Viena tokių kultūrų – *Ipomoea batatas*. Tarptautinis bulvių centras (CIP) saugo didelę šio augalo kolekciją, kurią sudaro apie 5,5 tūkst. pavyzdžių iš 57 šalių. Morfologinių požymių tyrimai parodė, kad nemaža dalis šios kolekcijos pavyzdžių (apie 1500) yra dublikatai. RAPD analizė parodė, kad morfologiškai skirtingos veislės skyrėsi ir genetiškai (RAPD profiliais), o dalis įtariamų dublikatų iš tikrųjų buvo dublikatai (Zhang et al., 2001).

Garkava-Gustavsson ir kt. (2005), tirdami bruknės (*Vaccinium vitis-idaea* L.) 13 populiacijų iš Švedijos, Suomijos, Norvegijos, Estijos ir Rusijos, palygino tris skirtingas, augalų atrinkimui į bruknių bazinę kolekciją tinkamas, strategijas:

- 1) hierarchinę struktūrą, pagrįstą klasterių metodu;
- 2) *Maximum Genetic Diversity* (MGD) kompiuterinę programą;
- 3) atsitiktinį rinkimą (kaip kontrolę).

Tik MGD įgalino sukurti kolekciją, kurioje buvo išsaugomi genotipai, turintys retas RAPD juostas. Tokio tipo darbuose labai svarbu yra metodo automatizavimas bei galimybė vienu metu tirti didelį skaičių DNR lokusų. Vystantis naujoms technologijoms, atsiranda metodai, kurie leidžia per trumpą

laiką ištirti didelius augalų genomus. Vienas iš tokių naujų metodų yra DArT (angl. *Diversity Array Technology*). DArT yra privati technologija, kuri buvo specialiai sukurta ryžių genomams tirti. Šis metodas pagrįstas DNR hibridizacija, apjungia AFLP ar RFLP metodų tikslumą bei mikrogardelių technologijų pajėgumą. Šiuo metu DArT technologija yra pritaikyta devyniolikai augalų rūšių (Jaccoud et al., 2001; Paux, Sourdille, 2009).

Kaip galima spręsti iš literatūros, pastaruoju metu labai suintensyvėjo AGI tvarkymas naudojant DNR žymenis (Laurentin, 2009). Vis dėlto išlieka aktualus naujų genų panaudojimo programų, kurios galėtų garantuoti efektyvesnę genetinės medžiagos iš įvairių šaltinių pritaikymą kuo įvairesniems tikslams, kūrimas (Namkoong et al., 2004). Šia linkme yra atliekami darbai, kuriais siekiama praplėsti kultūrinių augalų genetinę bazę (Cooper et al., 2001). Netradicinių rūšių ir veislių panaudojimas gali būti vienas iš geninės įvairovės rezervų.

## II. TYRIMŲ OBJEKTAS IR METODAI

### 1. Tyrimų objektas – *Lonicera L.* genties augalai

Tyrimų objektas – *Lonicera L.* genties augalai, augantys Vilniaus universiteto Botanikos sodo sausmedžių kolekcijoje (4 pav.).



4 pav. Vilniaus universiteto Botanikos sodo sausmedžių kolekcija

Sausmedžio pavyzdžių pasirinkimą tyrimams lėmė kolekcijos rūšinė įvairovė, turimų pavyzdžių skaičius ir genotipų aktualumas selekcinio požiūriu.

#### 1.1. VU Botanikos sodo sausmedžių kolekcija

VU Botanikos sode saugoma gana gausi sausmedžio (*Lonicera L.*) genties augalų kolekcija, kurioje yra 40 rūšių, 8 porūšiai, 51 veislė, 35 genetinės linijos (4 lentelė).

Pomologijos skyriaus sausmedžio augalų kolekcija sąlyginai sudaryta iš trijų mažesnių: senojoje kolekcijoje, kuri įveista 1979 m., auga augalai išauginti iš sėklų; antrojoje – atrinktos genetinės linijos ir trečiojoje – veislės ir

rūšys. Genetinių linijų kolekcijos augalai išauginti iš sėklų, surinktų gamtinėse populiacijose (Altajaus srityje, Rusijoje).

**4 lentelė.** VU Botanikos sodo *Lonicera* L. genties augalų kolekcijos sudėtis ir tyrimams naudoti pavyzdžiai

Taksonas	Dendrologijos sk.	Pomologijos sk.	Iš viso	Pavyzdžių, iš kurių išskirta DNR, skaičius
Rūšys	37 (49)	8 (19)	40 <sup>1</sup> (68)	13 [15] <sup>2</sup>
Porūšiai	5	4 (11)	8 <sup>1</sup> (11)	4 [14]
Veislės	24 (36)	28 (32)	51 <sup>1</sup> (38)	28 [39]
Genetinės linijos	–	35	35	32
Iš viso:	66 (85)	75 (62)	134 (117)	77 [100]

<sup>1</sup> – to paties taksono augalai auginami Dendrologijos ir Pomologijos skyriuose, todėl bendras skaičius mažesnis;

( ) – to paties taksono augalų, gautų iš kelių vietų, pavyzdžių skaičius;

[ ]<sup>2</sup> – tiriamo taksono pavyzdžių, kurie atrinkti DNR ir filogenetiniams tyrimams, skaičius.

Siekiant kuo plačiau išanalizuoti kolekcijos pavyzdžius, DNR tyrimams buvo pasirinkti įvairių taksonų augalų pavyzdžiai.

### 1.1.1. *Lonicera* L. genties rūšys

VU Botanikos sodo sausmedžio *Lonicera* L. genties rūšių kolekcijos tyrimui buvo atrinkta 13 rūšių, iš kurių septynių pavyzdžiai augo Pomologijos skyriuje, penkių – Dendrologijos ir vienas *L. xylosteum* L. pavyzdys augo natūraliai (5 lentelė). *L. edulis* tyrimui buvo paimti du pavyzdžiai, kurie skyrėsi savo kilme.

**5 lentelė.** *Lonicera* L. genties rūšys, atrinktos molekuliniams tyrimams, jų augimo vieta Botanikos sode ir „kolekcinė“ kilmė

Nr.	Rūšies pavadinimas	Vieta Botanikos sode	Vieta, iš kurios rūšys pateko į kolekciją	
1	<i>Lonicera orientalis</i> Lam. – kaukazinis sausmedis	Pom.	RUS, VIR, 1992	
2	<i>Lonicera venulosa</i> (Maxim.) Vorosh.	Pom.	RUS, VIR, 1997	
3	<i>Lonicera emphylocalyx</i> (Maxim.) Nakai	Pom.	RUS, VIR, 1997	
4	<i>Lonicera chrysantha</i> Turcz. ex Ledeb.	Pom.	FIN, Turku HBU, 1993	
5	<i>Lonicera boczkarnikowae</i> Plekhanova	Pom.	RUS, VIR, 1997	
6	<i>Lonicera caerulea</i> L. – melsvauogis sausmedis	Pom.	RUS, Meshcherskoje, St Expert, 1997, sėklos	
7	<i>Lonicera edulis</i> Turcz. ex Freyn. – valgomasis sausmedis	Pom.	a	RUS, Archangelsk Arb, 1996
			b	ISL, Reykjavik HB, 1995
			c	Kilmė nežinoma, 1993

### 5 lentelės tęsinys

8	<i>Lonicera microphylla</i> Willd. ex Schult. – smulkialapis sausmedis	Dend.	DEU, Dresden HB TU, 1987
9	<i>Lonicera vesicaria</i> Kom.	Dend.	LVA, Salaspils HBN, 1996
10	<i>Lonicera alpigena</i> L. – alpinis sausmedis	Dend.	LTU, VU BS, 1978, auginiai
11	<i>Lonicera x bella</i> f. ‘Candida’ Zabel	Dend.	CZE, Průhonice H, 2005, sėklos
12	<i>Lonicera praeflorens</i> Batalin	Dend.	RUS, Maskva HB, 1996
13	<i>Lonicera xylosteum</i> L. – paprastasis sausmedis	Sav.	LTU, savaiminis

Pom. – Pomologijos skyrius; Dend. – Dendrologijos skyrius; Sav. – savaiminis; HBU – Hortus Botanicus Universitatis; HB TU – Der Botanische Garten der Technischen Universität Dresden; HBN – National Botanic Gardens of Latvia

Mūsų tyrimui pasirinktos rūšys apima platų sausmedžių paplitimo arealą ir daugelis jų labai skiriasi morfologiškai. Tarp jų yra dekoratyvinių ir valgomais vaisiais sausmedžio rūšių.

#### 1.1.2. *L. caerulea* porūšiai

Tyrimui pasirinkome 14 pavyzdžių, atstovaujančių keturis porūšius: *L. caerulea* L. subsp. *kamtschatica* (šeši pavyzdžiai), *L. caerulea* L. subsp. *pallasii* (keturi pavyzdžiai), *L. caerulea* L. subsp. *altaica* (Плеханова, 1994a) (trys pavyzdžiai), *L. caerulea* L. subsp. *stenantha* (Skvortsov, 1986) (vienas pavyzdys) (6 lentelė).

#### 6 lentelė. *Lonicera* L. genties porūšiai ir jų „kolekcinė“ kilmė

Nr.	Porūšis	Vieta, iš kurios rūšys pateko į kolekciją
1	<i>Lonicera caerulea</i> L. subsp. <i>kamtschatica</i> (Sevast.) Pojark.	LVA, Salaspils HBA, 1991, auginiai EST, Tartu HBA, 1991, auginiai CZE, Průhonice H 1997, sėklos
2	<i>Lonicera caerulea</i> L. subsp. <i>stenantha</i> (Pojark.) Skvortsov	RUS, VIR, 1997, auginiai
3	<i>Lonicera caerulea</i> L. subsp. <i>pallasii</i> (Ledeb.) Browicz	RUS, VIR, 1997, auginiai
4	<i>Lonicera caerulea</i> L. subsp. <i>altaica</i> Pall.	RUS, VIR, 1997, auginiai

Tyrimams pasirinkome daugiausia *L. caerulea* L. subsp. *kamtschatica* pavyzdžių, nes jų kolekcijoje yra daug, be to, pavyzdžiai į kolekciją pateko iš įvairių vietų. Subsp. *altaica* buvo tiriamas tik vienintelis kolekcijoje esantis pavyzdys.

### 1.1.3. *L. caerulea* veislės

Pirmieji melsvauogio sausmedžio selekcijos darbai prasidėjo 1940-1950 m. Sovietų Sąjungoje Pavlovsko selekcijos stotyje (RFSSR). Pradinė medžiaga selekcijai buvo *L. caerulea* subsp. *kamtschatica*, *L. turczaninowii* ir *L. caerulea* subsp. *altaica* augalai. Iki 2000 m. buvo sukurta daugiau kaip 100 sausmedžio veislių. Tyrimams pasirinkome visų 28-ių veislių, augančių VU Botanikos sode Pomologijos skyriuje, 39 pavyzdžius. Kai kurie šių veislių kilmės duomenys, VIR kodas bei jų patekimo į VU Botanikos sodo kolekciją data pateikti 7-oje lentelėje. Dalis veislių auginių pavyzdžių gauta iš Kaliningrado botanikos sodo.

**7 lentelė.** *Lonicera caerulea* L. veislės atrinktos tyrimams ir jų kilmė

Nr.	Veislės pavadinimas	Išvedimo metai	VIR kodas	„kolekcinė“ kilmė	Veislių kilmė
1	‘Narymskaya’	1972/ 1982*	30049	VIR**, 1996	Išvesta iš atrinktų sėjinukų, gautų laisvo apsidulkinimo būdu iš veislės ‘Delfin’
2	‘Desertnaya’	1962*	25783	VIR, 1996	Išvesta iš atrinktų sėjinukų, gautų laisvo apsidulkinimo būdu iš Kamčiatkos r. augalų
3	‘Salyut’	1975/ 1986*	32254	VIR, 1997	Veislė gauta iš <i>L. caerulea</i> subsp. <i>altaica</i> sėjinukų
4	‘Sinyaya Ptitsa’	1965/ 1982*	30042	VIR, 1997	Išvesta iš atrinktų sėjinukų, gautų laisvo apsidulkinimo būdu iš veislės ‘Start’
5	‘Lazurnaya’	1965/ 1982*	31386	LTU, 1996	Išvesta iš atrinktų sėjinukų, gautų laisvo apsidulkinimo būdu iš veislės ‘Start’
6	‘Altayskaya’	–	–	LTU, 1996	Kilmė nežinoma
7	‘Rannyaya’	1962*	31611	LTU, 2006	Kilmė nežinoma
8	‘Start’	1972*	25799	VIR, 1997	Išvesta iš atrinktų sėjinukų, gautų laisvo apsidulkinimo būdu iš Kamčiatkos r. augalų
9	‘Fialka’	1992*	35900	VIR, 1997	Išvesta iš atrinktų sėjinukų, gautų laisvo apsidulkinimo būdu iš veislės ‘Roksana’
10	‘Roksana’	1966/ 1982*	30054	VIR, 1997	Išvesta iš atrinktų sėjinukų, gautų laisvo apsidulkinimo būdu iš Kamčiatkos r. augalų
11	‘Parabelskaya’	1966/ 1982*	30052	VIR, 1997	Išvesta iš atrinktų sėjinukų, gautų laisvo apsidulkinimo būdu iš veislės ‘Delfin’
12	‘Morena’	1972/ 1992*	35919	VIR, 1997	Išvesta iš atrinktų sėjinukų, gautų laisvo apsidulkinimo būdu iš veislės ‘Delfin’
13	‘Volshebica’	2000	–	LTU, 2005	Išvesta iš atrinktų sėjinukų, gautų laisvo apsidulkinimo būdu iš veislės ‘Smolinskaya’
14	‘Velikan’	–	–	HBU, 1997	Kilmė nežinoma



### 7 lentelės tęsinys

15	‘Chernichka’	1994	–	LTU, 2005	Išvesta iš atrinktų sėjinukų, gautų laisvo apsidulkinimo būdu iš veislės ‘Smolinskaya’
16	‘Goluboje Vereteno’	1965/ 1982*	30041	LTU, 1996	Išvesta iš atrinktų sėjinukų, gautų laisvo apsidulkinimo būdu iš veislės ‘Start’
17	‘Obilnaya’	–	–	HBU, 1997	Kilmė nežinoma
18	‘Valentina’	–	–	HBU, 1997	Kilmė nežinoma
19	‘Lyulia’	1988	–	HBU, 1997	Kilmė nežinoma
20	‘Kuvshinovidnaya’	1962*	31608	HBU, 1997	Išvesta iš F <sub>2</sub> kartos sėjinukų Petropavlovsko – Kamčiatkos r.
21	‘Bugristaya’	–	–	HBU, 1997	Kilmė nežinoma
22	‘Zolushka’	1965/ 1982*	31385	VIR, 1997	Išvesta iš atrinktų sėjinukų, gautų laisvo apsidulkinimo būdu iš Kamčiatkos r. augalų
23	‘Regel – 683’	1988*	–	VIR, 1997	Sėjinukas F <sub>1</sub> laukinio sausmedžio iš Primorės krašto Škotovsko rajono. Diploidas 2n=18
24	‘Bakcharskaya’	1966/ 1982*	30044	VIR, 1996	Išvesta iš atrinktų sėjinukų, gautų laisvo apsidulkinimo būdu iš Tolimųjų Rytų sausmedžių
25	‘Viola’	1994*	38157	VIR, 1996	Gauta kryžminant ‘Sayanskaya-322’ su ‘Leningr. Velikan’
26	‘Vasyuganskaya’	1966/ 1979*	29822	VIR, 1996	Išvesta iš atrinktų sėjinukų, gautų laisvo apsidulkinimo būdu iš veislės ‘Delfin’
27	‘Tomichka’	1966/ 1979*	29825	VIR, 1996	Išvesta iš atrinktų sėjinukų, gautų laisvo apsidulkinimo būdu iš veislės ‘Delfin’
28	‘Leningradskii Velikan’	1979*	25793	VIR, 1996	Išvesta iš F <sub>3</sub> kartos sėjinukų Petropavlovsko – Kamčiatkos r.

\* – metai, kada veislė buvo įtraukta į VIR katalogą

\*\* – VIR – N. I. Vavilovo Rusijos augalininkystės institutas (St. Petersburgas, Rusija)

#### 1.1.4. *L. caerulea* genetinės linijos

Sausmedžio genetinių linijų kolekcija pradėta kurti 1996 m. Pomologijos skyriuje. Augalai išauginti iš sėklų, kurios buvo surinktos nuo natūraliai augančių sausmedžių Altajaus krašte. Šiuo metu kolekciją sudaro 32 genetinės linijos (141 augalas). Tyrimui atrinkome po vieną, visų 32 sausmedžio genetinių linijų, pavyzdį (8 lentelė). Kadangi šie pavyzdžiai gauti iš natūralių populiacijų, kuriose augantys augalai morfologiškai neapibūdinami, tai, norėdami identifikuoti morfologinius skirtumus tarp genetinių linijų pavyzdžių, pasirinkome lengvai įvertinamus požymius. Genetinių linijų pavyzdžių kai kurių morfologinių požymių rodikliai pateikti 8-oje lentelėje. Atlikus minėtų

genetinių linijų pavyzdžių DNR polimorfizmo tyrimus, jas būtų galima lengviau identifikuoti pagal genetinius skirtumus.

**8 lentelė.** Genetinių linijų pavyzdžių morfologinių požymių suvestinė

Nr.	Genetinė linija <sup>1</sup>	Požymiai <sup>2</sup>															
		Krūmas				Lapas				Žiedas				Vaisius			
		KA	KF	ŠS	ŽS	IP	LF	LS	LP	VS	ŽF	ŽD	ŽP	VD	VP	VF	VS
1	'2R'	1,5	r	rr	V	7/3	PE	ž	n/n	g	v	V	V	ST	Ba	ą	rū
2	'3-5'	1,5	r	rr	S	7/3	PE	ž	n/n	g	vv	V	V	V	Ba	ą	rū
3	'2-1'	1,4	r	rr	S	6/2	PK	ž	n/n	g	v	V	V	V	Ba	ve	rū
4	'3-79'	1,5	r	rr	S	6/2	PL	ž	s/s	bg	v	V	V	V	Ly	c	sl
5	'3R'	2	r	rr	S	7/2	PE	ž	n/n	g	vp	V	S	V	Ba	c	rū
6	'3U'	1	r	ru	V	6/2	PK	ž	n/s	g	v	V	V	LS	Ba	ą	sl
7	'3-80'	1,2	o	ru	V	5/2	PK	šž	n/n	bg	vp	s	V	V	Ba	ą	rū
8	'10-32'	1	o	ru	V	4/2	L	mž	n/n	bg	vp	s	S	V	Ly	c	sl
9	'1L'	1	r	ru	V	6/2	PE	šž	n/s	g	vv	V	V	V	Ba	ve	sl
10	'1G16'	1,4	o	ru	V	7/3	PE	ž	s/s	g	vv	V	V	V	Ly	ą	sl
11	'1E'	1,5	o	ru	V	7/3	PE	ž	s/s	bg	vv	V	V	ST	Ba	ą	rū
12	'2D'	2	o	ru	S	6/2	L	g	s/s	bg	vv	V	V	V	Ba	c	sl
13	'2C63'	2	r	ru	S	7/3	PA	šž	s/s	bg	vv	V	V	V	Ba	ą	sl
14	'1B43'	1,4	r	ru	V	6/2	L	mž	s/s	bg	vp	V	V	S	Ly	ą	sl
15	'2K'	1,5	r	ru	V	7/2	PK	šž	n/n	g	v	V	V	V	Ba	ą	sl
16	'2S'	1,5	r	rr	V	6/2	PK	ž	n/s	g	v	V	V	V	Ly	e	sl
17	'19'	2	o	ru	V	7/2	PE	mž	s/n	bg	v	V	V	V	Ba	ą	sl
18	'1N73'	1	o	ru	V	6/2	PE	ž	n/s	bg	vp	V	V	ST	Ba	c	sl
19	'22T12'	2	atk	ru	S	6/2	PE	ž	s/s	bg	vv	V	V	ST	Ba	k	sl
20	'1U'	1,2	r	gr	S	5/2	PE	šž	s/s	g	p	V	V	V	Ba	c	sl
21	'1V'	1,4	o	gr	V	7/3	PE	ž	s/s	g	p	V	V	V	Ly	c	sl
22	'2E'	1	atk	ru	S	7/3	L	šž	s/s	bg	p	V	V	V	Ly	ak	sl
23	'1T'	1,4	r	ru	S	6/2	L	ž	s/s	g	p	V	S	V	Ba	c	sl
24	'1M'	1,5	r	gr	V	6/2	PE	šž	s/s	g	p	V	V	ST	Ba	c	rū
25	'1P'	1,5	atk	gr	V	6/2	PA	ž	s/s	g	p	V	V	V	Ly	ve	sl
26	'96-3'	0,8	r	rr	S	5/2	PE	tž	n/s	bg	vp	s	S	ST	Ba	ą	rū
27	'96-2'	1	o	ru	V	4/2	PE	ž	s/s	g	p	V	V	V	Ly	ą	sl
28	'96-1'	1	r	ru	V	5/2	PK	ž	s/s	g	p	V	V	V	Ba	a	rū
29	'96-4'	1	o	rr	V	6/2	PK	tž	n/s	bg	vv	V	V	ST	Ba	ą	sl
30	'L-69-3'	0,7	r	pr	S	7/3	E	ž	s/s	g	vp	V	V	ST	Ly	ak	rū
31	'10'	1	r	ru	V	6/2	PE	ž	n/n	bg	v	V	V	V	Ba	ą	sl
32	'32'	1	r	ru	V	6/2	PK	ž	n/s	g	v	V	S	ST	Ly	e	sl

<sup>1</sup> – genetinių linijų kolekcijos pavadinimai yra įvardinti VU BS suteikiant jiems unikalų kodą;

<sup>2</sup> – Požymiai:

**Krūmas** – **KA** – krūmo aukštis (metrais), **KF** – krūmo forma (r – rutulio, o – ovalo, atk – atvirkščiai kūgiška), **ŠS** – šakų spalva (rr – rausvai rusva, ru – rusva, gr – gelsvai rusva, pr – pilkai rusva), **ŽS** – žievės supleišėjimas (V – vidutinis, S – stiprus).

**Lapas** – **IP** – lapo ilgis/plotis (mm), **LF** – lapo forma (PE – pailgai elipsiškas, PK – pailgai kiaušiniškas, PL – pailgai lancetiškas, L – lancetiškas, PA – pailgai atvirkščiai kiaušiniškas, E – elipsiškas), **LS** – lapo spalva (ž – žalia, šž – šviesiai žalia, tž – tamsiai žalia, mž – melsvai žalia), **LP** – lapo plaukuotumas (viršus/apacia), (n – neplaukuotas, s – silpnai plaukuotas).

**Žiedas** – **VS** – vainiklapių spalva (g – gelsvas, bg – baltai gelsvas), **ŽF** – žiedo forma (v – vamzdelio, vv – vamzdelio–varpelio, vp – vamzdelio–piltuvėlio, p – piltuvėlio), **ŽD** – žiedo dydis (V – vidutinis, s – smulkus), **ŽP** – vainiklapių plaukuotumas (V – vidutinis, S – stiprus).

**Vaisius** – **VD** – vaisiaus dydis (ST – stambus, ≤1 g, LS – labai stambus, >1 g, V – vidutinis, 0,5–1 g), **VP** – vaisiaus paviršius (Ba – banguotas, Ly – lygus), **VF** – vaisiaus forma (ą – ašotiška, a – ankšties, ve – verpstiška, c – cilindriška, ak – atvirkščiai kiaušiniška), **VS** – vaisiaus skonis (rū – rūgštus, sl – saldus).

## 2. Tyrimų metodika

Norėdami selekciniu požiūriu iširti ir įvertinti sausmedžių kolekciją, tyrėme pasirinktų sausmedžio pavyzdžių DNR polimorfizmą bei juos genotipavome. Šiems tyrimams naudojome RAPD metodą. Siekdami įvertinti kai kurių sausmedžio genties rūšių ir *L. caerulea* porūšių filogenetinius ryšius, atlikome cpDNR specifinių nekoduojančių regionų sekoskaitą, nustatytas sekas palyginome tarpusavyje ir su duomenų bazėse pateikiamais duomenimis.

Visi molekuliniai – genetiniai kolekcijos pavyzdžių tyrimai buvo atliekami Vilniaus universiteto Gamtos mokslų fakulteto Botanikos ir genetikos katedros Augalų genetikos laboratorijoje. DNR sekoskaita atlikta VU Biotechnologijos instituto Sekvenavimo centre.

### 2.1. Cheminės medžiagos

9 lentelė. Cheminės medžiagos ir trumpas jų aprašymas

Medžiaga	Sudėtis / koncentracija / ch. formulė / pH	Gamintojas / šalis
TRIS	$C_4H_{11}NO_3$ / 1M	ROTH / Vokietija
Boro rūgštis	$H_3BO_3$	ROTH / Vokietija
EDTA	$C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$ / 0,5M	ROTH / Vokietija
Agarozė	$(C_{12}H_{18}O_9)_n$	Fermentas / Lietuva
ultra PURE™ agarozė	$(C_{12}H_{18}O_9)_n$	GIBCO BRL / JAV
Sacharozė	$C_{12}H_{22}O_{11}$	ROTH / Vokietija
Bromfenolio mëlis	$C_{19}H_9Br_4O_5SNa$	ROTH / Vokietija
CTAB	$CH_3(CH_2)_{15}N(CH_3)3Br$	ROTH / Vokietija
2 mM dNTP Mix	dATP, dGTP, dCTP, dTTP	Fermentas / Lietuva
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	Fermentas / Lietuva
10x buferis Taq – MgCl <sub>2</sub>	+KCl	Fermentas / Lietuva
Taq DNR polimerazė	rekombinantinė	Fermentas / Lietuva
PVP-40 polivinilpirolidonas	$(C_6H_9NO)_n$	Sigma / Vokietija
2 – merkaptoetanolis	$C_2H_6OS$	Sigma / Vokietija
Chloroformas	$CHCl_3$	ROTH / Vokietija
Etidžio bromidas	$C_{21}H_{20}N_3Br$	ROTH / Vokietija
Etilo alkoholis	96,4%	Vilniaus degtinė / Lietuva
Molekulinio ilgio žymuo	GeneRuler™ DNA Ladder Mix 10000 – 100 bp / 0,1 µg/µl	Fermentas / Lietuva
Molekulinės masės žymuo	MassRuler™ DNA Ladder Mix 10000-80 bp	Fermentas / Lietuva
Molekulinės masės svorio dažas	6x MassRuler™ DNA Loading Dye	Fermentas / Lietuva
Ribonukleazė A	10 mg/ml	Fermentas / Lietuva
Ampicilinas	$C_{16}H_{18}N_3NaO_4S$	BioChemica / Vokietija
LB – agaras	pH 7,5	Fluka / Indija
LB – buljonas	pH 7,5	Fluka / Indija

## 2.2. Tirpalai ir jų paruošimas

**CTAB (cetiltrimetilamonio bromido) ekstrakcijos buferis (20 ml):** 0,8 ml 0,5M EDTA (pH 8,0); 2 ml 1M Tris (pH 8,0); 5,5 ml 5M NaCl; 4 ml 10% CTAB; 0,04 ml 2-merkaptoetanolio; 200 mg PVP. Buferis ruošiamas prieš pat DNR skyrimą.

**1,5% agarozės gelis RAPD produktų analizei.** Pasveriamas 3 g agarozės. Įpilama 20 ml 10x TBE buferio ir distiliuoto H<sub>2</sub>O iki 200 ml. Agarozė tirpinama lėtai kaitinant mikrobangų krosnelėje, retsykais pamaišoma. Tirpinama iki užvirimo, kol lieka vienalytė masė. Į nepilnai atvėsusią agarozę įlašinama 20 µl etidžio bromido tirpalo (5 mg/ml). Išlydytos ir atvėsusios iki 58°C – 60°C agarozės masė supilama į gelio užpylimo rėmelį su įstatytais šukomis ir paliekama stingti.

**10x TBE elektroforezės buferis.** 500 ml buferio paruošti atsveriamas 54,45 g TRIS (890 mM), 27,81 g boro rūgšties (890 mM), 4,65 g EDTA (20 mM). Komponentai ištirpinami distiliuotame vandenyje, buferio galutinis tūris 500 ml. Laikomas kambario temperatūroje.

**6x bromfenolio mėlio tirpalas.** 40% sacharozė, 0,002 M EDTA, 0,2% bromfenolio mėlio. Laikomas +4°C temperatūroje.

## 2.3. *Lonicera* L. genties augalų DNR skyrimo metodikos optimizavimas

Norėdami išskirti geros kokybės genominę DNR iš *Lonicera* L. genties augalų, naudojome skirtingas DNR skyrimo metodikas. Daugumos augalų audiniuose yra daug fenolinių junginių, kurių oksidacijos produktai chinonai sukelia DNR pokyčius. Tokia DNR netinka daugeliui fermentinių reakcijų (John, 1992). Genominę DNR pabandėme skirti trimis metodais:

- 1) modifikuotu CTAB metodu (Murray, Thompson, 1980; Doyle, Doyle, 1990);

2) DNR skyrimo rinkiniu su kolonėlėmis „NucleoSpin<sup>®</sup> Plant II“ (MACHEREY–NAGEL GmbH, Co. KG, Vokietija);

3) DNR skyrimo rinkiniu „Genomic DNA Purification Kit“ (Fermentas, Lietuva).

Įvertinę išskirtos DNR kokybę bei jos tinkamumą fermentinėms reakcijoms, pasirinkome „Genomic DNA Purification Kit“ DNR skyrimo rinkinį.

DNR buvo skiriama iš jaunų, ką tik nuskintų lapų, kurie buvo laikomi šaldymo krepšiuose +4°C temperatūroje. Buvo skiriama pagal šiek tiek modifikuotą (pritaikytą DNR skyrimui iš augalų) gamintojo pateiktą metodiką:

- apie 100 mg augalo lapų audinio homogenizuojama skystame azote;
- homogenizuoti augalo pavyzdžio milteliai nedelsiant perkeliama į 1,5 ml mėgintuvėlius su 200 µl TE (Tris/EDTA) (pH 7,4) buferio ir 400 µl lizės tirpalo mišinio, lengvai sumaišoma;
- mėginiai inkubuojami „Eppendorf Thermomixer comfort“ termomaišyklėje 5 min., esant +65°C temperatūrai ir 300 rpm;
- po inkubacijos į mėgintuvėlius su pavyzdžiais nedelsiant įpilama 600 µl chloroformo. Mėginiai švelniai sumaišomi;
- mėginiai centrifuguojami „Eppendorf Centrifuge 5415 R“ centrifugoje 3 min., esant 12000 x g;
- viršutinė vandeninė fazė pernešama į naujus 1,5 ml mėgintuvėlius. Siekiant pašalinti RNR priemaišas, pridedama po 5 µl ribonukleazės A (10 mg/ml). Mėginiai inkubuojami 30 min. esant +37°C temperatūrai;
- po ribonukleazės A poveikio į mėginius įpilama 600 µl chloroformo ir centrifuguojama 3 min. esant 12000 x g;
- viršutinė vandeninė fazė perkeliama į 1,5 ml mėgintuvėlius su 1x nusodinimo buferiu (80 µl 10x nusodinimo tirpalo ir 720 µl dejonizuoto H<sub>2</sub>O), mėginiai švelniai išmaišomi vartant rankose;

- mėginiai centrifuguojami 3 min. esant 12000 x g, gautas supernatantas visiškai pašalinamas, o DNR nuosėdos ištirpinamos 100  $\mu$ l 1,2M NaCl tirpalo;
- ištirpusi DNR nusodinama 300  $\mu$ l (-20°C, 96,4%) etilo alkoholiu inkubuojant mėginius 20 min. -20°C temperatūroje;
- DNR atskiriama nuo etilo alkoholio ir jame ištirpusių priemaišų mėginius centrifuguojat 6 min. esant 12000 x g, +4°C temperatūroje;
- druskų liekanos iš mėginių pašalinamos praplaunant DNR nuosėdas 200  $\mu$ l (-20°C, 70%) etilo alkoholiu;
- mėginiai centrifuguojami 6 min. esant 12000 x g, +4°C temperatūroje;
- po centrifugavimo visiškai pašalinama etilo alkoholio frakcija, išskirta DNR džiovinama steriliame bokse, kambario temperatūroje;
- išdžiovinta DNR ištirpinama 100  $\mu$ l sterilaus dejonizuoto H<sub>2</sub>O (18,3 $\Omega$ ). Išskirta (neskiesta) DNR laikoma užšaldyta -80°C kriogeniniame šaldiklyje.

#### 2.4. DNR koncentracijos ir kokybės nustatymas

DNR koncentraciją nustatėme „BioPhotometer“ (Eppendorf, Vokietija) biofotometru, 1 cm šviesos kelio ilgio vienkartinėse kiuvetėse. Atsiradus galimybei, DNR koncentracija buvo patikslinta naudojant NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 (Thermo SCIENTIFIC, JAV) spektrofotometrą.

DNR tirpalo optinis tankis (OT) buvo matuojamas esant 260 nm ir 280 nm šviesos bangos ilgiams. Pavyzdžio DNR koncentracija nustatyta esant 260 nm bangos ilgiui. Vienas OT vienetas apytiksliai atitinka 50 ng  $\mu$ l<sup>-1</sup> dvigrandės DNR. Išskirtos DNR grynumą parodo optinių tankių, esant 260 nm ir 280 nm šviesos bangos ilgiui, santykis. Švaraus DNR preparato OT<sub>260</sub>/OT<sub>280</sub> turėtų būti apie 1,8-2,0. Optinių tankių santykis, didesnis nei 2 vienetai, rodo, kad DNR mėginys yra užterštas RNR priemaišomis, mažesnis nei 1,8 vienetai rodo, kad DNR užteršta įvairiais organiniais junginiais (antriniais metabolitais, polisacharidais). Naudojama darbinė DNR koncentracija – 50 ng/ $\mu$ l.

DNR švarumas ir koncentracija buvo tikrinama vizualiai, palyginant analizuojamus DNR pavyzdžius su žinomos koncentracijos DNR pavyzdžiu, naudojant elektroforezės 1% agarozės gelyje metodą pagal Sambrook ir Russell (2001) aprašytą protokolą.

## 2.5. PGR vykdymas

Reakcijos mišinys ruošiamas prieš pat amplifikaciją. Laminariniame bokse, beveik steriliomis sąlygomis, į 0,2 ml sterilius vienkartinis mėgintuvėlius supilamas reakcijos mišinys (25 µl vienai reakcijai):

10x Taq MgCl <sub>2</sub> buferis	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3,0 µl
dNTP (2 mM)	2,5 µl
Pradmuo (1 OV)	1,0 µl
Taq DNR polimerazė (5 u/µl)	0,2 µl
DNR (50 ng/µl)	2,0 µl
Dejonizuotas H <sub>2</sub> O (18,3Ω)	13,8 µl

Genominės DNR RAPD amplifikacija buvo vykdoma „Eppendorf Mastercycler<sup>®</sup>“ termocikleryje. PGR protokolai: 4 min./+94°C; po to 35 ciklai: 1 min./+94°C DNR denatūracija; 1 min./+35°C oligonukleotidinių pradmenų prisijungimas; 2 min./+72°C DNR sintezė. Baigiamasis etapas: 5 min./+72°C. Po amplifikacijos pavyzdžiai laikomi +4°C temperatūroje.

### 2.5.1. RAPD pradmenų parinkimas sausmedžio kolekcijos tyrimams

Svarbus etapas RAPD bandymuose – tinkamų pradmenų parinkimas, su kuriais būtų galima gauti aiškius, atsikartojančius polimorfinius DNR fragmentus. Kaip parodė išsamūs Fritsch ir kt. darbai (1993), išbandžius 480 įvairių sekų oligonukleotidinius pradmenis augalų RAPD analizei, 10% pradmenų visiškai nedavė DNR amplifikacijos fragmentų. Kiti tirti pradmenys davė DNR amplifikacijos fragmentus priklausomai nuo tiriamos augalų šeimos. Mes išbandėme 50 įvairių RAPD pradmenų (10 a, b lentelės) ir iš gautų DNR amplifikacijos spektrų kokybės pakartotiniuose eksperimentuose

atrinkome geriausiai *Lonicera L.* genties augalų RAPD tyrimams tinkančius pradmenis (10 a, b lentelėse geriausius rezultatus davę pradmenys paryškinti). Pradmenys pateikti pagal IUPAC nomenklatūros reikalavimus.

**10 lentelė** RAPD pradmenys, kurie buvo naudojami *Lonicera L.* genties tyrimams

**a**

Pradmuo 170 <sup>1</sup>	Seka 5' → 3'	Pradmuo 470 <sup>1</sup>	Seka 5' → 3'	Pradmuo 380 <sup>1</sup>	Seka 5' → 3'
01	CAT CCC GAA C	01	GCC CCT CTT G	01	ACG CGC CAG G
02	CAG GGT CGA C	02	GGA CCG ACT G	02	ACT CGG CCC C
03	ACG GTG CCT G	03	CTG TCG GCT C	03	GGC CCC ATC G
04	CGC ATT CCG C	04	GGA CCG CTA G	04	CGC GAG GTG C
05	GAG ATC CGC G	05	CAT GTC CGC C	05	CGA TCC GCG C
06	GGA CTC CAC G	06	GCA CGT GAG G	06	CCC GAC TGC C
07	ATC TCC CGG G	07	CTA TCG CCG C	07	GGC AAG CGG G
08	CTG TAC CCC C	08	GAG AGG GAG G	08	CGC ACC GCA C
09	TGC AGC ACC G	09	CCG GGG TTA C	09	ACG GCG GCT C
10	CAG ACA CGG C	10	GCA GAC CCT C	10	CGC GCT ACG C
	GC –70%		GC –70%		GC –80%

<sup>1</sup> – Carl Roth + Co. KG „Random Primer Kit for RAPD-PCR“

**b**

Pradmuo A <sup>2</sup>	Seka 5' → 3'	GC%	Pradmuo A <sup>2</sup>	Seka 5' → 3'	GC%
01	CAG GCC CTT C	70	11	CAA TCG CCG T	60
02	TGC CGA GCT G	70	12	TCG GCG ATA G	60
03	AGT CAG CCA C	60	13	CAG CAC CCA C	70
04	AAT CGG GCT G	60	14	TCT GTG CTG G	60
05	AGG GGT CTT G	60	15	TTC CGA ACC C	60
06	GGT CCC TGA C	70	16	AGC CAG CGA A	60
07	GAA ACG GGT G	60	17	GAC CGC TTG T	60
08	GTG ACG TAG G	60	18	AGG TGA CCG T	60
09	GGG TAA CGC C	70	19	CAA ACG TCG G	60
10	GTG ATC GCA G	60	20	GTT GCG ATC C	60

<sup>2</sup> – Carl Roth + Co. KG „Random Primer Kit for RAPD-PCR A“

### 2.5.2. Specifinių pradmenų sukūrimas *Lonicera caerulea L.* rūšies identifikavimui

Savo darbe, remdamiesi polimorfinei tetraploidinei *L. caerulea L.* rūšiai specifiniu RAPD žymeniu, pabandėme sukurti SCAR žymenį. Pradmenų porą SCAR žymenų analizei nustatėme naudodami klonuoto RAPD fragmento nukleotidinių sekų sekoskaitos duomenis. SCAR pradmenys buvo sukurti Lasergene 8 kompiuterine programa, naudojant „PrimerSelect“ modulį (DNASTAR<sup>®</sup>, Inc. USA). PGR reakcijos sąlygas pasirinkome atsižvelgdami į



parametrus, kuriuos nustatė minėta programa. Genominės DNR amplifikacija su dviem SCAR pradmenimis buvo atlikta naudojant tuos pačius PGR komponentus, kaip ir atliekant RAPD reakciją, šiek tiek pakeitus PGR sąlygas. PGR amplifikacija vyko „Eppendorf Mastercycler<sup>®</sup>“ termocikleryje. PGR sąlygos:

Pradinė DNR denatūracijos temp. °C ir laikas	4 min./+94°C
DNR denatūracijos temp. °C ir laikas	1 min./+94°C
Pradmenų prisijungimo temp. °C ir laikas	1 min./+56°C
DNR sintezės temp. °C ir laikas	2 min./+72°C
Amplifikacijos ciklų skaičius	25
Galūtinis DNR sintezės etapo laikas	5 min./+72°C

Po amplifikacijos pavyzdžiai laikomi +4°C. Gauti SCAR fragmentai buvo analizuojami 1% agarozės gelyje su 1x TBE buferiu.

### **2.5.3. Chloroplastų DNR nekoduojančių specifinių regionų PGR vykdymas**

cpDNR nekuodujantiems regionams tirti buvo naudojama sausmedžio pavyzdžių genominė DNR. Tyrimui pasirinkome šešis nekoduojančius cpDNR regionus: *trnH-psbA*; *5'rpS12-rpL20*; *trnL-trnF*; *trnS-trnG*; *trnS-psbZ* ir *rpS16*, įeinančius į didįjį vienkopijinį chloroplasto genomo regioną, kurį 1998 m. nustatė Wakasugi ir kt. *Nicotiana tabacum* L. cpDNR genome (2 pav). Šiems chloroplastų DNR specifiniams regionams identifikuoti buvo naudojama keturiolika pradmenų atitinkamais deriniais (11 lentelė).

**11 lentelė.** Oligonukleotidiniai pradmenys naudoti cpDNR nekoduojantiems regionams tirti. Pradmenų sekos pateiktos pagal IUPAC nomenklatūros standartą

Pradmenų deriniai	Pradmuo	Pradmens seka	GC (%)	nt ilgis	g/mol	Gamintojas	
1	trnH <sup>GUG</sup>	5'-CGCGCATGGTGGATTCACAATCC-3'	56	23	7024	Fermentas	
	psbA	5'-GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3'	40	22	6749	Fermentas	
2	5'rpS12	5'-ATTAGAAAnrCAAGACAGCCAAT-3'	34	23	7083	Biomers.net	
	rpL20	5'-CGyyAyCGAGCTATATATCC-3'	47	20	6058	Biomers.net	
3	trnL5 <sup>UAAF</sup>	5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3'	55	20	6150	Fermentas	
	trnF <sup>GAA</sup>	5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3'	45	20	6180	Fermentas	
4	a	trnS <sup>GCU</sup>	5'-AGATAGGGATTCGAACCCCTCGGT-3'	52	23	7088	Fermentas
		5'trnG2S	5'-TTTACCCTAAACTATACCCGC-3'	39	24	6902	Fermentas
	b	3'trnG <sup>UUC</sup>	5'-GTAGCGGGAATCGAACCCGCATC-3'	60	23	7058	Fermentas
		5'trnG2G	5'-GCGGGTATAGTTTGTAGTGGTAAA-3'	39	23	7182	Fermentas
5	rpS16F	5'-AAACGATGTGGTArAAAGCAAC-3'	38	22	6813	Biomers.net	
	rpS16R	5'-AACATCwATTGCAAsGATTTCGATA-3'	33	24	7345	Biomers.net	
6	trnS	5'-AGATAGGGATTCGAACCCCTCGGT-3'	52	23	7088	Fermentas	
	psbz	5'-ATGCGGGTTCGATTCCTCCGCTAC-3'	60	22	7015	Biomers.net	

PGR sąlygas parinkome atsižvelgdami į 2005 m. Shaw ir kt. nurodytas metodines rekomendacijas. cpDNR šešių specifinių regionų amplifikacijos sąlygos pateikiamos dvyliktoje lentelėje.

**12 lentelė.** PGR sąlygos cpDNR specifiniams regionams pagausinti

PGR parametras	Pradmenų deriniai cpDNR regionų identifikavimui						
	<i>trnH</i> - <i>psbA</i>	5' <i>rpS12</i> - <i>rpL20</i>	<i>trnL</i> - <i>trnF</i>	<i>trnS</i> - <i>trnG</i>		<i>rpS16</i>	<i>trnS</i> - <i>psbZ</i>
				5'trnG2S	5'trnG2G		
Pradinė DNR denatūracijos temp. °C ir laikas	80 °C/5 min.	96 °C/5 min.	80 °C/5 min.	80 °C/5 min.	80 °C/5 min.	80 °C/5 min.	80 °C/5 min.
DNR denatūracijos temp. °C ir laikas	94 °C/30 s	96 °C/1 min.	94 °C/1 min.	95 °C/1 min.	95 °C/1 min.	94 °C/30 s	95 °C/1 min.
Pradmenų prisijungimo temp. °C ir laikas	56 °C/30 s	55 °C/1 min.	50 °C/1 min.	50 °C/1 min.	50 °C/1 min.	56 °C/30 s	51 °C/1 min.
DNR sintezės temp. °C ir laikas	72 °C/1 min.	72 °C/1 min.	72 °C/2 min.	65 °C/2 min.	65 °C/5 min.	72 °C/1 min.	65 °C/5 min.
Amplifikacijos ciklo skaičius	35 x						
Galutinis DNR sintezės etapo laikas ir temp. °C	72 °C/10 min.	72 °C/5 min.	72 °C/5 min.	65 °C/10 min.	65 °C/5 min.	72 °C/5 min.	65 °C/10 min.
Galutinė laikymo temp. +°C	+4 °C						

#### 2.5.4. Tiriamų cpDNR specifinių regionų trumpas apibūdinimas

Atlikome *Lonicera* L. genties augalų cpDNR nekoduojančių regionų daugybinį sekų palyginimą, kuriuo remiantis buvo tiriamas sausmedžio genties atstovų cpDNR polimorfizmas ir sudaromi filogenetiniai medžiai.

1. cpDNR *trnH-psbA* regionas yra apie 500 bp ilgio tarpgeninis tarpiklis tarp tRNR<sup>His</sup> *trnH* bei *psbA* genų. Kadangi šis regionas nedidelis, tai ir jo amplifikacija vyksta nesunkiai. Šio regiono pagausinimui naudojome *psbA* ir trnH<sup>GUG</sup> pradmenis, kurie buvo susintetinti remiantis atitinkamai Tate ir Simpson (2003) bei Sang ir kt. (1997) publikacijose pateiktomis sekomis.

2. cpDNR 5' *rpS12-rpL20* regionas yra *rpS12* ir *rpL20* genų, koduojančių ribosomos baltymus, tarpiklis. Šio regiono pagausinimui naudojome pradmenis 5' *rpS12* ir *rpL20*, susintetintus pagal Hamilton (1999) publikacijoje pateiktas sekas. Tarpgeninio tarpiklio dydis įvairiuose augaluose svyruoja nuo 800 bp iki 900 bp.

3. cpDNR *trnL-trnF* regionas yra tarpgeninis tarpiklis tarp tRNR<sup>Leu</sup> *trnL* ir *trnF* genų. Šio regiono pagausinimui naudojome pradmenis trnL5'<sup>UAA</sup>F ir trnF<sup>GAA</sup>, susintetintus pagal Shaw ir kt. (2005) pateikiamas sekas. Analizuojamo regiono dydis apie 1000 bp.

4. cpDNR *trnS-trnG* regionas yra tarpgeninis tarpiklis tarp tRNR<sup>Ser</sup> *trnS* ir *trnG* genų. Analizuojamos sekos dydis apie 1500 bp. Kadangi šis regionas yra didelis, tai jo amplifikavimas yra sudėtingas ir vykdomas dviem etapais naudojant pagalbinius pradmenis. *trnS-trnG* regionas pagausinamas su trnS<sup>GCU</sup> ir 3'trnG<sup>UUC</sup> pradmenimis bei su 5'trnG2S ir 5'trnG2G pagalbiniais pradmenimis (Hiratsuka et al., 1989) pagal Jansen ir Palmer (1987) pateiktas PGR vykdymo rekomendacijas.

5. *rpS16* geno, koduojančio chloroplastų ribosomų baltymą, introno regionas buvo amplifikuojamas su pradmenimis rpS16F ir rpS16R, susintetintus pagal Oxelman ir kt. (1997) pasiūlytas bei Shaw ir kt. (2005) modifikuotas sekas. Šis regionas, kurio dydis apie 900 bp, gerai amplifikuojasi.

6. cpDNR *trnS-psbZ* regione sekvenuotas tarpgeninis *trnS-psbZ* tarpiklis, esantis tarp tRNR<sup>Ser</sup> *trnS* geno ir *psbZ* geno. Pradmenys trnS ir psbZ susintetinti pagal Hiratsuka ir kt. (1989) pateiktas sekas. Šis regionas pasižymi tuo, kad įvairiose rūšyse labai skiriasi pagausinamų fragmentų dydis, svyruoja maždaug nuo 550 bp iki 1300 bp.

Šiems cpDNR regionams pagausinti PGR metodu naudojome 50 ng/μl koncentracijos DNR. PGR mišinys ruošiamas prieš pat amplifikaciją. cpDNR-PGR mišinio (50 μl/1 mėginiui) sudėtis:

10x Taq MgCl <sub>2</sub> buferis	5,0 μl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	6,0 μl
dNTP (2 mM)	5,0 μl
Pradmenys (tiesioginis ir atvirkštinis) (1 OV) (naudojami 2 pradmenys)	2,0 μl + 2,0 μl
Taq DNR polimerazė (5 u/μl)	0,25 μl
DNR (50 ng/μl)	2,0 μl
Dejonizuotas H <sub>2</sub> O (18,3Ω)	27,8 μl

PGR produktų amplifikacija vykdyta „Eppendorf Mastercycler®“ termocikleryje.

## 2.6. RAPD produktų frakcionavimas agarozės gelyje

Po amplifikacijos RAPD produktai kartu su DNR užnešimo buferiu (5 μl bromfenolio mėlio vienam pavyzdžiui) buvo frakcionuojami 1,5% agarozės gelyje 1x TBE buferyje, MIDI-2 HU20 (Roth, Anglija) elektroforezės kameroje (gelio dydis 20x20 cm), naudojant srovės šaltinį PowerPac™ HC (BIO-RAD, JAV). Elektroforezės trukmė – 4,15 val., esant 4 V/cm įtampai. PGR produktų ilgiui nustatyti buvo naudojamas GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas, Lietuva) DNR fragmentų dydžio standartas. Elektroforezės rezultatus registruojame ir analizavome naudodami gelių dokumentavimo sistemą BioDocAnalyze (Biometra, Vokietija).

## 2.7. cpDNR sekų analizė naudojant klonavimą

Norėdami tiksliai nustatyti įvairaus ilgio cpDNR nukleotidų sekas, gautus PGR fragmentus klonavome į *Escherichia coli* bakterijų ląsteles. Imliosioms ląstelėms gauti naudojome *E. coli* JM107 kamieną (Fermentas, Lietuva).

Pagausinti DNR fragmentai buvo klonuoti į *E. coli* plazmidę pTZ57R/T (2886 bp) (Fermentas, Lietuva).

### **2.7.1. DNR fragmentų išskyrimas ir paruošimas klonavimui**

Pagausinti cpDNR regionų fragmentai buvo analizuojami 1% agarozės (ultra PURE™, JAV) gelyje 1x TBE buferyje. Gautų cpDNR fragmentų dydžiams įvertinti naudojome „GeneRuler™ DNA Ladder Mix“ (Fermentas, Lietuva). Gauti tinkamo dydžio DNR fragmentai buvo išpjaunami iš gelio ir valomi, naudojant DNR skyrimo iš gelio rinkinį „PCR clean-up Gel extraction NucleoSpin® Extract II“ (MACHEREY–NAGEL GmbH, Co. KG, Vokietija) pagal gamintojo pateikiamą protokolą. Išvalyto cpDNR fragmento koncentracija buvo nustatoma 1% agarozės gelyje TBE buferyje, naudojant DNR fragmentų masės/dydžio „MassRuler™ DNA Ladder Mix 10000-80 bp“ standartą.

### **2.7.2. *Escherichia coli* transformacija ir transformantų analizė**

Imliosioms *Escherichia coli* ląstelėms gauti naudojome „TransformAid™ Bacterial Transformation Kit“ (Fermentas, Lietuva) rinkinį. *E. coli* ląsteles transformavome pTZ57R/T vektoriaus ir cpDNR fragmento ligavimo mišiniu, naudojant „InsTAclone™ PCR Cloning Kit“ rinkinį pagal gamintojo pateikiamus protokolus.

Gautų *E. coli* transformuotų kolonijų atranką atlikome Petri lėkštelėse (LP ITALIANA SPA, Italija), naudodami *lacZ'* sistemą ant agarizuotos „FastMedia™ *E. coli* LB Ampicillin Media“ (Fermentas, Lietuva) terpės su IPTG/X-Gal, SCANLAF/Mars (LaboGene, Danija) laminariniame bokse. Lėkštelės su transformuotomis imliosiomis *E. coli* ląstelėmis buvo inkubuojamos per naktį +37°C temperatūroje „Incucell“ (MMM Medcenter Einrichtungen GmbH, Vokietija) termostate. Išaugę transformantai (baltos *E.*

*coli* kolonijos) buvo persėjami ant LB agarizuotos terpės su 50 mg/ml koncentracijos ampicilinu ir toliau analizuojamos.

Išskyrę plazmidinę DNR iš *E. coli* pagal Birnboim ir Doly (1979) metodiką su nežymiais pakeitimais, atlikome transformantų analizę (Sambrook, Russell, 2001).

Iš klonų, turinčių rekombinantines plazmides, pakartotinai išskyrėme plazmidinę DNR, naudodami „Plasmid DNA Purification NucleoSpin® Plasmid“ (MACHEREY–NAGEL GmbH, Co. KG, Vokietija) plazmidžių skyrimo rinkinį. *E. coli* klonas, turintis reikiamą rekombinantinę plazmidę, užsėjamas į 5 ml LB-Broth terpę su ampicilinu (100 µg/ml). Ląstelės auginamos per naktį purtyklėje „Ecotron“ (INFORS HT, Šveicarija), esant +37°C ir 200 rpm/min. Užauginta *E. coli* ląstelių kultūra centrifuguojama „HETTICH Universal 320 R“ (servoprax®, Vokietija) centrifugoje, esant +4°C ir 4000 aps./min. Po centrifugavimo plazmidinė DNR buvo skiriama pagal gamintojo pateikiamą protokolą. Išskirtos plazmidės DNR koncentracija buvo nustatoma NanoDrop® ND-1000 (JAV) spektrofotometru. Išskyrus rekombinantinės plazmidės DNR, buvo atliekama joje klonuoto DNR fragmento sekoskaita. Norėdami įvertinti sekoskaitos rezultatų patikimumą, atlikome *E. coli* 2-3 klonų plazmidės DNR fragmentų sekoskaitą.

### **2.7.3. Klonuoto DNR fragmento nukleotidų sekų nustatymas ir panašių sekų paieška duomenų bazėse**

Klonuotų cpDNR fragmentų sekoskaita atlikta VU Biotechnologijos instituto Sekvenavimo centre. DNR nukleotidų seka nustatyta automatiškai 16 kapiliarų genetiniu analizatoriumi 3130xl (Applied Biosystems, JAV), naudojant rinkinį „BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit“ (Applied Biosystems, JAV) bei M13/pUC sekoskaitos pradmenį (Fermentas, Lietuva). Gautos sekos buvo analizuojamos naudojant „Sequencing Analysis v5.2“ (Applied Biosystems, JAV) taikomąją kompiuterinę programą, gautas sekas apkarpančią „Chromas v2.33“ programos pagalba. Sekų konvertavimas ir

nukleotidinė analizė atlikta naudojant „Chromas Pro v1.5“ (Technelysium Pty Ltd, Australija) programą. Daugybiniam sekų palyginimui ir filogenetinei analizei naudotos „MEGA 5“ (Tamura et al., 2011) bei „CLC Sequence Viewer v6.3“ (CLC bio, Danija) programos ir ClustalW algoritmas v2.0.11.

Norėdami kuo tiksliau įvertinti filogenetinius ryšius tarp tiriamų sausmedžio pavyzdžių, naudojome įvairius filogenetinius algoritmus. Konkretūs darbe naudoti algoritmai filogenetinių ryšių nustatymui pateikiami kartu su gautų rezultatų analize (III/2.2 skyrius).

Nustatytas cpDNR fragmentų sekas palyginome su tarptautinėse duomenų bazėse esančia informacija. Homologiškų sekų paiešką NCBI duomenų bazėje atlikome naudodami BLASTN v2.2.24 paieškos įrankį. Papildomai homologiškų sekų ieškojome ir EMBL-EBI bei DDBJ duomenų bazėse. Homologiškomis buvo laikomos tos duomenų bazėse aptiktos sekos, kurių E reikšmė buvo mažesnė kaip 0,01.

## **2.8. Duomenų analizė**

Visų tiriamų sausmedžio kolekcijos pavyzdžių DNR buvo amplifikuojama 2-3 kartus. Palyginus pakartotiniuose eksperimentuose gautus RAPD spektrus, tolesnei analizei buvo atrenkamos tik aiškios, patikimai atsikartojančios RAPD juostos. Vienodo dydžio DNR fragmentai laikomi identiškais (Williams et al., 1990). Tam tikro dydžio DNR fragmento buvimas ar nebuvimas tiriamuose genominės DNR pavyzdžiuose buvo įvertinamas binariniu žymėjimu, atitinkamai „1“ arba „0“ („1“ – fragmentas yra, „0“ – fragmento nėra). Neatsikartojantys, neaiškūs ar blogai išsifracionavę DNR fragmentai neregistruojami. Gauti duomenys buvo suvedami į dvireikšmių požymių lentelę. Į duomenų analizę buvo įtraukiami ryškūs, atsikartojantys DNR fragmentai, kurie buvo ne mažesni kaip 200 bp ir ne didesni kaip 3000 bp, kadangi dideli RAPD fragmentai dažnai būna nehomologiški, o maži blogai atsikartoja (Staub et al., 1996; Fahima et al., 1999). Kadangi kiekvieną RAPD lokusą sudaro du aleliai, tai polimorfiniais buvo laikomi tie lokusai, kurių

populiacijoje labiausiai paplitusio alelio dažnis mažesnis nei 95% (Laurentin, 2009). *Lonicera* L. genties pavyzdžių tyrimams buvo naudoti tik polimorfiniai RAPD lokusai.

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

$$GD_{xy} = 1 - 2 N_{xy} / (N_x + N_y)$$

$N_{xy}$  – x ir y augalams bendrų DNR juostų skaičius,  $N_x$  – DNR juostų skaičius, būdingas augalui x,  $N_y$  – DNR juostų skaičius, būdingas augalui y. *Lonicera* L. genties taksonų pavyzdžių giminingumas, remiantis genetiniais atstumais tarp jų, įvertintas NJ ir UPGMA grupavimo algoritmais. Naudodami TREECON v. 1.3b kompiuterinę programą (Van De Peer, De Wachter, 1994), įvertinome gautus RAPD rezultatus, apskaičiavome genetinius atstumus ir nubraižėme giminingumo medžius (dendrogramas).

Molekulinės genetinės įvairovės analizę AMOVA (angl. *Analysis of MOlecular VAriance*) atlikome naudodami GenAlEx v6.41 (angl. *Genetic Analysis in Excel*) programą (Peakall, Smouse, 2006). Šia programa apskaičiuota genetinė diferenciacija  $\Phi_{PT}$  ( $\Phi_{ST}$ ) tarp elitinių veislių ir genetinių linijų. RAPD atveju, kai analizuojami tik du vieno lokuso aleliai,  $F_{ST}$  yra identiška genetinės diferenciacijos koeficientui  $G_{ST}$  (Nei, 1979; Nybom, Bartish, 2000). Įkėlų („Bootstrap“) analizę atlikome naudodami 1000 iteracijų.



### III. REZULTATAI

#### 1. VU Botanikos sodo *Lonicera L.* kolekcijos tyrimai DNR žymenų metodais

Pradiniame darbo etape buvo ieškoma oligonukleotidinių pradmenų, tinkančių *Lonicera L.* kolekcijos genotipavimui ir *Lonicera sp.* filogenetinei analizei. Pradmenų paieška buvo vykdoma testuojant komercinius oligonukleotidinių pradmenų rinkinius (Roth, Vokietija). Pirmiausia buvo išbandyta 20 pradmenų ir įvertintas jų tinkamumas generuoti atsikartojančius polimorfinius RAPD spektrus (profilus). Su šiais pradmenimis buvo išanalizuota 40 *Lonicera sp.* genotipų. Iš dvidešimties išbandytų pradmenų vienuolika buvo pakankamai informatyvūs ir tinkami įvairaus giminingumo laipsnio sausmedžių pavyzdžiams diferencijuoti (13 lentelė).

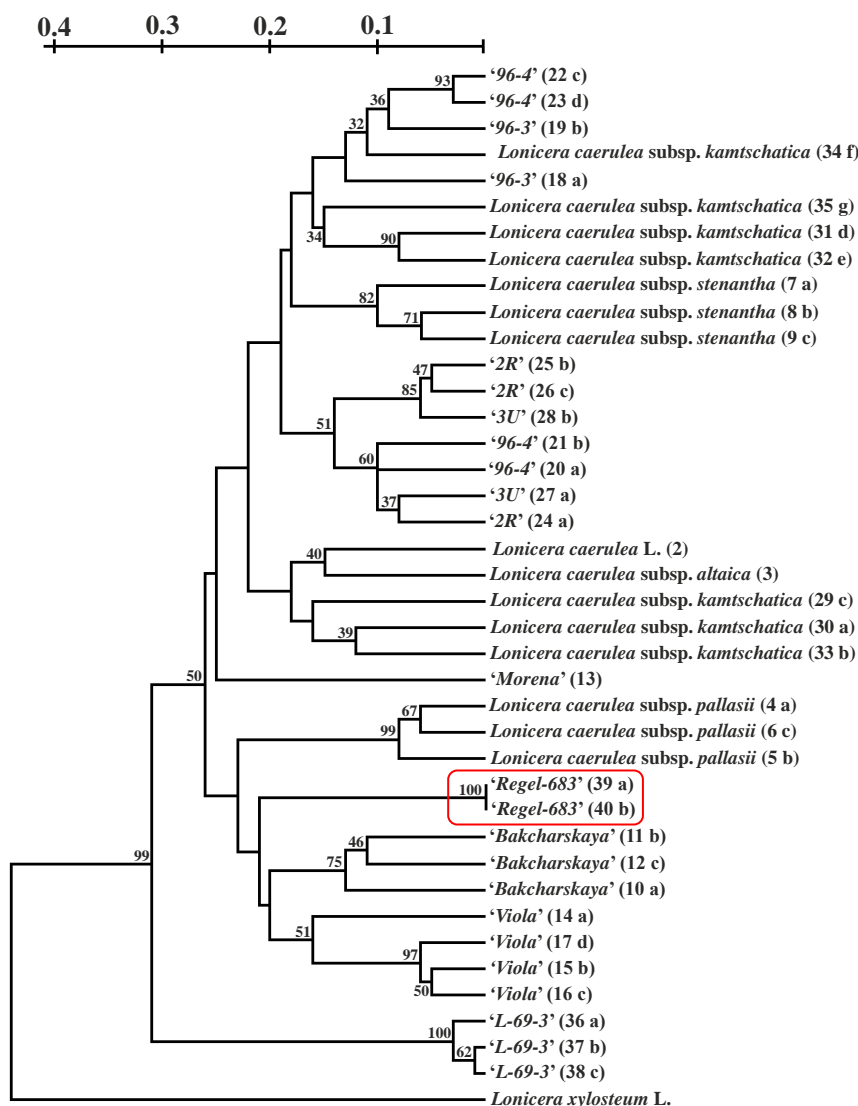
**13 lentelė.** *Lonicera L.* genties 40 pavyzdžių DNR polimorfizmas

Pradmuo	Pradmens seka 5'→3'	Nustatytų lokusų skaičius	Monomorfinių lokusų skaičius	Polimorfinių lokusų skaičius	Polimorfinių lokusų %	RAPD <sup>1</sup>	DNR fragmentų dydis (bp)
170-03	ACGGTGCCTG	11	–	11	100	18	480–1350
170-05	GAGATCCGCG	11	5	6	54,5	13	450–1500
170-08	CTGTACCCCC	8	2	6	75	16	480–2300
170-10	CAGACACGGC	10	–	10	100	24	550–1500
380-01	ACGCGCCAGG	11	2	9	81,8	22	590–2000
380-02	ACTCGGCCCC	12	1	11	91,6	14	700–2550
380-03	GGCCCCATCG	9	3	6	66,7	8	650–2500
380-06	CCCGACTGCC	10	3	7	70	18	700–2000
380-07	GGCAAGCGGG	6	–	6	100	11	890–2400
380-08	CGCACCGCAC	9	–	9	100	29	680–2100
380-09	ACGGCGGCTC	8	1	7	87,5	6	870–1950
<b>Iš viso / vid.</b>		<b>105</b>	<b>17</b>	<b>88</b>	<b>84,3 ±15,9</b>	<b>179</b>	<b>450–2550</b>

<sup>1</sup>RAPD profilių, nustatytų keturiasdešimties pavyzdžių grupėje naudojant tam tikrą pradmenį, skaičius

Buvo nustatytas 84,3% DNR polimorfizmas, genetiniai atstumai tirtų pavyzdžių grupėje buvo nuo 0,00 iki 0,36. Naudojant šių atstumų matricą buvo nubraižyta UPGMA dendrograma, kuri rodo tirtų genotipų giminingumo laipsnį (5 pav.) (Naužemys et al., 2007). *Lonicera caerulea L.* pavyzdžiai sudaro atskirą klasterį ir ryškiai skiriasi nuo paprastojo sausmedžio *L.*

*xylosteum* L. pavyzdžio. Iš gautos filogenetinės dendrogramos matyti aiškus tiriamų pavyzdžių susiskirstymas į klasterius, kurie gerai atspindi jų sistematinį rangą. Buvo genotipuoti visi tirti sausmedžio pavyzdžiai, išskyrus du ‘Regel-683’ pavyzdžius, kurie, kaip galime manyti, yra to paties genotipo klonai.



**5 pav.** *Lonicera* L. genties 40 pavyzdžių genetinė įvairovė pagal RAPD lokusus. Dendrograma sudaryta UPGMA metodu, naudojant Nei ir Li genetinių atstumų matricą. Įkėlų vertės (%) gautos atlikus 1000 iteracijų

Kaip matyti iš penktame paveiksle pateiktos dendrogramos, veislė ‘Morena’ pasižymi savitumu. Ši veislė kilusi natūralios hibridizacijos būdu iš Kamčiatkos ir Primorės regiono augalų, tačiau dendrogramoje ji nepateko į *L. caerulea* L. subsp. *kamtschatica* klasterį, nors ir grupavosi greta

jo. Įvertinus tirtų sausmedžio pavyzdžių įvairovę pagal keletą morfologinių (krūmo formą, uogų išvaizdą) ir fenologinių požymių (derėjimo laiką), visi pavyzdžiai buvo suskirstyti į tris grupes (14 lentelė). Šie sausmedžio pavyzdžiai nepasižymėjo didele morfologine įvairove.

Pradiniai tyrimo rezultatai parodė, kad RAPD metodu galima efektyviai genotipuoti sausmedžio kolekcinis pavyzdžius, nes DNR polimorfizmas gerokai viršija jų morfologinę įvairovę.

**14 lentelė.** *Lonicera* L. genties keturiasdešimties pavyzdžių trumpas aprašymas

Nr.	Pavadinimas ir aprašas	Tiriamąjį krūmą charakteristika	Gavimo vieta
Sekcija <i>Coeloxysteum</i> Rehd., posekcija <i>Ochranthae</i> Zab.			
<b>I grupė.</b>			
1	<i>Lonicera xylostem</i> L. Paplitęs Europoje, Rusijoje (V. Sibiras)	Aukštis apie 3 m, uogos raudonos, nevalgomos, subręsta vėlai vasarą	LTU, savaiminis
Sekcija <i>Isaka</i> Rehd., posekcija <i>Caerulea</i> Rehd.			
<b>II grupė.</b> Krūmų aukštis apie 2 m, labai anksti žydi, nokina mėlynas uogas, trumpas generatyvinių pumpurų ramybės laikotarpis, paplitę šiauriniuose Europos regionuose ir Šiaurės Amerikoje			
2	<i>Lonicera caerulea</i> L. Paplitęs šiaurinėse žemynų dalyse, smulkūs lapai, žiedai ir uogos	Krūmo aukštis apie 1,5 m, verpstiška uogos forma 22x9 mm, 0,6 g, ankstyvos	RUS, Meshcherskoe Exper St, 1997
3	<i>L. caerulea</i> L. subsp. <i>altaica</i> Pall. Paplitęs R. Europoje, Rusijoje (V. Sibiras), Mongolijoje, Kinijos kalnuose. Atsparus sausrui ir šalčiui	Krūmo aukštis apie 1,5 m, ovalios uogos 16x10 mm, 0,8 g, labai ankstyvos	RUS, St. Petersburg, VIR**, 1997
4, 5, 6	<i>L. caerulea</i> L. subsp. <i>pallasii</i> (Ledeb.) Browicz. Paplitęs Š. Europoje, Rusijoje (Sibire). Lapai platus, atsparūs šalčiui	Krūmo aukštis apie 1,1 m, ovalios uogos 15x9 mm, 0,7 g, anksti noksta /a, b, c/*	RUS, St. Petersburg, VIR, 1997
7, 8, 9	<i>L. caerulea</i> L. subsp. <i>stenantha</i> (Pojark.) Skvortsov. Paplitęs Rusijoje (V. Sibiras), Centrinėje Azijoje, Irane, Indijoje. Smulkūs lapai, žiedai ir uogos	Krūmo aukštis apie 2,0 m, ovalios uogos 20x10 mm, 0,9 g, anksti bręsta /a, b, c/	RUS, St. Petersburg, VIR, 1997
10,11, 12	‘ <i>Bakcharskaya</i> ’ išvesta Rusijoje, atrinkus sėjinukus	Krūmo aukštis apie 1,5 m, lašo formos uogos 20x12 mm, 0,8g, vidutinio ankstyvumo /a, b, c/	RUS, St. Petersburg, VIR, 1996
13	‘ <i>Morena</i> ’ išvesta Rusijoje, natūralios hibridizacijos būdu kryžminant elitines formas iš Kamčiatkos ir Primorės krašto	Krūmo aukštis apie 1,5 m, ašočio formos uogos 30x13 mm, 1,4 g, vidutinio ankstyvumo	RUS, St. Petersburg, VIR, 1997
14	‘ <i>Viola</i> ’ /a/ išvesta Rusijoje, kryžminant veisles ‘ <i>Leningradskii Velikan</i> ’ x ‘ <i>Sayanskaya 322</i> ’	Krūmo aukštis apie 1,5 m, cilindro formos uogos 23x10 mm, 1,7 g, vidutinio ankstyvumo	RUS, St. Petersburg, VIR, 1997
15, 16, 17	‘ <i>Viola</i> ’ /b, c, d/ išvesta Rusijoje, kryžminant veisles ‘ <i>Leningradskii Velikan</i> ’ x ‘ <i>Sayanskaya 322</i> ’ veisles	Krūmo aukštis apie 1,5 m, ovalios uogos 23x11 mm, 1,0 g, vidutinio ankstyvumo	RUS, St. Petersburg, VIR, 1996

### 14 lentelės tęsinys

18, 19	‘96-3’ LTU HBU, sėjinukai	Krūmo aukštis apie 1,0 m, ašočio formos uogos 27x11 mm, 1,1 g, vidutinio ankstyvumo /a, b/	LTU, Vilnius, HBU, 1996
20, 21, 22, 23	‘96-4’ LTU HBU, sėjinukai	Krūmo aukštis apie 1,0 m, ašočio formos uogos 22x12 mm, 1,0 g, anksti bręsta /a, b, c, d/	LTU, Vilnius, HBU, 1996
24, 25, 26	‘2R3’ LTU HBU, sėjinukai	Krūmo aukštis apie 1,5 m, ašočio formos uogos 17x11 mm, 1,2 g, anksti bręsta /a, b, c/	LTU, Vilnius, HBU, 1996
27, 28	‘3U’, LTU HBU, sėjinukai	Krūmo aukštis apie 1,5 m, ašočio formos uogos 30x11 mm, 1,6 g, anksti bręsta /a, b/	LTU, Vilnius, HBU, 1996
<b>III grupė.</b> Krūmų aukštis apie 0,8 m, dideli lapai, vėliau žydi ir vėliau subrandina mėlynas uogas, ilgas generatyvinių pumpurų ramybės laikotarpis. Paplitę Rusijoje: Arktinėje ir Vakarų Sibiro dalyje, Tolimuosiuose Rytuose, Kamčiatkos pusiasalyje, Kurilų saluose, Sachaline ir Japonijoje			
29	<i>Lonicera caerulea</i> L. subsp. <i>kamtschatica</i> (Sevast.) Pojark.	krūmo aukštis apie 0,9 m, ovalios uogos 23x12 mm, 1,0 g, vėlai bręsta /c/	LVA, Salaspils, HBA, 1991
30, 31, 32	<i>Lonicera caerulea</i> L. subsp. <i>kamtschatica</i> (Sevast.) Pojark.	krūmo aukštis apie 0,6 m, ovalios uogos 17x12 mm, 1,4 g, vėlai bręsta /a, d, e/	CZE, Pruhonice, HBA, 1997
33, 34, 35	<i>Lonicera caerulea</i> L. subsp. <i>kamtschatica</i> (Sevast.) Pojark.	krūmo aukštis apie 1,2 m, ovalios uogos 16x10 mm, 0,8 g, vėlai bręsta /b, f, g/	LVA, Kalsnava, Arb, 1997
36, 37, 38	‘L-69-3’	krūmo aukštis apie 0,6 m, ovalios uogos 18x13 mm, 1,1 g, vėlai bręsta /a, b, c/	RUS, St. Petersburg, VIR, 1997
39, 40	‘Regel-683’ Paplitęs Rusijoje, Kurilų salose, sėjinukas	krūmo aukštis apie 0,5 m, apvalios uogos 15x12 mm, 1,0 g, vėlai bręsta /a, b/	RUS, St. Petersburg, VIR, 199

\* /a, b, c, ir t.t/ – to paties pavadinimo augalai dendrogramoje,

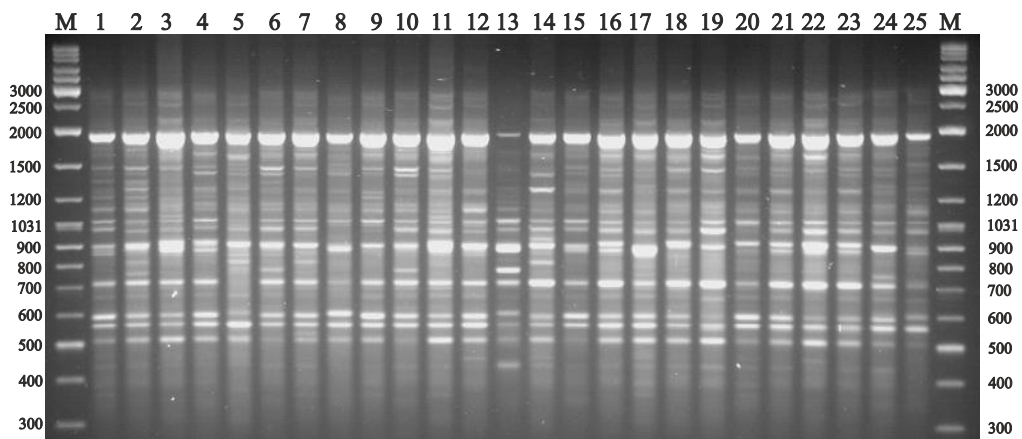
\*\* VIR – N. I. Vavilovo Rusijos augalininkystės institutas (St. Petersburgas, Rusija)

Kitame darbo etape buvo išbandyta papildomai dar 30 naujų pradmenų (10 a, b lentelė). Šių tyrimų pagrindu nustatytas optimalus dvylikos pradmenų rinkinys (15 lentelė). Su šiais pradmenimis buvo genotipuota šimtas skirtingo taksonominio statuso ir selekcinės vertės sausmedžio kolekcijos pavyzdžių, įskaitant rūšis, porūšius, veisles ir genetines linijas, (5, 6, 7, 8 lentelės).

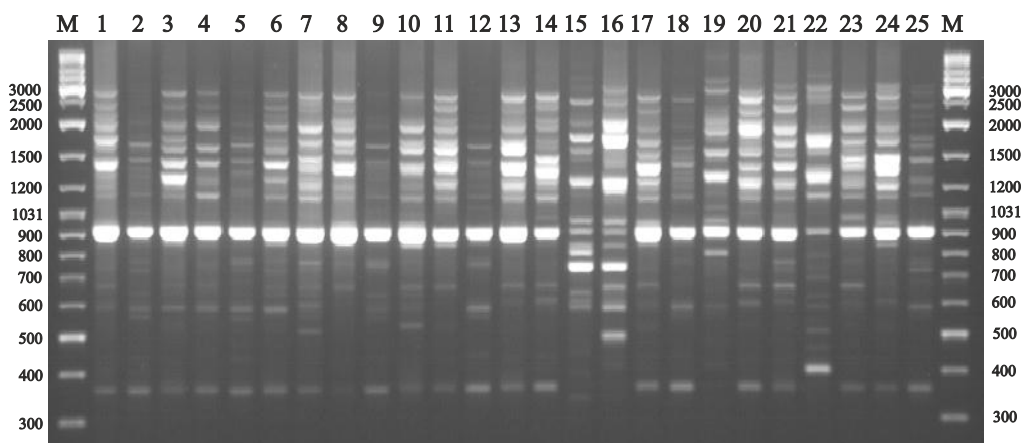
Atlikus RAPD analizę su minėtais pradmenimis, buvo atrinkti 149 RAPD lokusai (15 lentelė), kurie patikimai atsikartojo trijuose bandymuose. Buvo nustatyta, kad 88,1% šių lokusų (juostų) polimorfiški. Monomorfinės juostos nebuvo analizuojamos. Tolimesnei analizei buvo pasirinktos aiškiai matomos polimorfinės RAPD juostos, kurių dydis svyravo nuo 270 bp iki 2480 bp (15 lentelė). Šeštame paveiksle pavaizduoti tipškiausi RAPD spektrai, gauti su 380–07 ir A–11 pradmenimis.

**15 lentelė.** *Lonicera* L. genties 100 pavyzdžių genominės DNR polimorfizmas

Pradmuo	Pradmens seka 5'→3'	Nustatytų lokusų skaičius	Monomorfinių lokusų skaičius	Polimorfinių lokusų skaičius	Polimorfinių lokusų %	DNR fragmentų dydis (bp)
170-08	CTGTACCCCC	19	5	14	73,7	490 – 2100
170-10	CAGACACGGC	15	1	14	93,3	470 – 1800
380-01	ACGCGCCAGG	14	2	12	85,7	490 – 1700
380-02	ACTCGGCCCC	10	–	10	100	510 – 1800
380-07	GGCAAGCGGG	16	2	14	87,5	560 – 1960
A-01	CAGGCCCTTC	12	1	11	91,7	700 – 2300
A-02	TGCCGAGCTG	12	1	11	91,7	580 – 2450
A-03	AGTCAGCCAC	16	6	10	62,5	680 – 2480
A-04	AATCGGGCTG	12	–	12	100	560 – 1900
A-05	AGGGGTCTTG	13	–	13	100	490 – 2100
A-09	GGGTAACGCC	18	4	14	77,8	270 – 1180
A-11	CAATCGCCGT	15	1	14	93,3	370 – 1400
<b>Iš viso / vid.</b>		<b>172</b>	<b>23</b>	<b>149</b>	<b>88,1 ±11,6</b>	<b>270 – 2480</b>



**A**



**B**

**6 pav.** *Lonicera* L. genties individų RAPD analizė. **A** – *Lonicera caerulea* L. veislių pavyzdžių analizė su 380-07 pradmeniu: 1-2 – 'Narymskaya', 3-4 – 'Desertnaya', 5 – 'Salyut', 6 – 'Sinyaya Ptitsa', 7 – 'Lazurnaya', 8 – 'Altayskaya', 9 – 'Ranyaya', 10 – 'Start', 11 – 'Fialka', 12 – 'Roksana', 13 – 'Parabelskaya', 14 – 'Morena', 15 – 'Volshebница', 16 – 'Velikan', 17 – 'Chernichka', 18 – 'Goluboje Vereteno', 19 – 'Obilnaya', 20 – 'Lyulia', 21 – 'Valentina', 22 – 'Kuvshinovidnaya', 23 – 'Bugrystaya', 24 – 'Zolushka', 25 – 'Regel - 683';

**B** – *Lonicera caerulea* L. porūšių pavyzdžių analizė su A–11 pradmeniu: 1-6 – subsp. *kamtschatica*, 7-10 – subsp. *stenantha*, 11-13 – subsp. *pallasii*, 14 – subsp. *altaica*, ir *Lonicera* L. genties taksonų pavyzdžių: 15 – *L. xylosteum* L., 16 – *L. chrysantha* Turcz. ex Ledeb., 17 – *L. venulosa* (Maxim.) Vorosh., 18 – *L. emphylocalyx* (Maxim.) Nakai, 19 – *L. orientalis* Lam., 20 – *L. boczkarnikowae* Plekhanova, 21 – *L. caerulea* L., 22 – *L. microphyla* Willd. ex Freyn., 23-25 – *L. edulis* Turcz. ex Freyn. M – DNR fragmentų dydžio standartas „GeneRuler™ DNA Ladder Mix“ (100-10000 bp)

Kadangi tirtieji pavyzdžiai VU Botanikos sodo kolekcijoje reprezentuoja rūšis, porūšius, veisles ir genetines linijas, tai, panaudojus 12 atrinktų pradmenų, buvo įvertinta genetinė įvairovė ir šiose augalų grupėse (16 lentelė).

**16 lentelė.** VU Botanikos sodo *Lonicera* L. kolekcijos rūšių, porūšių, veislių ir genetinių linijų genetinė įvairovė

Pradmuo	Rūšys		Porūšiai		Veislės		Genetinės linijos	
	PL	P	PL	P	PL	P	PL	P
170–08	14	100	13	92,8	11	78,6	12	85,7
170–10	14	100	13	92,8	13	92,8	14	100
380–01	12	100	10	83,3	11	91,7	7	58,3
380–02	10	100	7	70	8	80	8	80
380–07	14	100	10	71,4	11	78,6	11	78,6
A–01	10	91	8	72,7	11	100	10	91
A–02	10	91	6	54,5	6	54,5	6	54,5
A–03	10	100	5	50	6	60	6	60
A–04	11	91,7	6	50	10	83,3	7	58,3
A–05	13	100	6	46,2	12	92,3	11	84,6
A–09	14	100	10	71,4	11	78,6	10	71,4
A–11	14	100	11	78,6	11	78,6	9	64,3
Σ / vid. %	<b>146</b>	<b>97,8 ±3,9</b>	<b>105</b>	<b>69,5 ±16,3</b>	<b>121</b>	<b>80,7 ±13,2</b>	<b>111</b>	<b>73,9 ±14,9</b>

PL – polimorfiniai lokusai; P – DNR polimorfizmas (%)

Didžiausias DNR polimorfizmas (97,8%), nustatytas rūšis reprezentuojančiuose pavyzdžiuose, mažiausias (69,5%) – porūšius atstovaujančiuose pavyzdžiuose. Veislių ir genetinių linijų grupėse DNR polimorfizmas buvo atitinkamai 73,9% ir 80,7%.

### 1.1. Sausmedžio genetinių linijų galimybių įvertinimas veislių genetinei bazei praplėsti

Siekiant įvertinti melsvauogio sausmedžio genetinių linijų potencialą genetinei veislių įvairovei didinti, buvo ištirtos 32 genetinės linijos ir 19 elitinių veislių. Šių genotipų genomine DNR buvo tiriama, naudojant 12

informatyvių RAPD pradmenų, kurie buvo atrinkti ankstesniuose eksperimentuose. Ištyrus 51 genotipą, šioje tyrimų grupėje buvo nustatytos 149 RAPD juostos, iš kurių 124 (83,2%) buvo polimorfinės (17 lentelė).

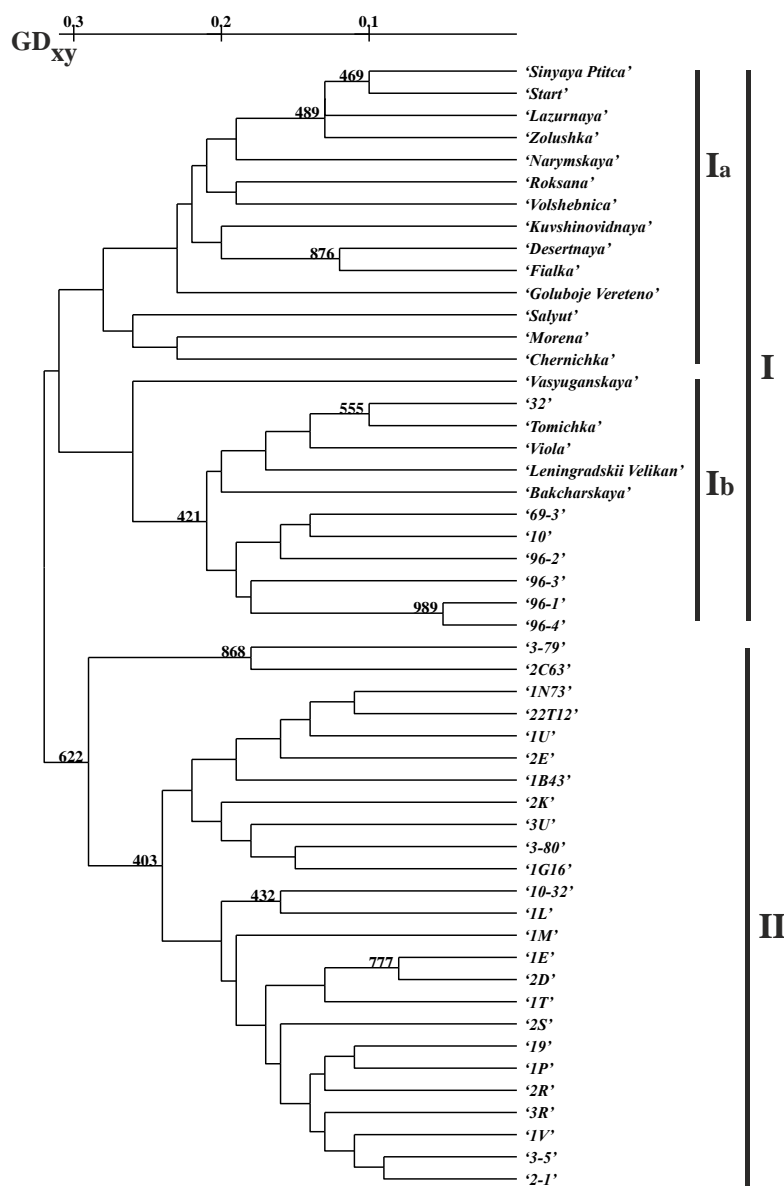
Pagausintų juostų skaičius vienam pradmeniui buvo nuo 10 iki 14. Su vienu pradmeniu nustatyta vidutiniškai 10,3 polimorfinių juostų. Šių, analizei panaudotų, DNR fragmentų dydis buvo 270-2500 bp ribose. Genetiniai atstumai ( $GD_{xy}$ ) tarp tirtų genotipų kito nuo 0,054 iki 0,479. Vidutinis genetinis atstumas šioje genotipų imtyje buvo  $0,283 \pm 0,069$  (1 priedas). Kai veislės ir genetinės linijos buvo tiriamos atskirai,  $GD_{xy}$  reikšmė veislių grupėje buvo nuo 0,098 iki 0,453 (2 priedas), o genetinių linijų grupėje – nuo 0,055 iki 0,443 (3 priedas).

**17 lentelė.** *L. caerulea* L. genetinių linijų ir elitinių veislių DNR polimorfizmas

Pradmuo	Pradmens seka 5'→3'	Nustatytų lokusų skaičius	Monomorfinių lokusų skaičius	Polimorfinių lokusų skaičius	Polimorfinių lokusų %	DNR fragmentų dydis (bp)
170-08	CTGTACCCCC	14	1	13	92,8	490 – 2100
170-10	CAGACACGGC	14	–	14	100	470 – 1800
380-01	ACGCGCCAGG	12	3	9	75	490 – 1700
380-02	ACTCGGCCCC	10	–	10	100	510 – 1800
380-07	GGCAAGCGGG	14	2	12	85,7	560 – 1960
A-01	CAGGCCCTTC	11	–	11	100	700 – 2300
A-02	TGCCGAGCTG	11	5	6	54,5	580 – 2450
A-03	AGTCAGCCAC	10	4	6	60	680 – 2480
A-04	AATCGGGCTG	12	5	7	58,3	560 – 1900
A-05	AGGGGTCTTG	13	1	12	92,3	490 – 2100
A-09	GGGTAACGCC	14	1	13	92,8	270 – 1180
A-11	CAATCGCCGT	14	3	11	78,5	370 – 1400
<b>Iš viso / vid.</b>		<b>149</b>	<b>25</b>	<b>124</b>	<b>83,2 ±17</b>	<b>270 – 2480</b>

Tirtų veislių ir genetinių linijų tarpusavio giminingumas buvo įvertintas UPGMA metodu (7 pav.).

UPGMA analizė suskirstė visus tirtus sausmedžio genotipus į dvi dideles grupes. Pirmąją (I) grupę sudaro visos veislės ir septynios genetinės linijos ('32', 'L-69-3', '10', '96-2', '96-3', '96-1', '96-4'), antrąją (II) – tik genetinės linijos. Norėdami įvertinti šios analizės objektyvumą ir informatyvumą, palyginome veislių tarpusavio genetinį giminingumą, nustatytą genetinių atstumų pagrindu UPGMA metodu, su turima informacija apie konkrečių veislių genealogiją (7 lentelė).



**7 pav.** *L. caerulea* L. veislių ir genetinių linijų pavyzdžių genetinė įvairovė pagal RAPD lokusus. Dendrograma sudaryta UPGMA metodu, naudojant Nei ir Li genetinių atstumų matricą. Įkėlų vertės gautos atlikus 1000 iteracijų

Pirmosios (I) grupės Ia pogrupį sudaro 14 veislių, kai kurios iš jų, kaip rodo genealoginiai duomenys, yra labai artimai giminiškos. Pirmiausia tai pasakytina apie veislę ‘Start’ ir jos palikuonis. Iš jos yra kilę trys veislės – ‘Goluboje Vereteno’, ‘Sinyaya Ptitsa’ ir ‘Lazurnaya’, kurios taip pat buvo įtrauktos į mūsų tyrimą. Jų giminingumas atsispindi ir dendrogramoje – visos grupuojasi kartu. Ypač artimu giminingumu pagal molekulinis žymenis pasižymi ‘Start’ ir dvi iš jos kilę veislės – ‘Sinyaya Ptitsa’ ( $GD_{xy} = 0,098$ ) bei



‘*Lazurnaya*’ ( $GD_{xy} = 0,143$ ). Kitos dvi tarpusavyje giminiškos veislės ‘*Fialka*’ ir ‘*Roksana*’ taip pat patenka į tą patį dendrogramos klasterį ( $GD_{xy} = 0,258$ ). Veislė ‘*Fialka*’ yra kildinama iš veislės ‘*Roksana*’ laisvo apdulkinimo sėjinukų. Ib pogrupį sudaro 12 genotipų, iš kurių penki – elitinės veislės, o likusieji septyni – genetinės linijos. UPGMA dedrograma rodo artimą veislių ‘*Viola*’ ir ‘*Leningradskii Velikan*’ giminingumą ( $GD_{xy} = 0,168$ ).

Kaip rodo genealoginiai duomenys, ‘*Viola*’ yra ‘*Leningradskii Velikan*’ ir ‘*Sajanskaya-322*’ hibridas. Dar dvi tarpusavyje giminiškos veislės ‘*Vasyuganskaya*’ ir ‘*Tomichka*’ ( $GD_{xy} = 0,226$ ) taip pat patenka į tą patį Ib pogrupį.

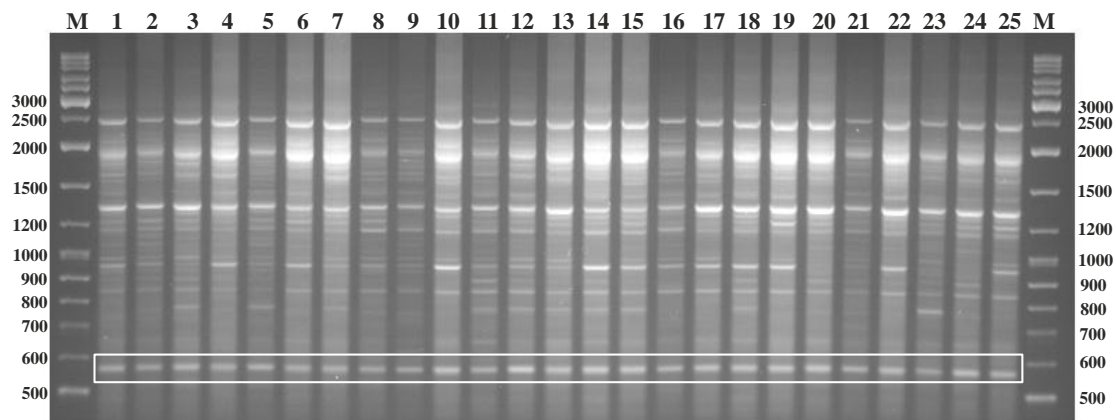
Molekulinės genetinės įvairovės analizė (AMOVA) parodė, kad tarp ištirtų genetinių linijų ir veislių yra akivaizdi genetinė diferenciacija ( $\Phi_{PT} = 0,189$ ,  $P \leq 0,001$ ) (18 lentelė).

**18 lentelė.** *L. caerulea* L. veislių ir genetinių linijų AMOVA suvestinė

Įvairovės pasiskirstymas	DF*	Kvadratų suma	Kitimas %	$\Phi_{PT}^{**}$
Tarp grupių	1	109,183	19,0	0,189
Viduje grupių	49	815,327	81,0	
Bendrai	50	924,510	100	

\*DF – laisvės laipsniai (angl. *Degres of Freedom*); \*\* –  $P \leq 0,001$

Skirtumus tarp veislių ir genetinių linijų lemia ne tik alelių dažnių skirtumai, bet ir kiekvienai grupei saviti lokusai. Iš 124 RAPD lokusų vienuolika (170–08<sub>490/570/890</sub>; 170–10<sub>950/1300</sub>; 380–01<sub>530</sub>; 380–02<sub>1500</sub>; A–09<sub>680/700/1031</sub>; A–11<sub>790</sub>) buvo būdingi tik genetinėms linijoms ir šeši (380–01<sub>490</sub>; A–09<sub>300/560/790</sub>; A–11<sub>510/600</sub>) – veislėms. Ištyrus sausmedžio 51 pavyzdžio RAPD spektrus, nustatytos ir 25 monomorfinės juostos (17 lentelė). Monomorfinės juostos, nustatytos naudojant pradmenį A–02, pavyzdys pateiktas aštuntame paveiksle (pažymėta stačiakampiu). Ši juosta gerai atsikartojo ir buvo stebima *L. caerulea* L. pavyzdžiuose.



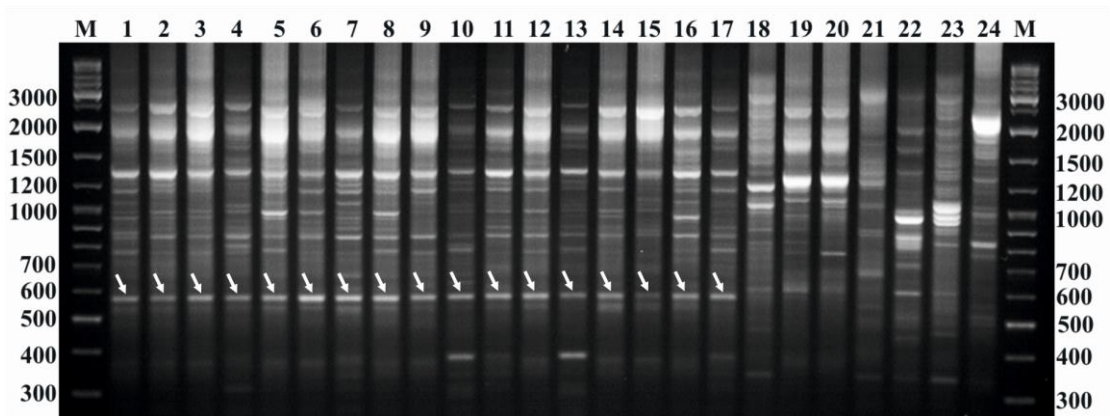
**8 pav.** Melsvaugio sausmedžio (*Lonicera caerulea* L.) genetinių linijų individų RAPD analizė, naudojant A–02 pradmenį. Skaičiai 1-25 – tirtų augalų pavyzdžių numeriai: 1 – ‘2R’, 2 – ‘3-5’, 3 – ‘2-I’, 4 – ‘3-79’, 5 – ‘3R’, 6 – ‘3U’, 7 – ‘3-80’, 8 – ‘10-32’, 9 – ‘1L’, 10 – ‘1G16’, 11 – ‘1E’, 12 – ‘2D’, 13 – ‘2C63’, 14 – ‘1B43’, 15 – ‘2K’, 16 – ‘2S’, 17 – ‘19’, 18 – ‘1N73’, 19 – ‘22T12’, 20 – ‘1U’, 21 – ‘1V’, 22 – ‘2E’, 23 – ‘1T’, 24 – ‘1M’, 25 – ‘1P’. M – DNR fragmentų dydžio standartas „GeneRuler™ DNA Ladder Mix“ (100-10000 bp)

Norėdami nustatyti, ar tarp monomorfinių RAPD juostų nėra tokių, kurios būtų būdingos tik *L. caerulea* rūšiai, tiriamų genotipų grupę praplėtėme *L. caerulea* keturių porūšių (*L. caerulea* L. subsp. *kamtschatica* Sevest., *L. caerulea* L. subsp. *stenantha* Pojark., *L. caerulea* L. subsp. *altaica* (Pall.), *L. caerulea* L. subsp. *pallasii* (Ledeb.) Browicz), ir dvylikos rūšių (*L. caerulea* L., *L. alpigena*, *L. vesicaria* Kom., *L. praeflorens* Lam., *Lonicera x bella* f. *candida* Zabel, *L. xylosteum* L., *L. chrysantha* Turcz. ex Ledeb., *L. venulosa* (Maxim.) Worosh., *L. edulis* Turcz. ex Freyn, *L. emphylocalyx* (Maxim.) Nakai, *L. boczkarnikowae* Plekhanova, *L. orientalis* Lam.) pavyzdžiais ir atlikome jų RAPD analizę su tais pačiais pradmenimis.

Iš analizuotų 149 RAPD juostų 96,6% buvo polimorfinės (19 lentelė). Vidutinis genetinis atstumas porūšių ir rūšių grupėje buvo  $0,453 \pm 0,148$ , mažiausia jo reikšmė – 0,188, o didžiausia – 0,708 (4 priedas). Šiuo atveju buvo nustatytas didesnis DNR polimorfizmas palyginti su veislių ir genetinių linijų grupe (17 lentelė). Palyginę visų pavyzdžių RAPD profilius, mes nustatėme vieną RAPD juostą (apie 570 bp), būdingą visiems mūsų tirtiems ir *L. caerulea* rūšiai priskiriamams pavyzdžiams (9 pav.). Šis rūšiai savitas žymuo buvo nustatytas su pradmeniu Roth A–02, todėl pavadintas A02<sub>570</sub>.

**19 lentelė.** *Lonicera* L. genties 12 rūšių ir *L. caerulea* L. 4 porūšių DNR polimorfizmas

Pradmuo	Pradmens seka 5'→3'	Nustatytų lokusų skaičius	Monomorfinių lokusų skaičius	Polimorfinių lokusų skaičius	Polimorfinių lokusų %	DNR fragmentų dydis (bp)
170-08	CTGTACCCCC	14	–	14	100	490 – 2100
170-10	CAGACACGGC	14	1	13	92,8	470 – 1800
380-01	ACGCGCCAGG	12	–	12	100	490 – 1700
380-02	ACTCGGCCCC	10	–	10	100	510 – 1800
380-07	GGCAAGCGGG	14	–	14	100	560 – 1960
A-01	CAGGCCCTTC	11	1	10	90,9	700 – 2300
A-02	TGCCGAGCTG	11	–	11	100	580 – 2450
A-03	AGTCAGCCAC	10	–	10	100	680 – 2480
A-04	AATCGGGCTG	12	1	11	91,7	560 – 1900
A-05	AGGGGTCTTG	13	–	13	100	490 – 2100
A-09	GGGTAACGCC	14	2	12	85,7	270 – 1180
A-11	CAATCGCCGT	14	–	14	100	370 – 1400
<b>Iš viso / vid.</b>		<b>149</b>	<b>5</b>	<b>144</b>	<b>96,6 ±5,1</b>	<b>270 – 2480</b>



**9 pav.** Tetraploidinei polimorfinei *Lonicera caerulea* L. rūšiai savitas RAPD žymuo (pažymėtas rodykle) nustatytas su Roth A-02 pradmeniu. 1 – *L. caerulea* L. subsp. *kamtschatica* (Pojark.), 2 – *L. caerulea* L. subsp. *stenantha* (Pojark.), 3 – *L. caerulea* L. subsp. *pallasii* (Ledeb.), 4 – *L. caerulea* L. subsp. *altaica* (Pall.), 5 – ‘*Desertnaya*’, 6 – ‘*Salyut*’, 7 – ‘*Sinyaya Ptitsa*’, 8 – ‘*Fialka*’, 9 – ‘*Morena*’, 10 – ‘*Viola*’, 11 – ‘*Vasyuganskaya*’, 12 – ‘*Tomichka*’, 13 – ‘*Leningradskii Velikan*’, 14 – *Lonicera caerulea* L., 15 – *L. edulis* Turcz. ex Freyn, 16 – *L. bozchkarnikowae* Plekhanova, 17 – *L. emphylocalyx* (Maxim.) Nakai, 18 – *L. chrysantha* Turcz. ex Ledeb., 19 – *L. xylosteum* L., 20 – *L. orientalis* Lam., 21 – *L. vesicaria* Kom., 22 – *L. alpigena* L., 23 – *L. x bella* f. *candida* Zabel, 24 – *L. praeflorens* Batalin. M – DNR fragmentų dydžio standartas „GeneRuler™ DNA Ladder Mix“ (100-10000 bp)

Siekdami išsiaiškinti jo molekulinę-genetinę prigimtį, analizavome to paties dydžio DNR fragmentus, atitinkančius A02<sub>570</sub> juostą trijų genotipų (*L. caerulea* L., *L. caerulea* L. subsp. *kamtschatica* (Pojark.) ir *L. caerulea* L. subsp. *stenantha* (Pojark.) RAPD profiliuose. Šie DNR fragmentai buvo klonuoti į pTZ57R/T vektorių. Atlikus klonuotų fragmentų sekoskaitą paaiškėjo, kad jie visi yra to paties dydžio (568 bp). Vis dėlto, buvo nustatytas

ir DNR sekos polimorfizmas (apie 3,2%). Ieškodami homologiškų sekų BLAST įrankiu GenBank<sup>®</sup> duomenų bazėje, panašių sekų neaptikome.

Panaudojus A02<sub>570</sub> lokuso sekoskaitos duomenis (10 pav.), buvo sukurti du pradmenys – A02<sub>570D</sub> (5'ATGTTGGGCCTGTCTGATGTAG3') ir A02<sub>570R</sub> (5'TGCCGAGCTGTTGGATGA3'), komplementarūs klonuoto DNR fragmento galams. Sukurtų pradmenų pagalba norėjome paversti RAPD A02<sub>570</sub> žymenį patikimesniu ir patogesniu SCAR žymeniu. Tačiau, kaip matyti vienuoliktame paveiksle, toks RAPD žymens pavertimas į SCAR pakeitė pradinį DNR polimorfizmą. 568 bp DNR fragmentas buvo stebimas ne tik *L. caerulea* L. rūšies atstovuose, bet ir visuose tirtuose pavyzdžiuose.

Gautas SCAR fragmentų sekas (10 pav.) užregistravome NCBI instituto pagrindinės sekų duomenų bazės GenBank<sup>®</sup> GSS (angl. *Genome Survey Sequences*) skyriuje trumpų sekų duomenų bazėje. Identifikavimo numeriai, kurie buvo suteikti šioms sekoms, ir prieiga prie jų per NCBI duomenų bazę pateikta dvidešimtoje lentelėje.

**20 lentelė.** *Lonicera caerulea* L. pavyzdžių sekų registracijos NCBI duomenų bazėje numeriai

Nr.	Pavyzdžiai	Pasiekimo kodas*	GenInfo (gi) identifikatorius**
1	<i>Lonicera caerulea</i> L.	GS928137.1	GI295413442
2	<i>Lonicera caerulea</i> subsp. <i>steantha</i>	GS928138.1	GI295413443
3	<i>Lonicera caerulea</i> subsp. <i>kamtschatica</i>	GS928139.1	GI295413444

\* – GenBank<sup>®</sup> pasiekimo kodas ir versija

\*\* – NCBI GenInfo (gi) identifikatorius, suteikiamas visoms sekoms, apdorotoms *Entrez* duomenų bazėje (DDBJ/EMBL/GenBank<sup>®</sup>)

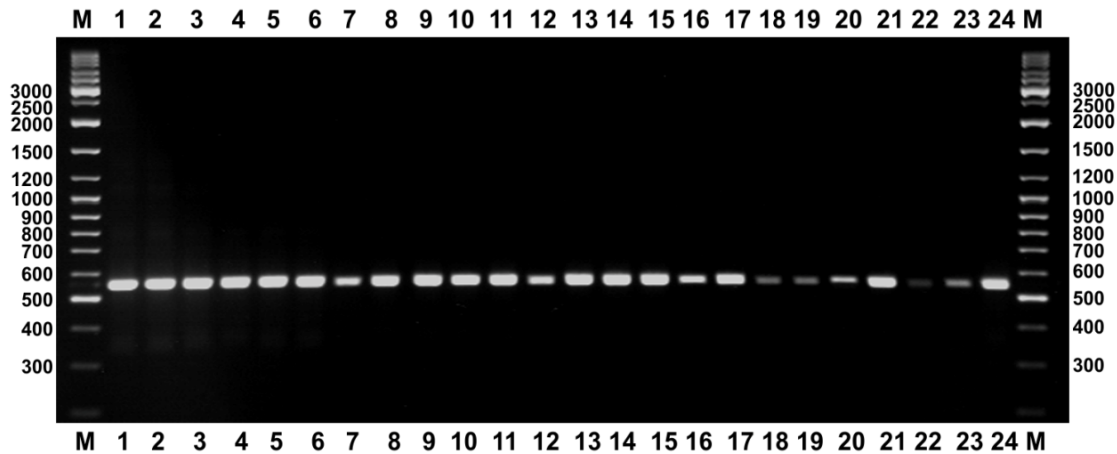
Lygiagrečiai buvo tiriamos ir perspektyviausių genetinių linijų ūkinės savybės, kurias palyginome su veislių-standartų atitinkamomis charakteristikomis. Atlikę trejų metų duomenų analizę, įvertinome uogų dydį ir cheminę sudėtį (21 lentelė). Uogų cheminė sudėtis nustatyta Lietuvos valstybinio augalų veislių tyrimo centro Augalų veislių kokybės vertinimo laboratorijoje.

1	C 541	C 421	C 361	C 301	C 241	C 181	C 121	C 61	1
2	H 482	H 422	A 362	C 302	A 242	A 182	C 122	C 62	2
3	H 483	H 423	A 363	C 303	C 243	A 183	C 123	A 63	3
4	C 484	C 424	H 364	H 304	C 244	H 184	C 124	C 64	4
5	H 485	H 425	C 365	A 305	A 245	H 185	H 125	A 65	5
6	C 486	H 426	H 366	C 306	A 246	H 186	H 126	A 66	6
7	C 487	H 427	C 367	C 307	C 247	H 187	H 127	C 67	7
8	H 488	H 428	H 368	H 308	C 248	H 188	C 128	C 68	8
9	H 489	H 429	H 369	C 309	H 249	C 189	C 129	H 69	9
10	C 490	C 430	H 370	H 310	C 250	A 190	C 130	C 70	10
11	H 491	H 431	H 371	C 311	C 251	A 191	C 131	C 71	11
12	H 492	H 432	C 372	C 312	A 252	H 192	C 132	A 72	12
13	A 493	H 433	A 373	A 313	C 253	C 193	A 133	C 73	13
14	H 494	H 434	C 374	C 314	H 254	H 194	C 134	C 74	14
15	C 495	C 435	C 375	C 315	A 255	C 195	C 135	C 75	15
16	A 496	H 436	H 376	C 316	H 256	H 196	A 136	H 76	16
17	C 497	H 437	C 377	H 317	H 257	H 197	C 137	C 77	17
18	C 498	C 438	C 378	C 318	H 258	C 198	C 138	C 78	18
19	C 499	A 439	H 379	C 319	C 259	C 199	H 139	H 79	19
20	C 500	C 440	H 380	A 320	C 260	H 200	C 140	C 80	20
21	H 501	C 441	C 381	C 321	H 261	C 201	H 141	C 81	21
22	H 502	A 442	H 382	C 322	C 262	C 202	C 142	A 82	22
23	A 503	C 443	H 383	H 323	C 263	A 203	H 143	A 83	23
24	A 504	C 444	C 384	C 324	A 264	C 204	H 144	H 84	24
25	A 505	A 445	H 385	A 325	C 265	C 205	C 145	C 85	25
26	H 506	C 446	H 386	C 326	H 266	C 206	H 146	A 86	26
27	C 507	C 447	H 387	C 327	C 267	H 207	H 147	C 87	27
28	C 508	A 448	A 388	A 328	C 268	C 208	A 148	C 88	28
29	C 509	C 449	C 389	A 329	C 269	C 209	H 149	A 89	29
30	C 510	A 450	A 390	A 330	H 270	A 210	C 150	A 90	30
31	C 511	C 451	H 391	C 331	C 271	C 211	A 151	A 91	31
32	C 512	C 452	H 392	A 332	C 272	C 212	A 152	A 92	32
33	C 513	H 453	C 393	C 333	H 273	A 213	C 153	H 93	33
34	H 514	A 454	A 394	H 334	C 274	C 214	A 154	H 94	34
35	H 515	H 455	C 395	A 335	C 275	H 215	H 155	H 95	35
36	C 516	H 456	C 396	C 336	C 276	C 216	A 156	C 96	36
37	C 517	H 457	C 397	C 337	C 277	A 217	H 157	C 97	37
38	A 518	H 458	C 398	C 338	H 278	H 218	H 158	H 98	38
39	C 519	C 459	H 399	C 339	H 279	H 219	C 159	H 99	39
40	A 520	C 460	C 400	C 340	C 280	A 220	A 160	H 100	40
41	C 521	C 461	H 401	A 341	C 281	C 221	H 161	C 101	41
42	C 522	C 462	H 402	C 342	C 282	H 222	H 162	H 102	42
43	H 523	C 463	C 403	A 343	C 283	C 223	C 163	H 103	43
44	H 524	H 464	C 404	C 344	H 284	H 224	A 164	H 104	44
45	C 525	C 465	C 405	C 345	A 285	C 225	C 165	C 105	45
46	H 526	C 466	C 406	H 346	C 286	A 226	C 166	A 106	46
47	H 527	C 467	H 407	C 347	A 287	H 227	A 167	H 107	47
48	C 528	C 468	C 408	C 348	H 288	C 228	A 168	C 108	48
49	H 529	H 469	A 409	H 349	C 289	C 229	A 169	C 109	49
50	C 530	H 470	H 410	C 350	H 290	C 230	C 170	H 110	50
51	C 531	H 471	H 411	H 351	H 291	C 231	C 171	C 111	51
52	C 532	A 472	C 412	C 352	H 292	A 232	H 172	C 112	52
53	C 533	C 473	H 413	A 353	H 293	A 233	C 173	H 113	53
54	C 534	A 474	H 414	C 354	C 294	H 234	H 174	H 114	54
55	A 535	C 475	C 415	C 355	C 295	C 235	C 175	H 115	55
56	A 536	C 476	C 416	C 356	C 296	H 236	H 176	C 116	56
57	H 537	A 477	H 417	C 357	C 297	C 237	C 177	C 117	57
58	H 538	A 478	H 418	C 358	H 298	C 238	C 178	C 118	58
59	H 539	C 479	H 419	C 359	H 299	A 239	H 179	H 119	59
60	C 540	C 480	H 420	H 360	H 300	H 240	H 180	H 120	60

10 pav. *Lonicera caerulea* L. rūšiai savitų, klonuotų DNR fragmentų pavyzdžių sekoskaitos rezultatai: 1 – *L. caerulea* L., 2 – *L. caerulea* L. subsp. *stenantha* (Pojark.), 3 – *L. caerulea* L. subsp. *kamtschatica* (Pojark.) Plekhanova. Pradmens A–02 prisijungimo vietos pabrauktos. SCAR pradmenų jungimosi vietos pažymėtos pilkai

**21 lentelė.** Melsvauogio sausmedžio (*L. caerulea* L.) genetinių linijų ir elitinių veislių uogų dydis bei cheminė sudėtis

Linija, veislė	Uogos svoris, g	Uogų cheminė sudėtis		
		Sausos medžiagos, %	Cukrus, %	Rūgštingumas, %
'IG16'	0,68±0,05	17,33±0,08	5,27±0,28	2,03±0,05
'IE'	0,82±0,07	20,25±2,21	7,91±0,36	1,52±0,06
'IL'	1,02±0,03	14,31±1,03	9,02±0,35	1,82±0,05
'IN73'	0,77±0,06	20,04±2,01	7,22±0,29	1,62±0,08
'IP'	0,58±0,04	21,03±1,01	7,73±0,54	1,85±0,03
'2C'	1,04±0,04	12,21±0,99	6,51±0,26	2,45±0,06
'2R'	1,03±0,04	13,51±1,12	6,91±0,28	1,42±0,03
'2-I'	0,95±0,07	14,81±0,98	9,03±0,39	1,93±0,07
'3U'	1,29±0,05	15,24±2,01	7,31±0,33	1,52±0,06
'3-5'	1,09±0,09	14,66±1,32	8,81±0,28	1,74±0,05
'96-3'	0,90±0,04	14,78±1,21	5,97±0,35	1,38±0,03
'96-4'	0,95±0,07	15,44±0,99	6,81±0,38	1,28±0,04
'Bakcharskaya'	0,81±0,03	15,73±0,65	7,73±0,35	1,03±0,04
'Morena'	0,86±0,05	15,90±0,68	7,01±0,29	1,35±0,03
'Vasyuganskaya'	0,77±0,02	15,83±0,67	7,63±0,23	1,11±0,05
'Viola'	0,76±0,08	14,68±0,68	6,82±0,32	1,24±1,07
'L-69-3'	1,11±0,08	12,95±0,89	6,35±0,36	1,51±0,08

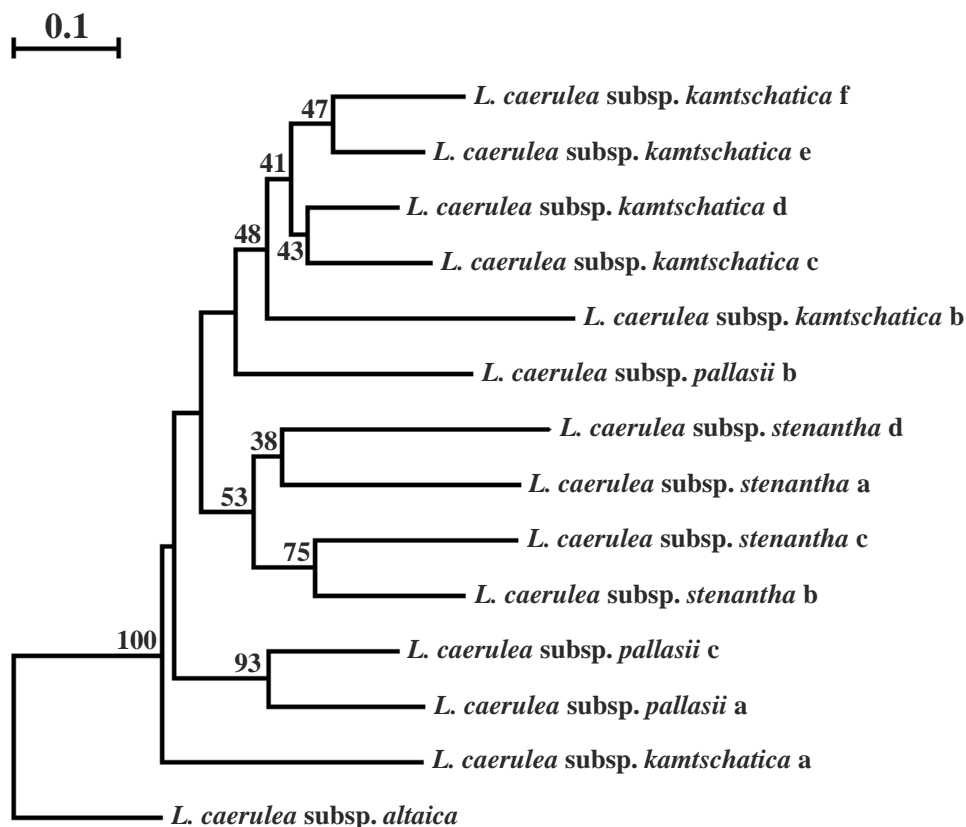


**11 pav.** *Lonicera* L. genties pavyzdžių analizė su dviem SCAR pradmenimis. 1 – *L. caerulea* L. subsp. *kamtschatica* (Pojark.), 2 – *L. caerulea* L. subsp. *stenantha* (Pojark.), 3 – *L. caerulea* L. subsp. *pallasii* (Ledeb.), 4 – *L. caerulea* L. subsp. *altaica* (Pall.), 5 – 'Desertnaya', 6 – 'Salyut', 7 – 'Sinyaya Ptitsa', 8 – 'Fialka', 9 – 'Morena', 10 – 'Viola', 11 – 'Vasyuganskaya', 12 – 'Tomichka', 13 – 'Leningradskii Velikan', 14 – *Lonicera caerulea* L., 15 – *L. edulis* Turcz. ex Freyn, 16 – *L. boczkarnikowae* Plekhanova, 17 – *L. emphyllocalyx* (Maxim.) Nakai, 18 – *L. chrysantha* Turcz. ex Ledeb., 19 – *L. xylosteum* L., 20 – *L. orientalis* Lam., 21 – *L. vesicaria* Kom., 22 – *L. alpigena* L., 23 – *L. x bella* f. *candida* Zabel, 24 – *L. praeflorens* Batalin. M – DNR fragmentų dydžio standartas „GeneRuler™ DNA Ladder Mix“ (100-10000 bp)

Tyrimo rezultatai parodė, kad genetinės linijos ('IL', '2C', '3U', '3-5', '96-4') pasižymi ne tik dideliu uogų svoriu, bet ir didesniu atsparumu grybų sukeliams ligoms palyginti su kitomis linijomis ir kai kuriomis veislėmis (Žilinskaitė et al., 2007).

## 1.2. Sausmedžio pavyzdžių atranka filogenetinei analizei

**Porūšių atranka.** Norėdami pasirinkti tipiškus *Lonicera caerulea* porūšių pavyzdžius daug sąnaudų reikalaujančiai ir sekoskaita pagrįstai filogenetinei analizei, atlikome kelių to paties porūšio pavyzdžių RAPD analizę. Kai kurie pavyzdžiai skyrėsi vieta, iš kurios jie pateko į VU Botanikos sodo kolekciją. Buvo ištirti šeši *L. caerulea* L. subsp. *kamtschatica* pavyzdžiai, keturi – *L. caerulea* L. subsp. *stenantha*, trys – *L. caerulea* L. subsp. *pallasii*, vienas (kolekcijoje buvęs vienintelis) – *L. caerulea* L. subsp. *altaica*. Atlikus RAPD analizę, buvo sudaryta NJ dendrograma, kuri parodė, kad tirti pavyzdžiai genetiškai skiriasi (12 pav.).



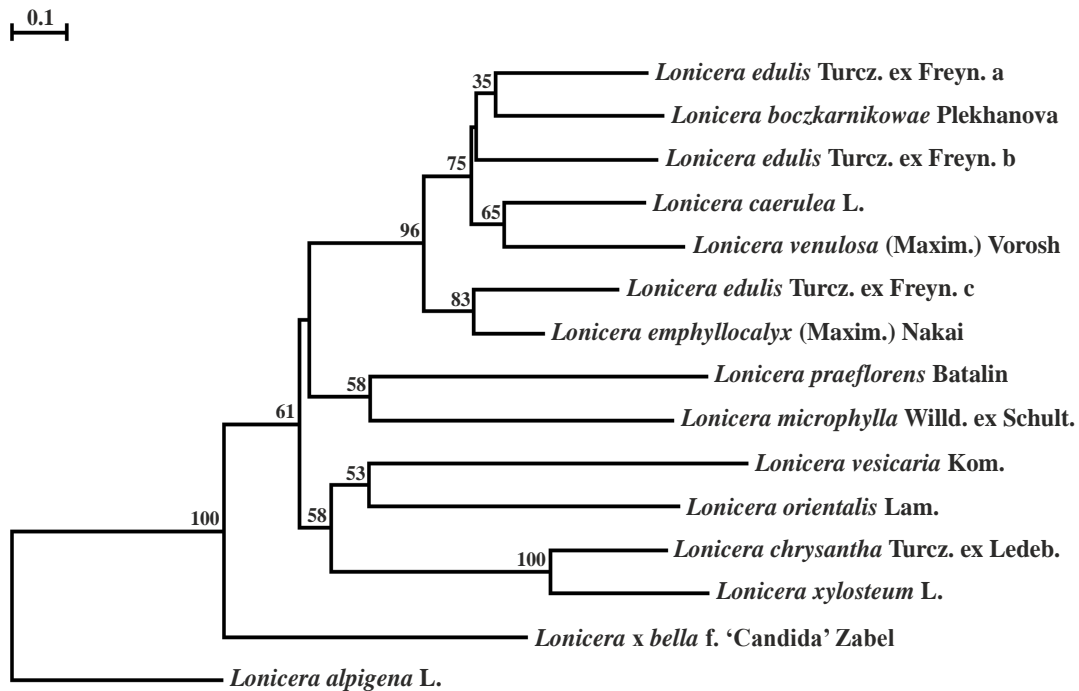
12 pav. *L. caerulea* L. tirtų porūšių pavyzdžių genetinė įvairovė pagal RAPD lokusus. Dendrograma sudaryta NJ metodu. Įkėlų vertės (%), gautos atlikus 1000 iteracijų

Visi *L. caerulea* L. subsp. *kamtschatica* pavyzdžiai sudaro kompaktišką grupę, išskyrus a pavyzdį, kuris buvo gautas iš Latvijos Kalsnava botanikos

sodo ir įvardintas *kamtchatica* porūšiu. Vis dėlto, tiek morfologiniai požymiai, tiek šiame bandyme gauti molekulinų tyrimų rezultatai verčia suabejoti pavyzdžio priklausymu minėtam porūšiui. Visi keturi *L. caerulea* L. subsp. *stenantha* pavyzdžiai grupavosi kartu. Iš trijų *L. caerulea* L. subsp. *pallasii* pavyzdžių vienas (b pavyzdys) grupavosi atskirai. Kadangi *L. caerulea* L. subsp. *pallasii* pavyzdžių auginiai, gauti iš VIR instituto, morfologiškai buvo vienodi, todėl šio porūšio pavyzdys buvo atrinktas ir tolimesniems RAPD tyrimams. Vienintelis *L. caerulea* L. subsp. *altaica* pavyzdys savo RAPD fenotipu išsiskyrė iš kitų porūšių ir sudarė atskirą šaką dendrogramoje. Remiantis šiais rezultatais, filogenetiniams tyrimams buvo pasirinkti visi analizuoti *Lonicera caerulea* L. porūšių pavyzdžiai, išskyrus anksčiau minėtąjį porūšio *kamtchatica* a pavyzdį.

**Rūšių atranka.** VU Botanikos sodo sausmedžio (*Lonicera* L.) kolekcijos rūšių filogenetinei analizei pasirinkome 13 rūšių: septynių rūšių pavyzdžiai buvo iš VU Botanikos sodo Pomologijos skyriaus, penkių – iš Dendrologijos skyriaus, viena (*L. xylosteum* L.) – iš natūralios augavietės. Buvo tiriami trys *L. edulis* Turcz. ex Freyn pavyzdžiai (a, b ir c), gauti iš skirtingų vietų (5 lentelė). NJ dendrogramoje, nubraižytoje remiantis RAPD rezultatais, matyti, kad visi tirtų rūšių pavyzdžiai skiriasi (13 pav.). Didžiausias genetinis skirtumas ( $GD_{xy} = 0,708$ ) buvo tarp *Lonicera alpigena* L. ir *Lonicera xylosteum* L. Be to, didžiausiu savitumu pasižymi *L. alpigena*. Ši rūšis artimai nesigrupuoja su jokia kita mūsų tirta rūšimi. Mažiausiu genetiniu atstumu ( $GD_{xy} = 0,156$ ) pasižymėjo *Lonicera edulis* Turcz. ex Freyn c pavyzdys ir *Lonicera emphylocalyx* (Maxim.) Nakai. Visi *L. edulis* pavyzdžiai skiriasi tarpusavyje: a ir b pavyzdžiai, gauti iš Rusijos ir Islandijos, yra artimesni, palyginti su neaiškios kilmės c pavyzdžiu. Be to, didelis šio pavyzdžio panašumas su *L. emphylocalyx* leidžia daryti prielaidą, kad *L. edulis* c pavyzdys, galbūt, yra neteisingai identifikuotas kolekcijoje. NJ dendrogramoje (13 pav.) galima išskirti 3 klasterius, kuriuos sudaro *Lonicera* L. genties pavyzdžiai. Dar dvi rūšys (*L. alpigena* L. ir *Lonicera x bella* f. 'Candida' Zabel) išsidėsto pavieniui.





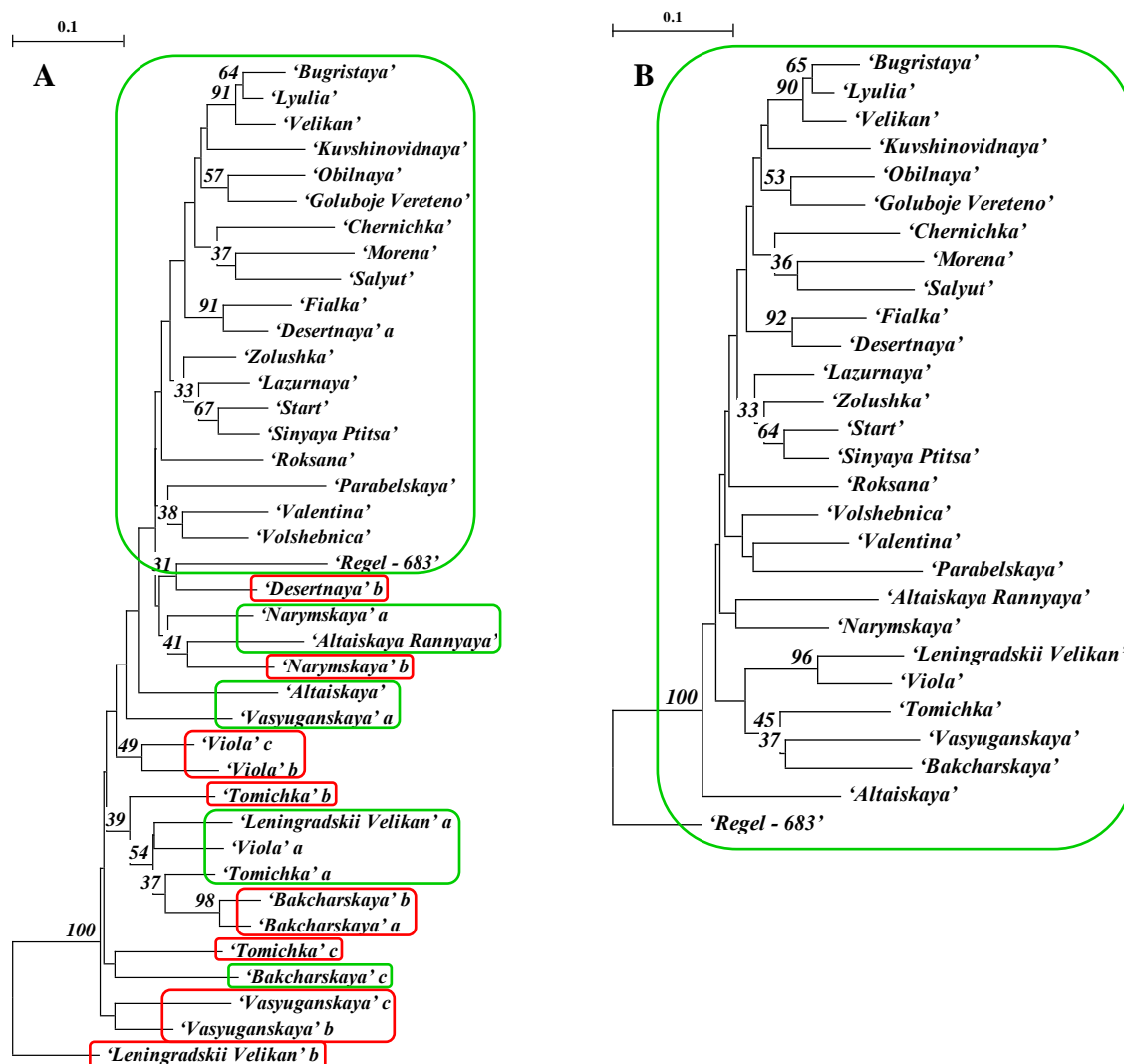
**13 pav.** *Lonicera* L. genties tirtų rūšių pavyzdžių NJ dendrograma, sudaryta naudojant RAPD analizės duomenis. Įkėlų vertės (%) gautos atlikus 1000 iteracijų

Didžiausią klasterį sudaro valgomas uogas turinčios sausmedžio rūšys: *L. edulis*, *L. boczkarnikowae*, *L. caerulea*, *L. venulosa* ir *L. emphyllocalyx*, kurias kai kurie botanikai priskiria polimorfinei kompleksinei *L. caerulea* rūšiai (Rehder 1903; Плеханова, Ростова, 1994). Mažiausią klasterį sudaro dvi rūšys – *L. praeflorens* Batalin ir *L. microphylla* Willd. Ex Schult. Trečią klasterį sudaro keturios sausmedžio rūšys: *L. vesicaria*, *L. chrysantha*, *L. orientalis*, *L. xylosteum*. Atskirai grupuojasi hibridinės rūšies *Lonicera x bella* f. 'Candida' Zabel bei *L. alpigena* pavyzdžiai. Genetinių atstumų ( $GD_{xy}$ ) vidurkis tarp analizuojamų rūšių – 0,487.

Remiantis šio tyrimo rezultatais, buvo pasirinkti genotipai, tinkami filogenetinei analizei, pagrįstai sekoskaitos duomenimis. Buvo pasirinkta *L. edulis* b genotipas, visos rūšys, patenkančios į valgomų sausmedžių klasterį, ir *L. chrysantha*, *L. orientalis* ir *L. xylosteum* rūšys.

**Veislių pavyzdžių atranka.** *Lonicera caerulea* L. veislių atrankai buvo paimti 28-ių veislių 39 pavyzdžiai (7 lentelė). Keturioliktame paveiksle

pateikta visų ištirtų veislių NJ dendrograma, kurioje matyti, kad veislių pavyzdžiai skiriasi tarpusavyje. Kai kuriais atvejais buvo nustatyti nemaži skirtumai netgi tarp tos pačios veislės pavyzdžių. Mažiausias genetinis atstumas tirtų genotipų grupėje nustatytas tarp veislės ‘*Viola*’ *b* ir *c* pavyzdžių (14, A pav.).



**14 pav.** *Lonicera caerulea* L. veislių NJ dendrogramos. A – 28 veislių 39 pavyzdžiai, B – 28 veislių pavyzdžiai. Įkėlų vertės (%) gautos atlikus 1000 iteracijų

Taip pat matyti, kad su šiais pavyzdžiais nesigrupuoja tos pačios veislės ‘*Viola*’ *a* pavyzdys. Panašūs genetiniai skirtumai nustatyti ir tarp kai kurių kitų veislių trijų pavyzdžių. Pavyzdžiui, ‘*Bakcharskaya*’ *a* ir *b* pavyzdžiai dendrogramoje grupuojasi artimai, o ‘*Bakcharskaya*’ *c* nutolęs nuo jų. Veislės

‘*Tomichka*’ kilmės pavyzdžiai *a*, *b* ir *c* artimai nesigrupuoja, tačiau ‘*Tomichka*’ *a* ir *b* mėginiai patenka į tą patį dendrogramos klasterį. Tokius neatitikimus galima paaiškinti veisles atstovaujančių genotipų kilme. Artimiau grupuojasi individai, kurie buvo užauginti iš konkrečios veislės augalo sėklų, o auginiais padaugintas pavyzdys skiriasi nuo jų labiau. Pavyzdžiui, ‘*Viola*’ *a* yra auginys, o pavyzdžiai *b* ir *c* užauginti iš sėklų. Veislės ‘*Leningradskii Velikan*’ *a* ir *b* pavyzdžiai ypač skiriasi, genetinis atstumas tarp jų yra 0,203. Veislės ‘*Leningradskii Velikan*’ *b* pavyzdys sudaro atskirą dendrogramos šaką (14, A pav.). Šie veislę atstovaujantys pavyzdžiai buvo užauginti iš sėklų, gautų iš VIR instituto.

Be to, nubraižius tik veisles reprezentuojančią dendrogramą, t.y. neįtraukus į veislių giminingumo analizę pavyzdžių išaugintų iš sėklų, paaiškėjo, kad labiausiai išsiskiria vienintelė diploidinė ( $2n=18$ ) veislė ‘*Regel-683*’ (14, B pav.).

Remiantis gautais rezultatais galima patvirtinti tai, jog sėjinukai, gauti laisvo apdulkinimo būdu, nereprezentuoja motininio tam tikros veislės augalo. Dėl to tolimesni tyrimai buvo atliekami tik su elitinėmis veislėmis, kurios įtrauktos į VIR katalogą ir kurių auginiai buvo atvežti į VU Botanikos sodo kolekciją.

### **1.3. Chloroplastų DNR specifinių sekų tyrimas sekoskaitos metodu**

Norint tiksliau nustatyti rūšių ir porūšių panašumus bei skirtumus, patikslinti filogenetinius ryšius, o taip pat įvertinti RAPD metodo tinkamumą *Lonicera* L. taksonomijoje, buvo atlikta *Lonicera* L. genties taksonų dvylikos pavyzdžių cpDNR šešių nekoduojančių regionų sekoskaita. Buvo tiriami pavyzdžiai, kuriuos pasirinkome atsižvelgdami į turimus *Lonicera* L. ir *L. caerulea* L. išteklius bei šių sausmedžių perspektyvumą selekcijoje, o taip pat į regioninį paplitimą. Šių reikalavimų neatitinkančios rūšys (*L. alpigena*, *L. microphylla*, *L. vesicaria*, *L. praeflorens* ir kt.) nebuvo tiriamos. Į šią tyrimo

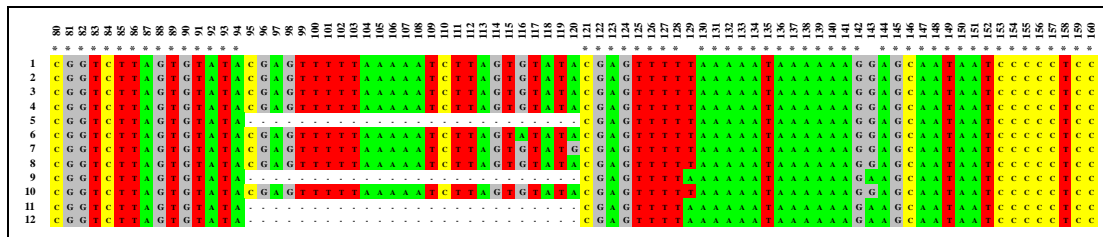
grupę buvo įtraukta ir vienintelė Lietuvoje natūraliai auganti sausmedžių rūšis *L. xylosteum*.

cpDNR nekoduojančių regionų sekoms tirti naudojome pradmenis (11 lentelė), kurių pagalba pagausinome septynis cpDNR fragmentus. Siekiant išvengti PGR netikslumų, kurie gali atsirasti dėl *Taq* polimerazės klaidų, ypač tose DNR srityse, kuriose yra mononukleotidų pasikartojimai (Fazekas et al., 2010), o taip pat ir dėl kitų veiksnių, to paties genotipo cpDNR fragmento sekoskaita buvo atliekama mažiausiai du kartus.

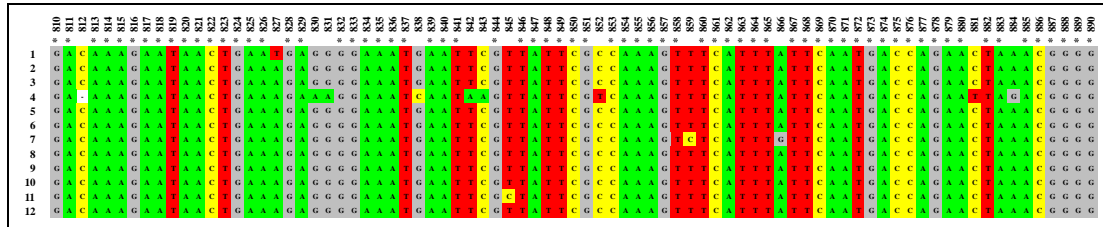
Po sekoskaitos ir duomenų sutvarkymo cpDNR sekos buvo naudojamos filogenetinėje analizėje. Pirmiausia buvo atlikta sekvenuotų DNR fragmentų kokybinė ir kiekybinė analizė naudojant „Sequencing Analysis 5.2“ ir „Chromas 2.33“ sekoskaitos rezultatų bioinformatinio apdorojimo programas. Atlikus sekų sugretinimą, išryškėjo įvairūs DNR polimorfizmo atvejai (VNP, intarpai/iškritos). Kai kurie iš jų pavaizduoti 15-ame paveiksle. Dvylikos skirtingų *Lonicera L.* genties atstovų cpDNR šešių regionų nukleotidų sekos pateiktos penktame priede.

Iš sekoskaitos rezultatų suvestinės (21 lentelė) matyti, kad tirtų pavyzdžių cpDNR fragmentų ilgiai dažniausiai skiriasi. Mažiausias buvo *trnH-psbA* tarpgeninis tarpiklis, kurio ilgis tirtuose pavyzdžiuose svyravo nuo 457 bp iki 481 bp. Ilgiausios (nuo 1002 bp iki 1016 bp) cpDNR sekos buvo *trnL-trnF* tarpgeniniame tarpiklyje. Iš mūsų tirtų cpDNR nekoduojančių regionų, ilgiausias buvo *trnS-trnG*, kurio sekoskaita buvo atliekama dviem etapais: pirmiausia nustatyta fragmento 5'*trnG2S*, o po to fragmento 5'*trnG2G* seka.

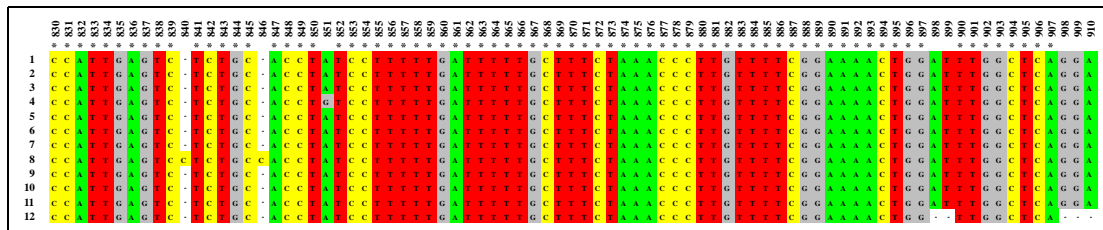
Šio tyrimo metu buvo atlikta iš viso 71146 nukleotidų sekoskaita. cpDNR sritys, kuriose nustatytos iškritos arba intarpai, į sekų statistinę analizę nebuvo įtrauktos, tačiau į tai atsižvelgėme atlikdami filogenetinę analizę (16 pav.)



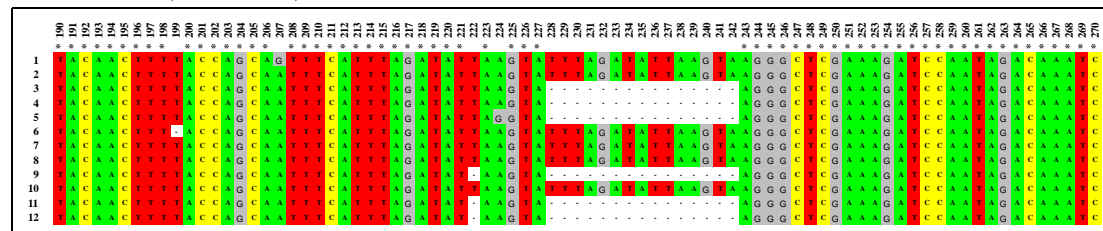
*trmH-psbA* (80 – 160 nt)



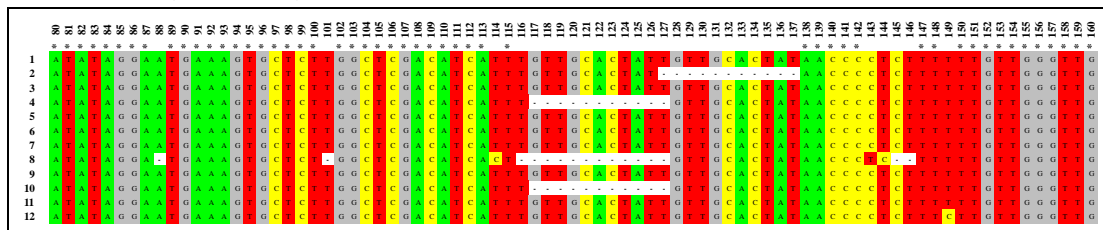
5'*rpS12-rpL20* (810 – 890 nt)



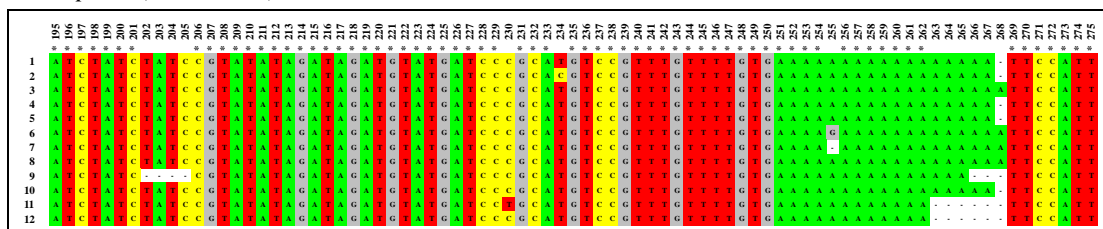
*trmL-trmF* (830 – 910 nt)



*trmS-trmG* (190 – 270 nt)



*rpS16* (80 – 160 nt)



*trmS-psbZ* (195 – 275 nt)

**15 pav.** Kai kurie DNR polimorfizmo atvejai cpDNR šešių regionų nukleotidų sekose: 1 – *Lonicera caerulea* L.; 2 – *Lonicera caerulea* L. subsp. *kamtschatica* (Sevast.) Pojark.; 3 – *Lonicera caerulea* L. subsp. *stenantha* (Pojark.) Skvortsov; 4 – *Lonicera caerulea* L. subsp. *pallasii* (Ledeb.) Browicz; 5 – *Lonicera caerulea* L. subsp. *altaica* Pall.; 6 – *Lonicera edulis* Turcz. ex Freyn.; 7 – *Lonicera boczkarnikowae* Plekhanova; 8 – *Lonicera emphylocalyx* (Maxim.) Nakai; 9 – *Lonicera orientalis* Lam.; 10 – *Lonicera venulosa* (Maxim.) Vorosh.; 11 – *Lonicera xylosteum* L.; 12 – *Lonicera chrysantha* Turcz. ex Ledeb.

**21 lentelė.** cpDNR šešių regionų ilgiai (bp), nustatyti *Lonicera L.* genties pavyzdžiuose

Pavyzdžio Nr.*	<i>trnH-psbA</i>	5' <i>rpS12-rpL20</i>	<i>trnL-trnF</i>	<i>trnS-trnG</i>		<i>rpS16</i>	<i>trnS-psbZ</i>	Iš viso cpDNR bp
				5' <i>trnG2S</i>	5' <i>trnG2G</i>			
1	481	907	1016	878	783	912	993	5945
2	481	907	1016	879	783	892	987	5966
3	476	907	1016	851	784	910	990	5916
4	481	907	1015	851	783	893	989	5931
5	455	907	1011	850	786	911	983	5916
6	481	906	1009	878	783	911	985	5962
7	481	907	1016	879	783	911	994	5950
8	481	907	1001	880	784	890	993	5936
9	457	901	1003	850	783	908	991	5893
10	481	907	1005	879	783	894	990	5960
11	457	888	1004	855	783	913	994	5892
12	457	887	1002	855	783	912	993	5880
<b>Iš viso</b>	<b>5669</b>	<b>10838</b>	<b>12114</b>	<b>10385</b>	<b>9401</b>	<b>10857</b>	<b>11882</b>	<b>71146</b>
<b>Vidurkis</b>	<b>472,42 ±11,8</b>	<b>903,17 ±7,5</b>	<b>1009,50 ±6,2</b>	<b>865,42 ±14,1</b>	<b>783,42 ±0,9</b>	<b>904,75 ±9,3</b>	<b>990,17 ±3,6</b>	<b>5928,92 ±29,5</b>

\* – 1 – *Lonicera caerulea L.* subsp. *kamtschatica* (Sevast.) Pojark.; 2 – *Lonicera caerulea L.* subsp. *stenantha* (Pojark.) Skvortsov; 3 – *Lonicera caerulea L.* subsp. *pallasii* (Ledeb.) Browicz; 4 – *Lonicera caerulea L.* subsp. *altaica* Pall.; 5 – *Lonicera xylosteum L.*; 6 – *Lonicera chrysantha Turcz.* ex Ledeb.; 7 – *Lonicera venulosa* (Maxim.) Vorosh.; 8 – *Lonicera emphylocalyx* (Maxim.) Nakai; 9 – *Lonicera orientalis Lam.*; 10 – *Lonicera boczkarnikowae* Plekhanova; 11 – *Lonicera caerulea L.*; 12 – *Lonicera edulis Turcz.* ex Freyn.

cpDNR *trnH-psbA* nekoduojančio regiono dydis mūsų analizuojamuose *Lonicera L.* genties pavyzdžiuose buvo nuo 455 bp iki 481 bp (21 lentelė). Kiti autoriai, kurie tyrė šio regiono sekas *Lonicera L.* genties pavyzdžiuose, nurodo, kad sekų ilgis yra nuo 339 bp *Lonicera fulvotomentosa* rūšyje (Chen et al., 2010) iki 457 bp *Lonicera xylosteum* rūšyje (Ferri et al., 2009). Vidutinis šio cpDNR regiono ilgis yra apie 500 bp ir priklauso nuo augalo genties (Shaw et al., 2005). Analizuojamų sausmedžio pavyzdžių DNR sekų daugybines analizę atlikome naudodami ClustalW algoritmą ir MEGA 5 programą. *trnH-psbA* nekoduojančio regiono sekas palyginome su apibendrinta 488 nukleotidų seka (angl. *consensus*). Nustatyta, kad šiame regione konservatyvūs (nekintantys) yra 460 nukleotidai, o polimorfiniai – 28 arba 5,7%. Iš jų devyniolika vietų pasižymėjo vieno nukleotido polimorfizmu, devynios vietos buvo parsimoniškai informatyvios (22 lentelė). Didžiausios iškritų/intarpų sritys analizuojamuose pavyzdžiuose nustatytos nuo 95 nukleotido iki 120 nt, nuo 320 nt iki 324 nt, nuo 419 nt iki 425 nt. Specifinė iškrita nuo 324 nukleotido iki 328 nt buvo nustatyta *L. caerulea* subsp. *stenantha* pavyzdyje.

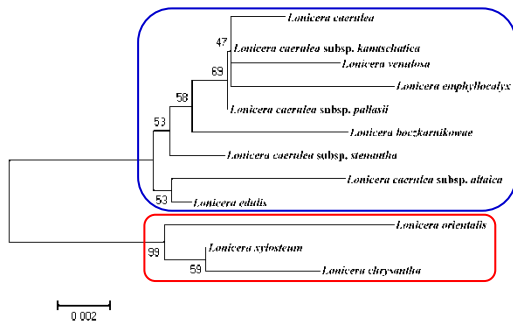
Vidutinis genetinis atstumas tarp tirtų genotipų porų buvo 0,013 ir kito nuo 0 iki 0,30 (22 lentelė). Remiantis šio regiono sekoskaitos rezultatais buvo atlikta filogenetinė analizė ir sudaryta dendrograma naudojant ML metodą (16 A pav.).

**22 lentelė.** cpDNR šešių nekoduojančių regionų kintamumo palyginimas

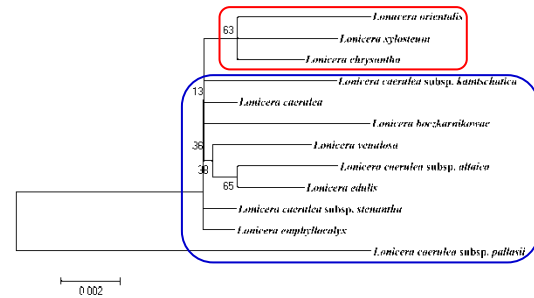
Statistika	Iš viso	<i>trnH-psbA</i>	<i>5'rpS12-rpL20</i>	<i>trnL-trnF</i>	<i>trnS-trnG</i>		<i>rpS16</i>	<i>trnS-psbZ</i>
					5'trnG2S	5'trnG2G		
Palyginamų fragmentų ilgiai (bp)		455–481	887–907	1001–1016	850–880	783–785	890–913	983–994
Analizuojamos DNR sekos ilgis (nt)	6015	488	908	1019	885	787	915	1013
Konservatyvių sekų ilgis (nt)	5763	460	861	974	854	763	880	971
Kintančios sekų vietos	235	28	47	42	31	21	33	33
Pi*	56	9	2	8	7	4	10	16
Vieno nukleotido polimorfizmai (VNP)	179	19	45	34	24	17	23	17
Genetinis atstumas tarp pavyzdžių porų		0–0,30	0,002–0,024	0,001–0,019	0,002–0,014	0,001–0,010	0–0,016	0,002–0,017
	Vidurkis	0,013	0,009	0,008	0,008	0,006	0,008	0,008

\* – Pi – parsimoniškai informatyvos sekų vietos (angl. *Parsimony informative character*)

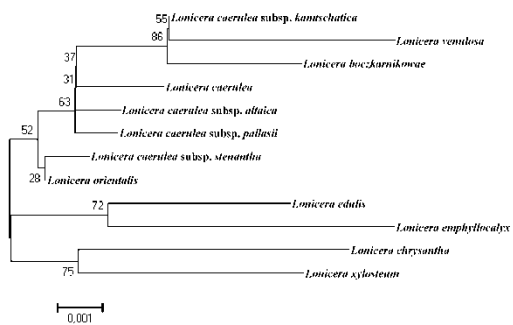
cpDNR *5'rpS12-rpL20* nekoduojančio regiono dydis analizuojamuose *Lonicera L.* genties sausmedžių pavyzdžiuose buvo nuo 887 bp iki 907 bp. Panašių sekų paieška duomenų bazėse parodė, kad ši sritis *Lonicera L.* genties ar *Caprifoliaceae* šeimos augaluose iki šiol netirta, nes nepavyko nustatyti homologiškų registruotų sekų. Vidutinis šio regiono dydis, nustatytas gaubtasėkliuose augaluose, yra 783 bp (Shaw et al., 2005), nors kartais jis viršija 880 bp. Šios sekos ilgis tiriamų taksonų grupėje yra nuo 887 nt iki 907 nt (21, 22 lentelės). *5'rpS12-rpL20* nekoduojančio regiono sekas palyginome su apibendrinta 908 nukleotidų seka, kurioje konservatyvūs yra 861 nukleotidai, o kintančios vietos (47 nt) sudaro 5,2%. Pastarosiose nustatyti 45 VNP ir dvi parsimoniškai informatyvos vietos (22 lentelė).



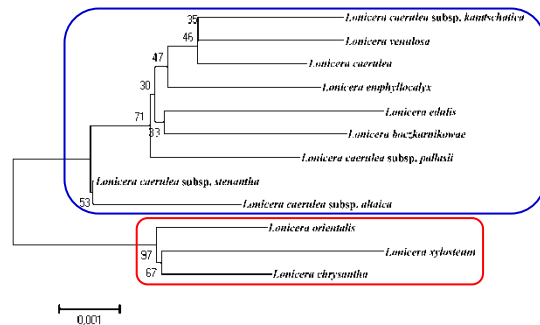
**A. *trnH-psbA* (488 nt)**



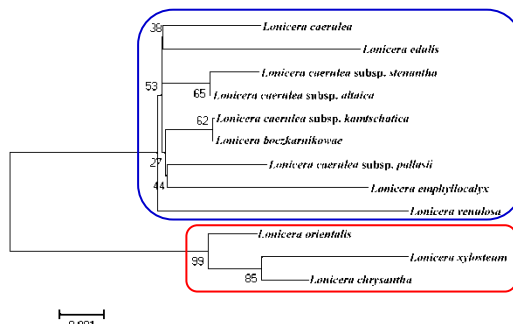
**B. 5' *rpS12-rpL20* (908 nt)**



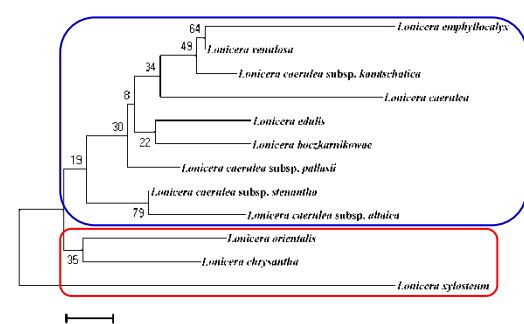
**C. *trnL-trnF* (1019 nt)**



**D. *trnS-trnG* (1672 nt)**



**E. *rpS16* (915 nt)**



**F. *trnS-psbZ* (1013 nt)**

**16 pav.** *Lonicera* L. genties atstovų filogenetinė analizė atlikta naudojant cpDNR šešių nekoduojančių regionų sekoskaitos rezultatus. Dendrogramos sudarytos naudojant ML analizės metodą, taikant Tamura-Nei pagalbinį modelį. Įkėlių vertės (%) gautos atlikus 1000 iteracijų



Dviejuose pavyzdžiuose (*L. caerulea* subsp. *pallasii* ir *L. orientalis*) 364 nt padėtyje buvo nustatytas vieno nukleotido intarpas. Iškritos, kurios buvo nustatytos dvejose vietose (nuo 544 nt iki 550 nt ir nuo 628 nt iki 639 nt), būdingos tik *L. xylosteum* ir *L. chrysantha* rūšims. Vieną iš minėtų iškritų (nuo 544 nt iki 550 nt) aptariamame cpDNR regione turi ir *L. orientalis*. Parsimoniškai informatyvios vietos yra 197 nt ir 498 nt padėtyse. Genetinis atstumas tarp tirtų pavyzdžių kito nuo 0,002 iki 0,024, vidurkis buvo 0,009 (22 lentelė). Pagal turimas cpDNR 5'rpS12-rpL20 regiono sekas buvo atlikta filogenetinė analizė ir sudaryta dendrograma (16 B pav).

cpDNR *trnL-trnF* nekoduojančio regiono dydis tiriamuose *Lonicera* L. genties pavyzdžiuose buvo nuo 1001 bp iki 1016 bp. Duomenų bazėse aptikome 12 registruotų homologiškų šiam regionui *Lonicera* L. genties rūšių sekų (Zhang et al., 2003; Bremer et al., 2002; Bell, 2010; Jacobs et al., 2010). Minėti autoriai nurodo, kad *trnL-trnF* regiono ilgis yra nuo 815 bp iki 1358 bp. Atlikę tirtų pavyzdžių sekų daugybinę analizę, palyginome *trnL-trnF* nekoduojančio regiono sekas su apibendrinta 1019 nukleotidų seka. Šiame regione nustatėme 974 nukleotidų ilgio konservatyvias sekas, o kintančios vietos (42 nt) sudarė 5,3%. Vieno nukleotido polimorfizmas nustatytas 34-iose vietose, o 8 vietos yra parsimoniškai informatyvios (22 lentelė). *L. venulosa* rūšyje vieno nukleotido intarpai buvo aptikti 686-to nukleotido padėtyje ir *L. emphylocalyx* rūšyje – 840 nt ir 846 nt padėtyse. Vieno nukleotido iškritos buvo šiek tiek dažnesnės palyginti su intarpais. *L. caerulea* subsp. *altaica* pavyzdyje iškritos buvo 86 nt, 122 nt ir 132 nt padėtyse, *L. chrysantha* – 927 nt ir 938 nt, *L. xylosteum* – 955 nt ir 970 nt padėtyse. Iškritų/intarpų sritys buvo dar dažnesnės: *L. caerulea* subsp. *altaica* pavyzdyje – 64-65 nukleotidų padėtyse, *L. orientalis* – 277-281 nt, *L. edulis*, *L. orientalis*, *L. chrysantha* – 383-388 nt, *L. venulosa* – 704-714 nt, *L. chrysantha* – 898-899 nt ir 908 – 919 nt, *L. emphylocalyx* – 945 – 948 nt, 966 – 970 nt ir 981 – 988 nt padėtyse. Remiantis cpDNR *trnL-trnF* regiono sekoskaitos duomenimis buvo apskaičiuotas genetinis atstumas tarp tirtų genotipų. Genetinis atstumas buvo

nuo 0,001 iki 0,019, vidurkis 0,008 (22 lentelė). Pagal turimas cpDNR *trnL-trnF* regiono sekas buvo atlikta filogenetinė analizė ir sudaryta dendrograma (16 C pav.).

cpDNR *trnS-trnG* nekoduojantis regionas analizuojamuose *Lonicera* L. genties taksonų pavyzdžiuose buvo pats didžiausias ir kai kuriais atvejais viršijo 1600 nukleotidų. Todėl jį sąlyginai padalinome į dvi dalis, kurių sekoskaita buvo atliekama nepriklausomai, naudojant atitinkamus pradmenis (11 lentelė). Dėl to cpDNR *trnS-trnG* regiono dalys po sekoskaitos irgi buvo analizuojamos atskirai. cpDNR *trnS-trnG* regiono **5'trnG2S** dalies dydis analizuojamuose pavyzdžiuose buvo nuo 850 bp iki 880 bp (22 lentelė). Carlson ir kt. (2009) išsamiai tyrė šį *Lonicera* L. genties rūšių cpDNR regioną. Daugelis sekų, kurias nustatė šie autoriai, užregistruotos duomenų bazėse. Jose pateikiamų sekų ilgis yra nuo 630 bp iki 674 bp. *trnS-trnG* regiono **5'trnG2S** dalies seką palyginome su apibendrinta 885 nukleotidų seka. Šiame regione nustatėme 854 nukleotidų ilgio konservatyvias sekas, o kintančios vietos (31 nt) sudarė 3,5%. Buvo nustatyti 24 vieno nukleotido polimorfizmai bei 7-ios parsimoniškai informatyvios vietos (22 lentelė). Vieno nukleotido iškritos buvo nustatytos *L. edulis* pavyzdyje 199-to nukleotido padėtyje, *L. orientalis*, *L. xylosteum*, *L. chrysantha* – 361 nt, *L. caerulea* – 772 nt, *L. altaica* – 828 nt padėtyse. Šiame cpDNR regione nustatėme keletą iškritų/intarpų sričių: nuo 152 nt iki 164 nt, nuo 228 iki 242 nt ir nuo 478 iki 482 nt. Genetinis atstumas tarp genotipų kito nuo 0,002 iki 0,014, vidurkis buvo 0,008 (22 lentelė). *trnS-trnG* regiono **5'trnG2G** dalies dydis mūsų analizuojamuose pavyzdžiuose buvo nuo 783 bp iki 785 bp (22 lentelė). Bell 2010 m. tyrė šią sritį šešiose *Lonicera* L. genties ir artimose *Caprifoliaceae* šeimai rūšyse. Nustatytų sekų ilgio vidurkis – apie 600 bp. *trnS-trnG* regiono **5'trnG2G** dalies seką palyginome su apibendrinta 787 nukleotidų seka. Šiame regione nustatėme 763 nukleotidų ilgio konservatyvias sekas, o kintančios vietos (21 nt) sudarė tik 2,7%. Šiose polimorfinėse sekose buvo nustatyta 17-a vieno nukleotido polimorfizmų ir keturios parsimoniškai informatyvios vietos (22 lentelė). Vieno nukleotido intarpas nustatytas *L. caerulea* subsp. *steantha*, *L. caerulea*

subsp. *altaica* pavyzdžiuose 193-čio nukleotido padėtyje, *L. emphylocalyx* – 614 nt, *L. caerulea* subsp. *altaica* – 688 nt ir 748 nt padėtyse. Didesnių iškritų/intarpų šiame regione nenustatyta. Pi sekos buvo nustatytos 265-to nukleotido padėtyje, 325 nt, 386 nt ir 440 nt padėtyse. Atsižvelgus į nustatytą 5'*trnG2G* regiono sekų polimorfizmą, nustatytas genetinio atstumo tarp tirtų pavyzdžių porų kitimas nuo 0,001 iki 0,010, vidurkis – 0,006 (22 lentelė). Pagal turimas cpDNR šių regionų sekas buvo atlikta filogenetinė analizė ir sudaryta viso *trnS-trnG* regiono dendrograma (16 D pav.).

Ribosomų baltymą koduojančio geno *rpS16* introno dydis mūsų analizuojamuose *Lonicera* L. genties pavyzdžiuose kito 890 bp – 913 bp ribose (22 lentelė). Duomenų bazėse aptikome dvi registruotas homologiškas šiam mūsų ištirtam regionui *Lonicera* L. genties rūšių sekas, kurių ilgiai *L. chrysantha* rūšyje – 861 nt (Bremer et al., 2002), o *L. japonica* – 1140 nt (Moore et al., 2010). Po sekoskaitos palyginome šio regiono sekas su apibendrinta 915 nukleotidų seka. Šiame regione nustatėme 880 nukleotidų ilgio konservatyvias sekas, o kintančios vietos (33 nt) sudarė 3,6%. Nustatėme 10 parsimoniškai informatyvių lokusų ir 23 vieno nukleotido polimorfizmus (22 lentelė). Vieno nukleotido iškritos buvo nustatytos *L. orientalis* pavyzdyje 29-to ir 53-io nukleotidų padėtyse, *L. emphylocalyx* – 88 nt ir 101 nt, *L. caerulea* subsp. *stenantha*, *L. chrysantha* – 833 nt, *L. caerulea* subsp. *kamtschatica* – 891 nt padėtyse. Vieno nukleotido intarpai nustatyti *L. emphylocalyx* rūšyje 60-to nukleotido ir *L. caerulea* – 811 nt padėtyse. Iškritos nustatytos *L. emphylocalyx* pavyzdyje nuo 116 nukleotido iki 127 nt bei nuo 145 nt iki 146 nt, *L. caerulea* subsp. *pallasii* ir *L. venulosa* – nuo 117 nt iki 127 nt, *L. caerulea* subsp. *kamtschatica* – nuo 127 nt iki 137 nt. Dviejų nukleotidų iškrita/intarpas nuo 701 nt iki 702 nt buvo būdinga *L. orientalis* ir *L. xylosteum*. Kiti šio tipo pokyčiai buvo mažiau specifiški ir nustatyti keliuose analizuojamų sausmedžių pavyzdžiuose. Genetinis atstumas tarp tirtų pavyzdžių porų kito nuo 0 iki 0,016, vidurkis – 0,008 (22 lentelė). Pagal

turimas šio regiono sekas buvo atlikta filogenetinė analizė ir sudaryta dendrograma (16 E pav.).

cpDNR *trnS-psbZ* regiono dydis mūsų analizuojamuose *Lonicera* L. genties pavyzdžiuose buvo nuo 983 bp iki 994 bp (22 lentelė). Atlikę BLAST paiešką duomenų bazėse, neaptikome sekų, kurios būtų homologiškos mūsų nustatytoms cpDNR *trnS-psbZ* regiono sekoms. Atlikę dvylikos analizuojamų pavyzdžių sekų daugybinę analizę, palyginome *trnS-psbZ* regiono sekas su apibendrinta 1013 nukleotidų seka. Šiame regione nustatėme 971 nukleotidų ilgio konservatyvias sekas, o kintančios vietos (33 nt) sudarė 3,2%. Pastarosiose aptikome 17 VNP ir 16 parsimoniškai informatyvių vietų (22 lentelė). Analizuodami *trnS-psbZ* regiono sekas, nustatėme iškritą nuo 202 nt iki 205 nt *L. orientalis* rūšyje ir intarpą nuo 983 nt iki 984 nt *L. xylosteum* rūšyje. Vieno nukleotido intarpus aptikome *L. caerulea* rūšyje 774-to nukleotido, 828 nt ir 843 nt padėtyse, *L. caerulea* subsp. *pallasii* – 867 nt, *L. chrysantha* – 917 nt, *L. emphylocalyx* – 966 nt padėtyse; vieno nukleotido iškritas *L. boczkarnikowae* rūšyje 255-to nukleotido, *L. caerulea* subsp. *altaica* – 883 nt, *L. caerulea* – 896 nt padėtyse. Vieno nukleotido polimorfizmas – 268 nt, 786 nt, 818 nt, 922 nt padėtyse. Visiems pavyzdžiams būdinga nukleotidų iškritos/intarpai nuo 263 nt iki 268 nt, 266 – 268 nt, 682 – 686 nt, 797 – 803 nt, 806 – 807 nt, 937 – 939 nt, 944 – 946 nt, 969 – 972 nt. Genetinis atstumas tarp genotipų kito nuo 0,002 iki 0,017, vidurkis – 0,008 (22 lentelė). Pagal turimas šio regiono sekas buvo atlikta filogenetinė analizė ir sudaryta dendrograma (16 F pav.).

## **2. *Lonicera caerulea* L. filogenetinių ryšių tyrimas**

Kaip jau minėta literatūros apžvalgoje, *L. caerulea* L. rūšies ir porūšių filogenetiniai ryšiai iki šiol yra diskusijų objektas, todėl buvo tikimasi, kad molekulinį žymenų panaudojimas padės giliau pažvelgti į šią problemą. Savo darbe *L. caerulea* L. ir jai artimų rūšių, o taip pat porūšių filogenetiniams tyrimams naudojome RAPD ir cpDNR sekoskaitą.

## 2.1. *L. caerulea* L. filogenetiniai tyrimai RAPD metodu

Norėdami objektyviau įvertinti *L. caerulea* L. filogenetinius ryšius, ištyrėme *Lonicera* L. genties atstovus (*Lonicera caerulea* L. subsp. *kamtschatica* (Sevast.) Pojark.; *Lonicera caerulea* L. subsp. *stenantha* (Pojark.) Skvortsov; *Lonicera caerulea* L. subsp. *pallasii* (Ledeb.) Browicz; *Lonicera caerulea* L. subsp. *altaica* Pall.; *Lonicera xylosteum* L.; *Lonicera chrysantha* Turcz. ex Ledeb.; *Lonicera venulosa* (Maxim.) Vorosh.; *Lonicera emphylocalyx* (Maxim.) Nakai; *Lonicera orientalis* Lam.; *Lonicera boczkarnikowae* Plekhanova; *Lonicera caerulea* L.; *Lonicera edulis* Turcz. ex Freyn.) dviem anksčiau minėtais molekuliniais žymenų metodais. Šiam tyrimui pasirinkome taksonus, kurių dauguma, kaip rodo literatūros duomenys (žr. literatūros apžvalgą), yra arba *L. caerulea* L. porūšiai, arba artimai giminiškos rūšys. Kai kurie autoriai artimai giminiškas rūšis vertina kaip *L. caerulea* L. porūšius arba varietetus (Rehder 1903; Плеханова, Ростова, 1994). Atlikome 132 polimorfinių lokusų RAPD analizę (23 lentelė).

**23 lentelė.** *Lonicera* L. genties 12 pavyzdžių (porūšių ir rūšių) genominės DNR polimorfizmas

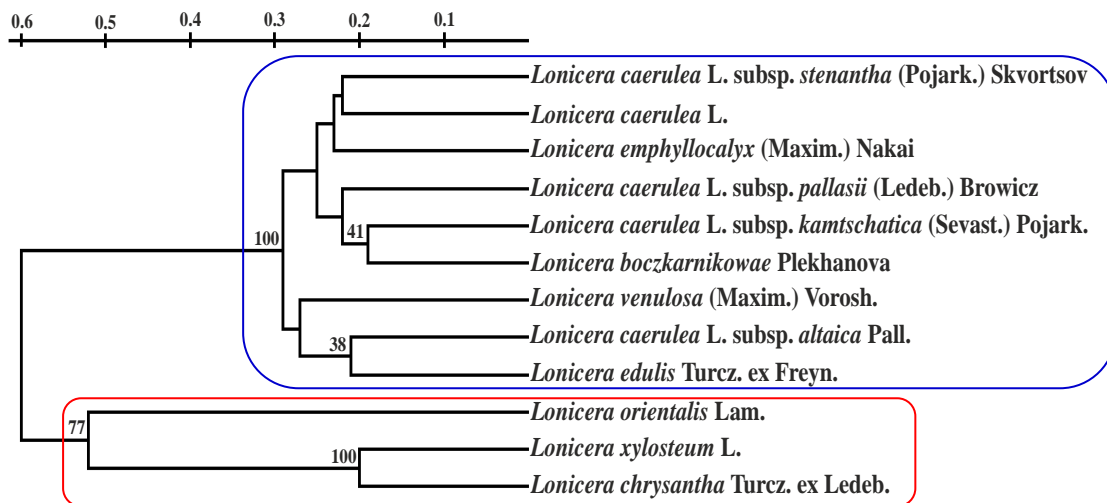
Pradmuo	Pradmens seka 5'→3'	Nustatytų lokusų skaičius	Monomorfinių lokusų skaičius	Polimorfinių lokusų skaičius	Polimorfinių lokusų %	DNR fragmentų dydis (bp)
170-08	CTGTACCCCC	19	5	14	73,7	490 – 2100
170-10	CAGACACGGC	15	3	12	80	470 – 1700
380-01	ACGCGCCAGG	14	3	11	78,6	490 – 1700
380-02	ACTCGGCCCC	10	–	10	100	510 – 1800
380-07	GGCAAGCGGG	16	3	13	81,3	560 – 1960
A-01	CAGGCCCTTC	12	2	10	83,3	700 – 2300
A-02	TGCCGAGCTG	12	3	9	75	580 – 2500
A-03	AGTCAGCCAC	16	9	7	43,8	680 – 1700
A-04	AATCGGGCTG	12	2	10	83,3	560 – 1900
A-05	AGGGGTCTTG	13	2	11	84,6	580 – 2100
A-09	GGGTAACGCC	18	6	12	66,7	270 – 1180
A-11	CAATCGCCGT	15	2	13	86,7	370 – 1400
<b>Iš viso / vid.</b>		<b>172</b>	<b>40</b>	<b>132</b>	<b>78,1 ±13,5</b>	<b>270 – 2500</b>

Analizuotų DNR fragmentų dydis buvo nuo 270 bp iki 2500 bp. Daugiausia polimorfinių lokusų (100%) buvo nustatyta su pradmeniu 380–02, mažiausiai (43,8%) – su A–03. Naudojant vieną pradmenį buvo nustatyti vidutiniškai 11 polimorfinių lokusų. DNR polimorfizmas tiriamų pavyzdžių grupėje buvo 78,1%. Naudodami nustatytus žymenis apskaičiavome Nei ir Li (1979) genetinius atstumus tarp tirtų pavyzdžių (24 lentelė). Didžiausias genetinis atstumas ( $GD_{xy} = 0,610$ ) nustatytas tarp *L. caerulea* ir *L. chrysantha*, mažiausias ( $GD_{xy} = 0,188$ ) – tarp *L. boczkarnikowae* ir *L. caerulea* subsp. *kamtschatica*. Remiantis genetiniais atstumais buvo nubraižytos UPGMA ir NJ dendrogramos, rodančios galimus tirtų *Lonicera* L. genties atstovų filogenetinius ryšius (17 pav., 18 pav.).

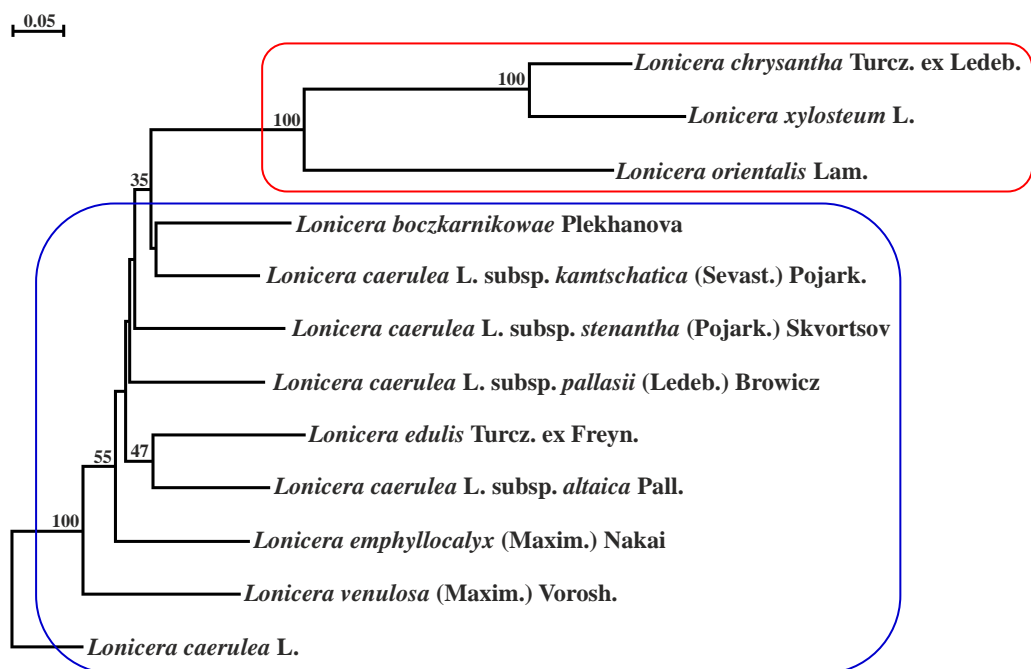
**24 lentelė.** *Lonicera* L. genties atstovų genetiniai atstumai, apskaičiuoti pagal RAPD analizės duomenis

Pvz. Nr.*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1												
2	0,213											
3	0,218	0,226										
4	0,195	0,257	0,221									
5	0,534	0,545	0,579	0,556								
6	0,469	0,493	0,497	0,515	0,200							
7	0,274	0,297	0,260	0,237	0,577	0,534						
8	0,211	0,232	0,224	0,228	0,566	0,540	0,254					
9	0,420	0,492	0,466	0,452	0,519	0,508	0,570	0,480				
10	0,188	0,233	0,225	0,255	0,504	0,483	0,293	0,244	0,467			
11	0,243	0,224	0,257	0,291	0,568	0,526	0,232	0,236	0,610	0,263		
12	0,256	0,265	0,244	0,208	0,534	0,510	0,274	0,263	0,496	0,288	0,270	

\* – 1 – *Lonicera caerulea* L. subsp. *kamtschatica* (Sevast.) Pojark.; 2 – *Lonicera caerulea* L. subsp. *stenantha* (Pojark.) Skvortsov; 3 – *Lonicera caerulea* L. subsp. *pallasii* (Ledeb.) Browicz; 4 – *Lonicera caerulea* L. subsp. *altaica* Pall.; 5 – *Lonicera xylosteum* L.; 6 – *Lonicera orientalis* Lam.; 7 – *Lonicera venulosa* (Maxim.) Vorosh.; 8 – *Lonicera emphylocalyx* (Maxim.) Nakai; 9 – *Lonicera chrysantha* Turcz. ex Ledeb.; 10 – *Lonicera boczkarnikowae* Plekhanova; 11 – *Lonicera caerulea* L.; 12 – *Lonicera edulis* Turcz. ex Freyn.



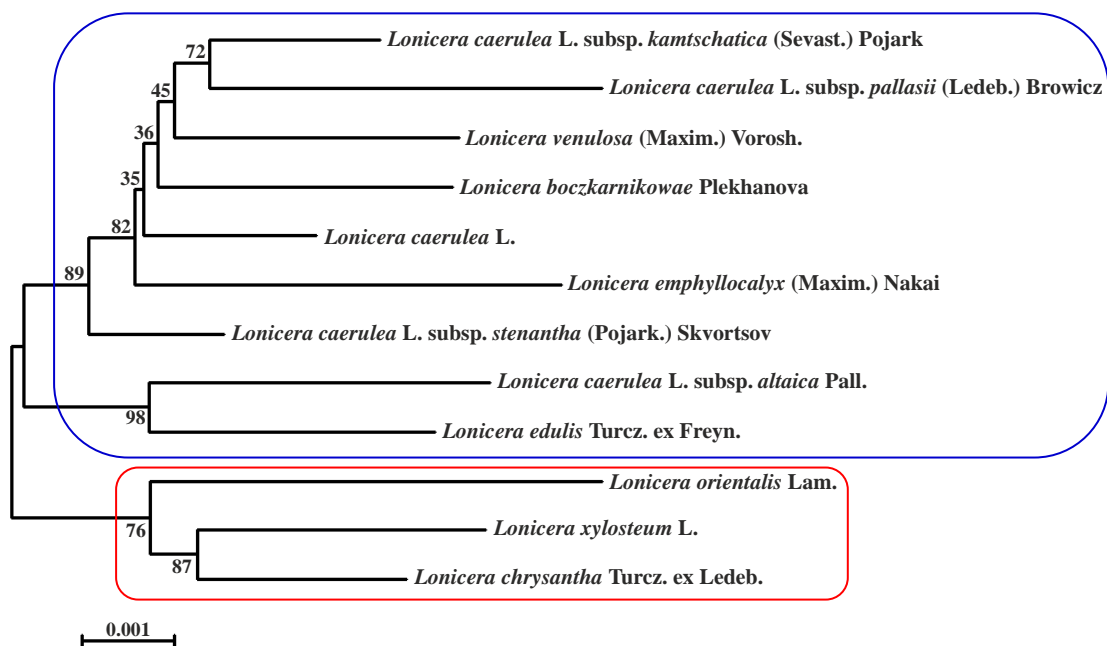
**17 pav.** *Lonicera* L. genties rūšių ir porūšių UPGMA dendrograma, sudaryta pagal Nei ir Li (1979) genetinius atstumus. Įkėlų vertės (%) gautos atlikus 1000 iteracijų



**18 pav.** *Lonicera* L. genties rūšių ir porūšių filogenetinė dendrograma, sudaryta NJ grupavimo metodu pagal Nei ir Li (1979) genetinius atstumus. Įkėlų vertės (%) gautos atlikus 1000 iteracijų

## 2.2. Filogenetinių ryšių nustatymas naudojant cpDNR sekoskaitos duomenis

Kaip minėta anksčiau (1.3 sk.), buvo atlikta *Lonicera* L. genties atstovų cpDNR šešių nekoduojančių regionų 71146 nukleotidų sekoskaita (21 lentelė). Atlikę daugybinę cpDNR visų šešių regionų sekų analizę, gavome apibendrintą 6015 nukleotidų seką (22 lentelė). Konservatyvių sekų ilgis – 5763 nukleotidai, kintančių – 235 nt. Iš viso nusatytos 56-ios parsimoniškai informatyvios vietos ir 179 vieno nukleotido polimorfizmai. Įvertinę visas nustatytas cpDNR sekas, atlikome filogenetinę analizę ir nubraižėme dendrogramą, naudodami ML statistinį analizės metodą ir Tamura-Nei pagalbinio modelio algoritimą (19 pav.).



**19 pav.** *Lonicera* L. genties rūšių ir porūšių filogenetinė analizė, atlikta remiantis cpDNR šešių nekoduojamų regionų sekoskaita. Dendrograma sudaryta naudojant ML metodą ir Tamura-Nei modelio algoritimą. Įkėlų vertės (%) gautos atlikus 1000 iteracijų

Apskaičiuoti genetiniai atstumai tarp tirtų genotipų rodo, kad mažiausias genetinis atstumas ( $GD_{xy} = 0,0037$ ) yra tarp *L. caerulea* subsp. *stanantha* ir *L. caerulea*, o didžiausias ( $GD_{xy} = 0,0128$ ) – tarp *L. caerulea* subsp. *pallasii* ir *L. chrysantha* (25 lentelė).



**25 lentelė.** *Lonicera* L. genties atstovų genetiniai atstumai, apskaičiuoti pagal cpDNR šešių regionų sekoskaitos duomenis

Pvz. Nr.*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1												
2	0,0045											
3	0,0037	0,0047										
4	0,0068	0,0061	0,0066									
5	0,0086	0,0089	0,0073	0,0109								
6	0,0080	0,0084	0,0072	0,0103	0,0068							
7	0,0054	0,0056	0,0056	0,0082	0,0098	0,0089						
8	0,0066	0,0075	0,0068	0,0098	0,0110	0,0094	0,0079					
9	0,0105	0,0109	0,0089	0,0128	0,0103	0,0095	0,0118	0,0125				
10	0,0051	0,0051	0,0056	0,0080	0,0094	0,0095	0,0065	0,0084	0,0119			
11	0,0077	0,0091	0,0065	0,0110	0,0117	0,0112	0,0096	0,0109	0,0084	0,0100		
12	0,0075	0,0079	0,0059	0,0095	0,0107	0,0105	0,0089	0,0102	0,0079	0,0087	0,0054	

\* – 1 – *Lonicera caerulea* L.; 2 – *Lonicera caerulea* L. subsp. *kamtschatica* (Sevast.) Pojark.; 3 – *Lonicera caerulea* L. subsp. *stenantha* (Pojark.) Skvortsov; 4 – *Lonicera caerulea* L. subsp. *pallasii* (Ledeb.) Browicz; 5 – *Lonicera caerulea* L. subsp. *altaica* Pall.; 6 – *Lonicera edulis* Turcz. ex Freyn.; 7 – *Lonicera boczkarnikowae* Plekhanova; 8 – *Lonicera emphylocalyx* (Maxim.) Nakai; 9 – *Lonicera chrysantha* Turcz. ex Ledeb.; 10 – *Lonicera venulosa* (Maxim.) Vorosh.; 11 – *Lonicera xylosteum* L.; 12 – *Lonicera orientalis* Lam.

### 2.3. Filogenetinių ryšių analizė panaudojant originalius ir duomenų bazėse registruotų giminingų taksonų cpDNR sekoskaitos duomenis

Visas sausmedžių cpDNR sekas, nustatytas sekoskaitos metu (21 lentelė), palyginome su NCBI instituto GenBank<sup>®</sup>/EMBL/DDBJ ir PDB duomenų bazėse užregistruotomis nukleotidų sekomis. Paiešką vykdėme su BLASTN v2.2.24 paieškos įrankiu. Siekdami susiaurinti sekų palyginimo paiešką, panaudojome MEGABLAST paieškos algoritimą šimtui palyginamų sekų.

Iš šešių ištirtų cpDNR regionų iš viso palyginome septynis cpDNR sekų fragmentus. Pirmiausia NCBI duomenų bazėje buvo bandoma ieškoti sekų, kurios būtų identiškos (tos pačios rūšies ir to paties cpDNR regiono) mūsų analizuojamoms sekoms. Vėliau į filogenetinį tyrimą buvo įtrauktos homologiškos kitų *Lonicera* L. genties rūšių bei artimesnių pagal sisteminį rangą *Caprifoliaceae* šeimos augalų sekos. Iš duomenų bazių registro filogenetiniams tyrimams pasirinkome 20-30 labiausiai taksonominiu požiūriu panašių rūšių sekų (26 lentelė).

Dvidešimt šeštoje lentelėje matyti, kad *Lonicera* L. genties ir *Caprifoliaceae* šeimos augalų cpDNR 5'rpS12-rpL20 tarpgeninis tarpiklis visiškai netirtas. Sekas, kurios būtų homologiškos ir panašiausios į mūsų nustatytas šio regiono sekas, pavyko surasti tik tose augalų rūšyse, kuriose atlikta viso chloroplastų genomo sekoskaita (26-oje lentelėje pateikiami tik penki tokių sekų pavyzdžiai). Būtent, šių rūšių augalų sekų ir mūsų nustatytų sekų panašumas yra gana didelis – 85-88%. Paieškos duomenų bazėse rezultatai rodo, kad dar niekas nepanaudojo šio cpDNR tarpgeninio tarpiklio *Caprifoliaceae* šeimos augalams tirti.

Atlikę paiešką sekų, panašių į mūsų tirtą cpDNR *trnH-psbA* regiono seką, nustatėme, kad ji panašiausia į šešių *Lonicera* L. genties rūšių ir dviejų artimai giminingų *Caprifoliaceae* šeimos augalų rūšių atitinkamas sekas. Kaip matyti iš BLASTN paieškos rezultatų (26 lentelė), *Lonicera xylosteum trnH-psbA* seka (Ferri et al., 2009) yra identiška mūsų analizuoto *L. xylosteum* pavyzdžio sekai.

Dalis *Lonicera* L. genties rūšių pavyzdžių sekų, kurias pateikia Chen ir kt. (2010), skiriasi nežymiai nuo mūsų nustatytų. Kitų autorių pateikiamos ir mūsų nustatytos šio regiono sekos taip pat skiriasi nežymiai. Pavyzdžiui, *L. japonica* homologiška seka ir mūsų nustatytos šio regiono sekos skiriasi vidutiniškai 11 – 15 nukleotidų.

Kitų *Lonicera* L. genties rūšių *trnH-psbA* regiono sekos skiriasi šiek tiek daugiau (iki 20 nt). Šiuos skirtumus galima paaiškinti sekų divergencija skirtingose rūšyse. Iš viso palyginome dvidešimt (8 paimtos iš NCBI duomenų bazės ir 12 mūsų nustatytų) *trnH-psbA* regiono sekų (27 lentelė). Palyginamų sekų ilgiai varijavo nuo 267 bp iki 481 bp. Sekų daugybinė analizė parodė, kad sekos skiriasi tarpusavyje 202 nukleotidais. Be to, šiose sekose nustatyta 153 VNP ir 46 parsimoniškai informatyvios vietos. Remiantis šiais duomenimis buvo sudaryta dendrograma (20 pav.). Dendrogramoje akivaizdžiai matyti, kad visi valgomus vaisius vedantys sausmedžiai sudaro vieną klasterį. Tai rodo šios grupės monofiletiškumą. Atskirą klasterį sudaro *Valeriana jatamansi* ir *Patrinia gibbosa* rūšių pavyzdžiai.

26 lentelė. *Lonicera* L. genties atstovų cpDNR nustatytų sekų palyginimas su panašiomis, GenBank® duomenų bazėje registruotomis, sekomis

cpDNR seka	Nr.	DB GeneBank® pasiekimo kodas	Esamas panašumas*	Sekos ilgis nt	Patikimumas	Atitikimas (%)
<i>trnH-psbA</i>	1	FJ493273.1	<i>Lonicera xylosteum</i>	457	845	100
	2	DQ006165.1	<i>Lonicera maackii</i>	414	508	92
	3	GQ435472.1	<i>Lonicera fulvotomentosa</i>	339	499	95
	4	GQ435289.1	<i>Lonicera dasystyla</i>	340	484	94
	5	GU135313.1	<i>Lonicera japonica</i>	441	661	98
	6	GQ435288.1	<i>Lonicera macranthoides</i>	345	433	91
	7	GU477687.1	<i>Valeriana jatamansi</i>	267	152	93
	8	AY794229.1	<i>Patrinia gibbosa</i>	276	227	100
<i>5'rpS12-rpL20</i>	1	AY582139.1	<i>Panax ginseng</i>	+	1070	88
	2	DQ383816.1	<i>Lactuca sativa</i>	+	1013	87
	3	DQ898156.1	<i>Daucus carota</i>	+	965	86
	4	AJ316582.1	<i>Atropa belladonna</i>	+	1009	86
	5	Z00044.2	<i>Nicotiana tabacum</i>	+	913	85
<i>trnL-trnF</i>	1	AF366905.1	<i>Lonicera caerulea var. edulis</i>	937	1663	98
	2	AJ430980.1	<i>Lonicera orientalis</i>	970	1580	96
	3	GQ305436.1	<i>Lonicera rupicola</i>	927	1657	98
	4	GQ305438.1	<i>Lonicera trichosantha</i>	928	1648	98
	5	GQ305437.1	<i>Lonicera graebneri</i>	923	1633	98
	6	AF446963.1	<i>Lonicera nervosa</i>	938	1616	97
	7	GU168707.1	<i>Lonicera involucrata</i>	925	1611	98
	8	GU168708.1	<i>Lonicera maackii</i>	903	1607	98
	9	GQ305435.1	<i>Lonicera japonica</i>	915	1596	98
	10	GQ305439.1	<i>Lonicera tangutica</i>	863	1498	97
	11	GQ305434.1	<i>Lonicera sempervirens</i>	949	1565	97
	12	GU168709.1	<i>Lonicera maximowiczii</i>	815	1349	96
	13	AF446964.1	<i>Symphoricarpos orbiculatus</i>	948	1533	95
	14	AF446966.1	<i>Heptacodium miconioides</i>	954	1531	95
	15	AJ430981.1	<i>Diervilla rivularis</i>	1358	1535	94
	16	AF366906.1	<i>Triosteum himalayanicum</i>	922	1498	95
	17	AF446962.1	<i>Leycesteria formosa</i>	971	1592	96
	18	AF446970.1	<i>Dipelta yunnanensis</i>	961	1454	93
	19	GU168692.1	<i>Abelia engleriana</i>	936	1450	94
	20	AF446968.1	<i>Weigela hortensis</i>	950	1445	94
<i>trnS-psbZ</i>	1	FJ640693.1	<i>Patrinia triloba</i>	811	1112	91
	2	FJ640694.1	<i>Triplostegia glandulifera</i>	810	1051	90
	3	FJ640698.1	<i>Succisa pratensis</i>	812	1026	89
	4	FJ640700.1	<i>Pseudoscabiosa grosii</i>	809	1022	89
	5	FJ640697.1	<i>Bassecoia siamensis</i>	813	1020	89
	6	FJ640696.1	<i>Bassecoia bretschnideri</i>	812	1020	89
	7	FJ640692.1	<i>Morina longifolia</i>	810	1018	89
	8	FJ640702.1	<i>Pseudoscabiosa saxatilis</i>	807	1014	89
	9	FJ640701.1	<i>Pseudoscabiosa limonifolia</i>	807	1014	89
	10	FJ640709.1	<i>Cephalaria zeyheriana</i>	814	1011	89
	11	FJ640707.1	<i>Cephalaria paphlagonica</i>	819	1009	89
	12	FJ640703.1	<i>Dipsacus fullonum</i>	818	1009	89
	13	FJ640743.1	<i>Lomelosia stellata</i>	813	1003	89
	14	FJ640706.1	<i>Cephalaria leucantha</i>	816	1002	88
	15	FJ640722.1	<i>Knautia arvensis</i>	814	1000	88
	16	FJ640695.1	<i>Bassecoia sp.</i>	809	1000	89
	17	FJ640745.1	<i>Lomelosia graminifolia</i>	812	992	88
	18	FJ640719.1	<i>Knautia macedonica</i>	813	992	88
	19	FJ640718.1	<i>Knautia dinarica</i>	815	989	88
	20	FJ640738.1	<i>Pterocephalus pulverulentus</i>	833	976	88

26 lentelės tęsinys

cpDNR seka	Nr.	DB GeneBank <sup>®</sup> pasiekimo kodas	Esamas panašumas	Sekos ilgis nt	Patikimumas	Atitikimas (%)	
<i>trnS-trnG</i>	<i>5'trnG2S</i>	1	FJ217936.1	<i>Lonicera steveniana</i>	674	1210	98
		2	FJ217927.1	<i>Lonicera demissa</i>	674	1210	98
		3	FJ217910.1	<i>Lonicera floribunda</i>	674	1210	98
		4	FJ217890.1	<i>Lonicera heteroloba</i>	674	1205	98
		5	FJ217905.1	<i>Lonicera ruprechtiana</i>	674	1194	98
		6	FJ217938.1	<i>Lonicera korolkowii</i>	674	1188	98
		7	FJ217931.1	<i>Lonicera serreana</i>	671	1186	98
		8	FJ217916.1	<i>Lonicera myrtilloides</i>	671	1186	98
		9	FJ217917.1	<i>Lonicera morrowii</i>	674	1177	98
		10	FJ217941.1	<i>Lonicera tomentella</i>	671	1175	98
		11	FJ217912.1	<i>Lonicera caerulea</i>	673	1166	97
		12	FJ217904.1	<i>Lonicera obovata</i>	674	1166	97
		13	FJ217930.1	<i>Lonicera trichosantha</i>	669	1162	97
		14	EU265389.1	<i>Lonicera xylosteum</i>	635	1162	99
		15	EU265385.1	<i>Lonicera koehneana</i>	635	1162	99
		16	EU265342.1	<i>Lonicera chrysantha</i>	635	1162	99
		17	FJ217891.1	<i>Lonicera caprifolium</i>	674	1160	97
		18	FJ217925.1	<i>Lonicera maximowiczii</i>	670	1157	97
		19	FJ217920.1	<i>Lonicera oresbia</i>	673	1155	97
		20	FJ217908.1	<i>Lonicera giraldii</i>	673	1155	97
		21	FJ217897.1	<i>Lonicera implexa</i>	674	1155	97
		22	FJ217895.1	<i>Lonicera henryi</i>	672	1147	97
		23	FJ217903.1	<i>Lonicera hemsleyana</i>	655	1136	97
		24	FJ217898.1	<i>Lonicera chrysantha</i>	630	1129	98
		25	FJ217884.1	<i>Lonicera oblongifolia</i>	664	1129	97
		26	FJ217932.1	<i>Lonicera involucrata</i>	664	1123	96
		27	FJ217922.1	<i>Lonicera subsessilis</i>	630	1123	98
		28	FJ217914.1	<i>Lonicera koehneana</i>	630	1123	98
		29	FJ217902.1	<i>Lonicera xylosteum</i>	630	1123	98
		30	FJ217885.1	<i>Lonicera ledebourii</i>	664	1123	96
<i>trnS-trnG</i>	<i>5'trnG2G</i>	1	GQ305396.1	<i>Lonicera trichosantha</i>	603	1086	99
		2	GQ305394.1	<i>Lonicera rupicola</i>	603	1081	99
		3	GQ305395.1	<i>Lonicera graebneri</i>	596	1062	98
		4	GQ305393.1	<i>Lonicera japonica</i>	602	1062	98
		5	GQ305392.1	<i>Lonicera sempervirens</i>	596	1035	97
		6	GQ305397.1	<i>Lonicera tangutica</i>	574	1022	98
		7	GQ305391.1	<i>Leycesteria formosa</i>	605	1061	98
		8	GQ305376.1	<i>Symphoricarpos rotundifolius</i>	605	1061	98
		9	GQ305372.1	<i>Symphoricarpos microphyllus</i>	605	1061	98
		10	GQ305388.1	<i>Triosteum perfoliatum</i>	605	1050	97
		11	GQ305385.1	<i>Symphoricarpos orbiculatus</i>	605	1050	97
		12	GQ305398.1	<i>Heptacodium miconioides</i>	582	837	92
<i>rpS16</i>	1	AJ431104.1	<i>Lonicera orientalis</i>	861	1528	98	
	2	GQ997448.1	<i>Lonicera japonica</i>	1140	1530	96	
	3	AJ431105.1	<i>Diervilla rivularis</i>	858	1308	94	
	4	AJ431106.1	<i>Dipsacus sativus</i>	824	1103	89	
	5	AJ431107.1	<i>Linnaea borealis</i>	840	1229	93	
	6	AJ431108.1	<i>Morina longifolia</i>	857	1162	91	
	7	AJ431109.1	<i>Valeriana hirtella</i>	856	913	86	
Iš viso: 97 +5				Atitikimo vid.: 94,52 ± 4,2			

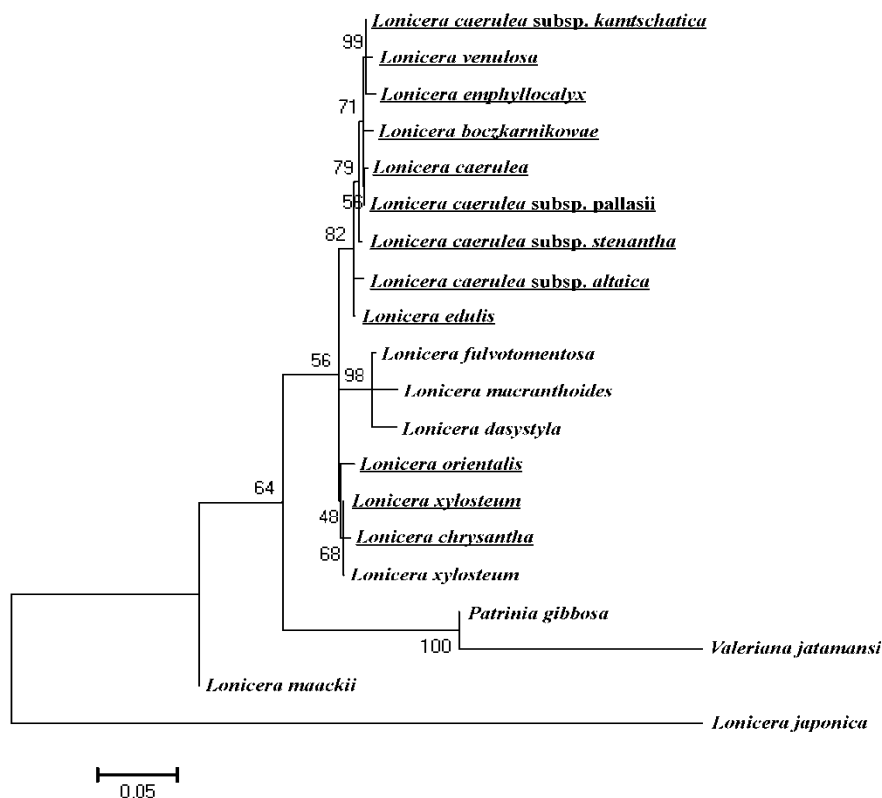
\* – pateikiamos rūšys, kurių cpDNR sekos, užregistruotos duomenų bazėse, buvo panašiausios.

**27 lentelė.** Nustatytų cpDNR sekų palyginimas su homologiškais NCBI duomenų bazėse užregistruotomis sekomis

Statistika	Iš viso	<i>trnH-psbA</i>	<i>trnL-trnF</i>	<i>trnS-trnG</i>		<i>rpS16</i>	<i>trnS-psbZ</i>
				5' <i>trnG2S</i>	5' <i>trnG2G</i>		
Pavyzdžių skaičius	169	20	32	42	24	19	32
Palyginamų fragmentų ilgiai (bp)		267–481	815–1358	630–880	574–786	824–1187	807–994
Analizuojamos DNR sekos dydis (nt)	6125	655	1615	885	787	1140	1043
Konservatyvios sekų vietos (nt)	4175	298	718	820	716	759	864
Kintančios sekų vietos	1136	202	476	65	68	171	154
Pi*	599	46	383	28	11	54	77
Vieno nukleotido polimorfizmai (VNP)	528	153	93	37	57	111	77

\* – Pi – parsimoniškai informatyvios sekų vietos (angl. Parsimony informative character)

Aptariamų sekų filogenetinė analizė parodė, kad mūsų nustatyta *L. xylosteum* cpDNR *trnH-psbA* seka labai panaši į *L. xylosteum* seką iš duomenų bazės, tačiau neidentiška. Šie skirtumai atsirado dėl mūsų lyginamose sekose aptiktų iškritų ir intarpų.



**20 pav.** *Lonicera* L. genties pavyzdžių ir dviejų giminingų *Caprifoliaceae* šeimos rūšių *P. gibbosa* ir *V. jatamansi* giminingumo dendrograma, sudaryta remiantis *trnH-psbA* regiono sekoskaitos duomenimis, naudojant ML statistinį analizės metodą ir Tamura-Nei modelio algoritimą. Įkėlų vertės (%) gautos atlikus 1000 iteracijų. Mūsų tirtų pavyzdžių pavadinimai pabraukti

Reikia pažymėti, kad šios rūšies individų cpDNR polimorfizmą aprašė ir Theis ir kt. (2008). Mūsų gauti rezultatai rodo, kad *L. xylosteum* rūšiai artimiausia yra *L. chrysantha* rūšis, o *L. orientalis* rūšis kiek labiau genetiškai nutolusi (20 pav.).

Atskirą klasterį sudaro ir *L. fulvotomentosa*, *L. macranthoides* ir *L. dasystyla* rūšys. Šios trys rūšys dendrogramoje užima tarpinę padėtį tarp valgomus vaisius vedančių sausmedžio rūšių-porūšių grupės ir *L. xylosteum* – *L. chrysantha* – *L. orientalis* rūšių. *trnH-psbA* regiono analizė rodo, kad didžiausiu savitumu iš visų mūsų ištirtų sausmedžio rūšių pasižymi iš Rytų Azijos regionų kilę ir mažiau kitoms sausmedžio rūšims gimingos *L. japonica* ir *L. maackii* rūšys.

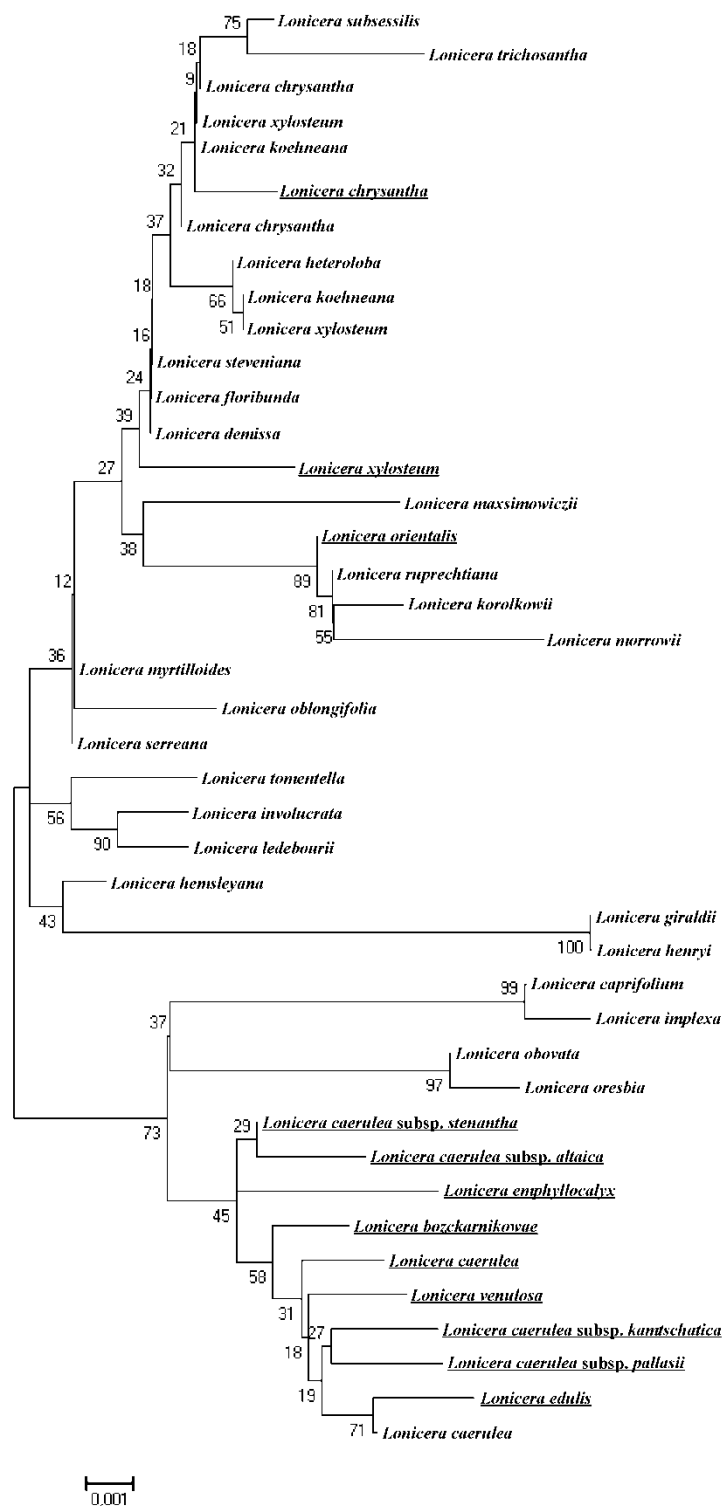
*trnL-trnF* regiono sekų palyginimas su duomenų bazėse registruotomis sekomis parodė, kad mūsų nustatytos sekos panašios į dvyliką *Lonicera* L. genties rūšių sekų. Kitos sekos, kurios pateikiamos 26-oje lentelėje, nustatytos *Caprifoliaceae* šeimos rūšyse. Nustatyta *trnL-trnF* regiono seka panašiausia į tas registruotais sekas, kurias pateikia Bell (2004, 2010), Bremer ir kt. (2002), Zhang ir kt. (2003). Mūsų nustatyta *L. edulis* Turcz. ex Freyn rūšies šio regiono seka labai panaši į duomenų bazėje užregistruotas *L. caerulea* var. *edulis* šio regiono sekas (Zhang et al., 2003). Palyginę 1020 nt ilgio sekas nustatėme, kad jos skiriasi tik dviem nukleotidais. Mūsų nustatyta seka ir duomenų bazėse užregistruotos *Lonicera orientalis trnL-trnF* regiono sekos skiriasi dvylika nukleotidų. Atlikę cpDNR *trnL-trnF* regiono 32-jų sekų, kurių dydis nuo 815 bp iki 1358 bp, daugybinį palyginimą, gavome apibendrintą 1615 nukleotidų seką. Palyginę su ja analizuojamas sekas, nustatėme 476 variabilias vietas, tarp jų 93 VNP lokusus. Analizuojamose sekose buvo 383 parsimoniškai informatyvios vietos (27 lentelė).

cpDNR *trnS-psbZ* regionas pasižymi santykinai mažu sekų kintamumu palyginti su kitais mūsų tirtais cpDNR regionais. Iki šiol *Lonicera* L. genties augaluose šis regionas netirtas, todėl duomenų bazėse panašiausias sekas aptikome tik *Caprifoliaceae* šeimai artimų rūšių augaluose (Carlson et al., 2009). Atlikę cpDNR *trnS-psbZ* regiono 32-jų sekų, kurių dydis nuo 807 bp iki

994 bp, daugybinį palyginimą, gavome apibendrintą 1043 nukleotidų seką. Palyginę su ja analizuojamas sekas, nustatėme 154 variabilias vietas, 77 VNP bei tiek pat parsimoniškai informatyvių vietų (27 lentelė).

cpDNR *rpS16* geno, koduojančio ribosomos baltymą, introno sekos, kurios buvo nustatytos *Lonicera* L. genties augaluose, pasižymėjo specifiskumu. Duomenų bazėse pavyko aptikti tik septynias patikimai panašias sekas (26 lentelė). Dvi iš jų priklausė *Lonicera* L. genties rūšių augalams (Bremer et al., 2002; Moore et al., 2010). Mūsų nustatytos ir duomenų bazėje aptiktos *L. orientalis* rūšies *rpS16* geno introno sekos skyrėsi šešiais nukleotidais. Atlikę 19-os sekų, kurių ilgiai variavo nuo 824 bp (*Dipsacus sativus*) iki 1140 bp (*L. japonica*), daugybinį palyginimą ir filogenetinę analizę, gavome apibendrintą 1140 nukleotidų ilgio seką (27 lentelė). cpDNR *rpS16* geno introno sekų analizė parodė, kad palyginamose sekose yra 716 konservatyvių vietų, 171 variabili vieta ir 54 parsimoniškai informatyvios vietos.

Atlikę cpDNR *trnS-trnG* regiono 5'*trnG2S* dalies sekų palyginimą su duomenų bazėse užregistruotomis sekomis, nustatėme, kad mūsų nustatytos sekos ir daugiau kaip šimtas *Lonicera* L. genties augalų rūšių sekų yra panašios (Theis et al., 2008; Smith, 2009). Kaip matyti iš 26-oje lentelėje pateiktų duomenų, mūsų nustatytos sekos šiek tiek skiriasi palyginti su *L. caerulea*, *L. chrysantha* (dviejų pavyzdžių) ir *L. xylosteum* (dviejų pavyzdžių) sekomis. Išsamus šių sekų palyginimas parodė, kad mūsų nustatytos ir duomenų bazėse esančios *L. caerulea* sekos skyrėsi dviem intarpais ties 152 – 164 nukleotidais ir ties 222 – 237 nt bei dviem VNP. Mūsų nustatyta *L. chrysantha* rūšies 5'*trnG2S* seka sutapo su duomenų bazėse pateikta *L. chrysantha* seka. *L. xylosteum* pavyzdžiai skyrėsi trimis nukleotidais. Atlikę *Lonicera* L. genties rūšių cpDNR *trnS-trnG* regiono 5'*trnG2S* dalies 30-ies sekų, užregistruotų duomenų bazėse, ir mūsų nustatytų 12-os sekų daugybinį palyginimą, gavome apibendrintą 885 nukleotidų seką. Nustatėme 820 konservatyvių vietų, 65 polimorfines, 28 parsimoniškai informatyvias vietas, o taip pat 37 VNP (27 lentelė). Atlikus šio cpDNR regiono sekų pavyzdžių filogenetinę analizę buvo nubraižyta filogenetinė dendrograma (21 pav.).



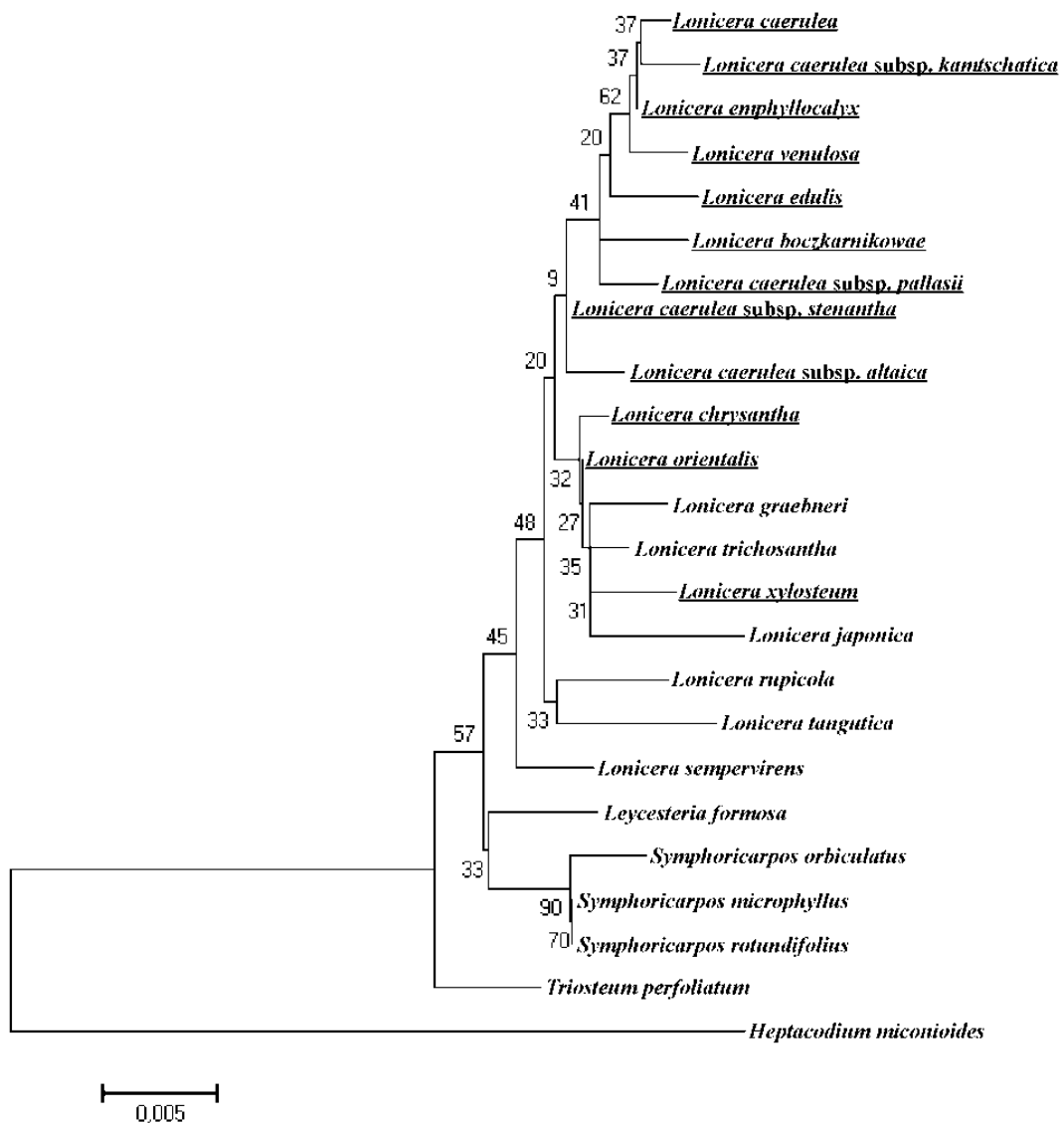
21 pav. *Lonicera* L. genties keturiasdešimt dviejų pavyzdžių giminingumo dendrograma, sudaryta remiantis *trnS-trnG* (5'*trnG2S*) regiono sekoskaitos duomenimis. Į palyginimą įtraukta dvylika nustatytų sekų ir trisdešimt iš NCBI GenBank® duomenų bazės. Filogenetinė dendrograma sudaryta naudojant ML statistinį analizės metodą, taikant Tamura-Nei modelį. Įkėlų vertės (%) gautos atlikus 1000 iteracijų. Mūsų tirtų *Lonicera* L. genties taksonų pavyzdžių pavadinimai pabraukti



Dvidešimt pirmame paveiksle matyti, kad visi analizuoti *L. chrysantha* pavyzdžiai sudaro vieną klasterį kartu su *L. subsessilis*, *L. trichosantha*, *L. xylosteum*, *L. koehneana* rūšių pavyzdžiais. *L. chrysantha* pavyzdžiai tarpusavyje skiriasi nežymiai. Didesnis skirtumas yra tarp *L. xylosteum* pavyzdžių, kurie nors ir grupuojasi tame pačiame dendrogramos klasteryje, tačiau yra labiau genetiškai nutolę. Kiti autoriai taip pat nurodo šios rūšies pavyzdžių cpDNR sekų skirtumus (Theis et al., 2008). Kadangi mūsų nustatyta *L. caerulea* rūšies 5' *trnG2S* regiono seka skiriasi dviem intarpais ir dviem VNP palyginti su duomenų bazėse užregistruotomis sekomis, tai šios rūšies padėtis dendrogramoje nesutampa su padėtimi, kuri nustatoma naudojant duomenų bazėse registruotą seką.

Palyginę cpDNR *trnS-trnG* regiono 5' *trnG2G* dalies sekas su duomenų bazėse užregistruotomis, aptikome 12 sekų, kurios panašios į mūsų nustatytąsias. Iš pastarųjų septynios priklausė *Lonicera* L. genties rūšių augalams (Bell, 2010) (26 lentelė).

Atlikę šio cpDNR regiono 24-ių sekų daugybinę analizę, nustatėme apibendrintą 787 nt seką, kurioje 716 nt yra konservatyvūs, 68 nt – polimorfiniai, tarp kurių – 57 VNP ir 11 parsimoniškai informatyvių (27 lentelė). Atlikus šio cpDNR regiono sekų pavyzdžių filogenetinę analizę buvo nubraižyta filogenetinė dendrograma, kurioje visi tirti valgomus vaisius vedančių sausmedžių atstovai grupuojasi kartu (22 pav.).



**22 pav.** *Lonicera* L. genties pavyzdžių giminingumo dendrograma, sudaryta remiantis cpDNR *trnS-trnG* regiono 5' *trnG2G* dalies sekoskaita. Į palyginimą įtraukta dvylika nustatytų sekų ir dvylika paimtų iš duomenų bazės. Dendrograma sudaryta naudojant ML statistinį analizės metodą, taikant Tamura-Nei modelį. Įkėlių vertės (%) gautos atlikus 1000 iteracijų. Mūsų tirtų *Lonicera* L. genties taksonų pavyzdžių pavadinimai pabraukti

## IV. REZULTATŲ APITARIMAS

### 1. *Lonicera L.* genties pavyzdžių polimorfizmas VU Botanikos sodo kolekcijoje

Naujų veislių kūrimas labai priklauso nuo genetinių kolekcijų, kuriose sukaupti genotipai, pasižymintys vertinga ir prieinama genetinė įvairove. Nuo 1979 m., kai buvo įkurta VU Botanikos sodo sausmedžių kolekcija, joje sukaupta daugiau kaip šimtas (134) pavyzdžių, atstovaujančių skirtingas rūšis, porūšius, veisles ir genetines linijas. Daugiausia kolekcijoje yra *L. caerulea L.* rūšies atstovų. Kai kurios laukinės rūšys (pvz., *L. chrysantha*, *L. orientalis* ir kt.) neturi komercinės reikšmės, tačiau gali pasitarnauti kaip genetinės įvairovės šaltinis ir naudingų genų, nulemiančių atsparumą kenkėjams ir ligoms, donorais. Pavyzdžiui, Japonijos mokslininkai Miyashita ir Hoshino (2010), norėdami padidinti *L. caerulea* genetinę įvairovę ir pagerinti agrotechnines savybes, tiria šios rūšies hibridizaciją su *L. gracilipes* var. *globra*.

Norint efektyviai panaudoti kolekciją, būtinas ir jos genetinės įvairovės įvertinimas, nes morfologinių žymenų įvairovės tam nepakanka. Augalų genetines savybes geriausia tirti naudojant DNR žymenis (Weising et al., 2005). Gana seniai DNR žymenys vertinami kaip svarbi ir veiksminga priemonė genetinėms kolekcijoms ir genų bankams tvarkyti, genetinės įvairovės panaudojimui selekcijos programose (Rafalski, Tingey, 1993). Daugybė tyrimų parodė, kad RAPD metodas yra vienas tinkamiausių genetinei įvairovei įvertinti (Angiolillo et al., 2006; Carelli et al., 2006; Sensoy et al., 2007; Cordeiro et al., 2008). Šį metodą panaudojome VU Botanikos sodo sausmedžių kolekcijos genetinei įvairovei nustatyti, kolekciniam sausmedžio pavyzdžiams genotipuoti, genetinių linijų, kaip papildomo genetinės įvairovės šaltinio, potencialui įvertinti. Tyrimo pradžioje atlikome RAPD pradmenų atranką, t.y. parinkome oligonukleotidinius pradmenis, tinkamus *Lonicera L.* tyrimams ir nustatėme patikimai atsikartojančius RAPD žymenis. Pradmenų

atranka vyko dviem etapais. Pirmiausia išbandėme 20 pradmenų, su kuriais ištyrėme 40 skirtingo taksonominio statuso *Lonicera* L. genotipų. Tyrimas parodė, kad DNR polimorfizmas, nustatomas RAPD metodu, yra pakankamas net labai genetiškai artimiems sausmedžio augalams genotipuoti. Eksperimento metu buvo genotipuoti visi pavyzdžiai, išskyrus du 'Regel-683' klonus. Taip pat buvo nustatyta daug polimorfinių DNR lokusų – 84,3%. Identifikuojant genotipus mūsų tirtose 40-ties individų grupėje, DNR polimorfizmas, įvertintas RAPD metodu, buvo daug informatyvesnis už morfologinę įvairovę. Antrame šio tyrimo etape, išbandę papildomai dar 30 oligonukleotidinių pradmenų ir įvertinę abiejų eksperimentų rezultatus, pasirinkome 12 pradmenų tolimesniems kolekcijos tyrimams. Panašų pradmenų skaičių įvairių augalų rūšių kolekcijoms tirti naudojo ir nemažai kitų autorių (Gimenes et al., 2000; Carelli et al., 2006; Sensoy et al., 2007; Cordeiro et al., 2008). Su šiais dvylika pradmenų nustatėme šimte genotipų 149 RAPD lokusus ir didelį jų polimorfizmą – 88,1%. Įvertinus DNR polimorfizmą genotipų grupėse, atstovaujančiose rūšis, porūšius, veisles ir genetines linijas, didžiausias polimorfizmas, kaip ir tikėtasi, buvo nustatytas tarp rūšių pavyzdžių (97,8%), mažiausias – genetinių linijų grupėje (73,9%) (16 lentelė). Remiantis turimais duomenimis, galime teigti, kad mūsų pradėtas melsvauogio sausmedžio kolekcijos tyrimas naudojant molekulinis žymenis, yra pirmasis paskelbtas tokio pobūdžio šios rūšies tyrimas (Naugžemys et al., 2007). Šiame tyrime atrinkti kai kurie oligonukleotidiniai pradmenys vėliau buvo panaudoti kitų mokslininkų atliktuose *L. caerulea* L. var. *emphyllocalyx* ir *L. gracilipes* var. *glabra* Miquel tarprūšinių hibridų tyrimuose (Miyashita, Hoshino, 2010). Neseniai paskelbtas *L. caerulea* L. keturiolikos pavyzdžių iš Lenkijos ir Rusijos genetinės įvairovės tyrimas ISSR žymenų metodu (Smolik et al., 2010). Šiame darbe, naudojant 11 atrinktų ISSR pradmenų, nustatyti 129 ISSR lokusai, iš kurių 64% buvo polimorfiniai. Atsižvelgiant į tai, kad RAPD ir ISSR lokusai genome skiriasi, bei į tai, kad pastarajame darbe buvo tirtas žymiai mažesnis pavyzdžių, kurie priklausė tik *L. caerulea* L. polimorfinei

rūšiai, skaičius, nustatytas mažesnis genetinės įvairovės lygis neprieštarauja mūsų tyrimuose gautiems rezultatams.

## **2. Melsvauogio sausmedžio genetinių linijų selekcinės galimybės**

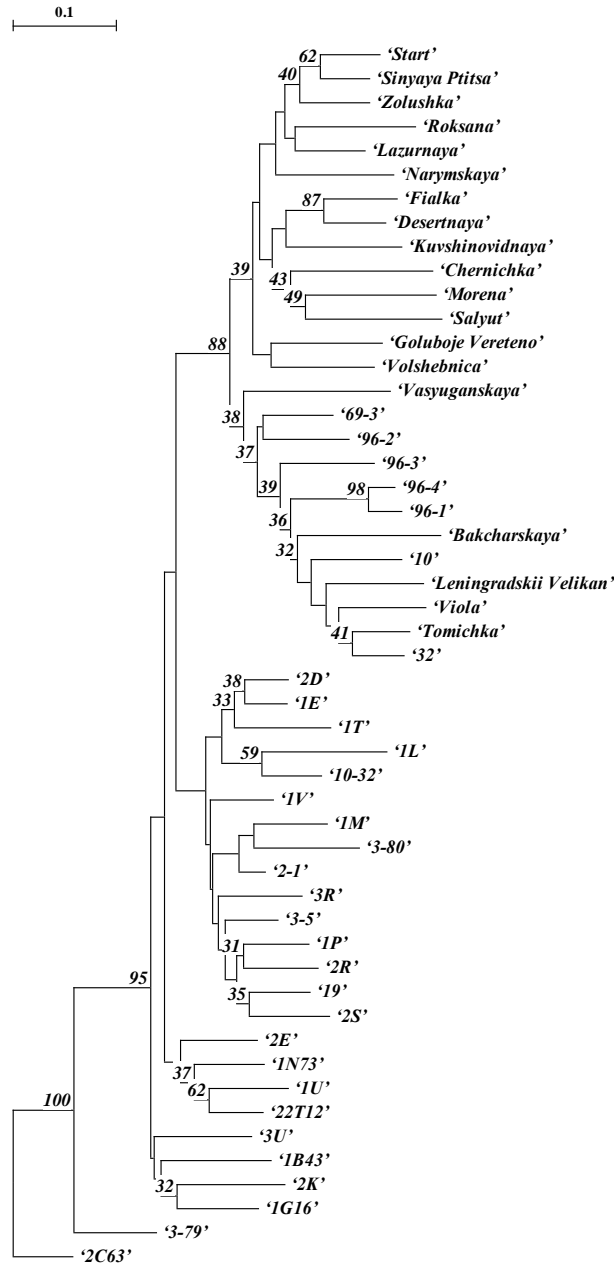
Tam tikros kultūrinių augalų rūšies genetinės bazės praplėtimas šiuolaikinėje selekcijoje yra labai aktualus, kadangi vykdant selekcijos programas panaudojama tik nedidelė gamtinėse populiacijose randamos genetinės įvairovės dalis (Baur, 1914; Haskell, 1960; Mekbib, 2008; Wouw et al., 2009). Dėl šios priežasties kultūrinius augalus labiau pažeidžia nepalankios sąlygos, įvairūs kenkėjai bei ligos. Ne išimtis ir melsvauogis sausmedis. Nors selekcinio požiūriu tai nauja kultūra, tačiau jos selekcija vis dažniau vykdoma naudojant jau sukurtas veisles. Kaip rodo įvairių autorių darbai, gamtinės įvairių rūšių populiacijos – labai svarbus papildomos genetinės medžiagos šaltinis (Stalker, 1980; Cox et al., 1984; Sharma et al., 2003; Wouw et al., 2009). Plečiant tam tikros kultūros genetinę bazę galima panaudoti tiek tos pačios rūšies gamtinių populiacijų, tiek giminingų rūšių genetinę medžiagą (Cooper et al., 2001; Miyashita, Hoshino, 2010). Kadangi morfologiniai žymenys pasižymi mažesne įvairove ir labai priklauso nuo aplinkos sąlygų, tai savo darbe, norėdami įvertinti VU Botanikos sode esančių sausmedžio genetinių linijų, kilusių iš gamtinių populiacijų, potencialą genetinei veislių įvairovei didinti, naudojome RAPD žymenis. Įvertinome 32-jų genetinių linijų ir 19-os elitinių veislių genetinę diferenciaciją. DNR polimorfizmas, nustatytas naudojant dvylika oligonukleotidinių pradmenų, buvo pakankamas pasirinktiems elitinių veislių ir genetinių linijų pavyzdžiams genotipuoti (7 pav.). Genetinis giminingumas, nustatytas UPGMA metodu, daugeliu atvejų atitiko turimus genealoginius tirtų veislių duomenis (7 lentelė). Tai rodo, kad šie žymenys yra tinkami ne tik genetiniam panašumui tirtų veislių grupėje, bet taip pat veislių ir genetinių linijų panašumui bei skirtumui įvertinti. Panašius rezultatus, rodančius, kad molekuliniai ir genealoginiai duomenys koreliuoja, gavo ir kiti autoriai (Doldi et al., 1997; Кудрявцев и др., 2003; Raddová et al.,

2003). Pavyzdžiui, Doldi ir kt. (1997), vertindami 18 sojos varietetų (varietetai buvo atrinkti selekcijos programai, skirtai baltymingumui didinti veislėse, adaptuotose Centrinės Europos sąlygoms), genetinę įvairovę nustatė, kad RAPD ir SSR žymenų pagrindu nubraižytas giminingumo medis labai gerai atitinka turimus genealoginius duomenis. Remdamiesi savo bei kai kurių kitų autorių rezultatais, galime teigti, kad veislių ir linijų genetinio giminingumo UPGMA dendrograma objektyviai atspindi šių dviejų genotipų grupių panašumus ir skirtumus. Tai patvirtina ir genetinio panašumo įvertinimas NJ metodu (23 pav.) bei principinių koordinačių analizė (PCoA). Nors UPGMA ir NJ metodai pagrįsti skirtingais principais, gauti rezultatai rodo panašius veislių ir genetinių linijų skirtumus. PCoA taip pat rodo, kad aptariamų grupių augalai dvimatėje koordinačių erdvėje linkę grupuotis atskirai (24 pav.).

Kaip jau minėta, genetinės linijos buvo sukurtos naudojant gamtinių populiacijų genetinę medžiagą. Dauguma šių linijų UPGMA dendrogramoje patenka į antrą klasterį, turinį 63% įkėlų statistinį palaikymą (7 pav.). Kadangi tik nedidelis genetinių linijų skaičius grupavosi kartu su veislėmis, gauti rezultatai rodo daugumos genetinių linijų genetinės medžiagos savitumą.

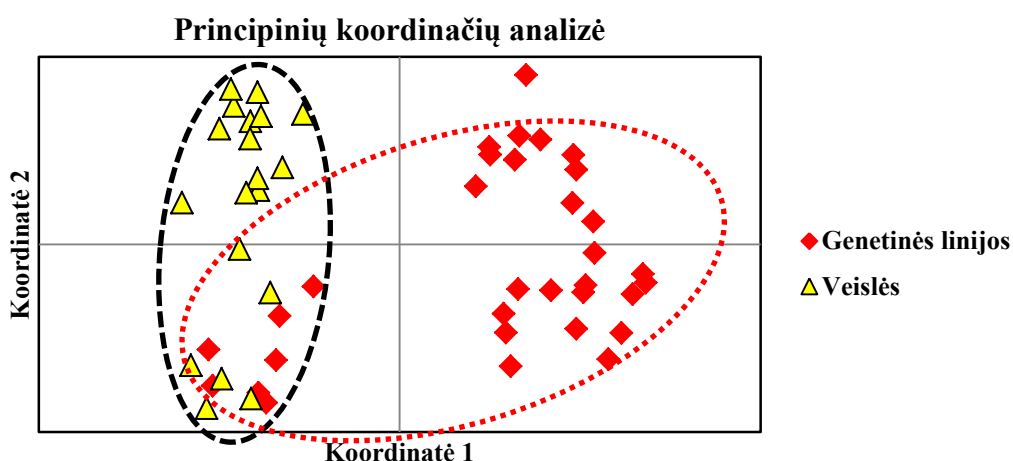
Kai kurie autoriai, norėdami įvertinti genetinės įvairovės pasiskirstymą tarp tam tikromis savybėmis besiskiriančių augalų grupių, naudoja ir AMOVA metodą (Jakse et al., 2004, Carelli et al., 2006, Soleimani et al., 2007), kuris tradiciškai taikomas populiacijų genetikoje, kai analizuojami dominuojančiu paveldėjimo pobūdžiu pasižymintys DNR žymenys (pavyzdžiui, RAPD, AFLP, ISSR) (Nybom, 2004; Jogaitė et al., 2006; Patamsytė et al., 2010). AMOVA metodu gauti rezultatai taip pat patvirtino, kad šios dvi genotipų grupės reikšmingai skiriasi viena nuo kitos. Nors didžioji genetinės įvairovės dalis yra bendra, tačiau žymi jos dalis (18,9%) yra būdinga atskiroms grupėms.

Iki šiol taksonominis *L. caerulea* vertinimas nevienareikšmis (Плеханова, Ростова 1994; Janick, Paull, 2008), pasitaiko nemažai painiavos pavadinimuose. Tvarkant melsvauogio sausmedžio kolekcijas ar vykdant hibridų analizę, pravartu turėti žymenis, specifiskai identifikuojančius rūšį.



**23 pav.** *L. caerulea* L. veislių ir genetinių linijų pavyzdžių genetinė įvairovė pagal RAPD lokusus. Dendrograma sudaryta NJ metodu pagal RAPD duomenis. Įkėlų vertės gautos atlikus 1000 iteracijų

Kaip matyti devintame paveiksle, A02<sub>570</sub> žymuo yra būdingas visų veislių, genetinių linijų ir tirtų porūšių pavyzdžių RAPD profiliams.



**24 pav.** Melsvauogio sausmedžio genetinių linijų ir veislių pavyzdžių principinė koordinačių analizė

Dėl to galima manyti, kad šis lokusas gali būti *L. caerulea* tetraploidinei polimorfinei rūšiai savitu žymeniu. A02<sub>570</sub> žymuo nenustatytas *L. chrysantha* Turcz. ex Ledeb., *L. xylosteum* L., *L. orientalis* Lam., *L. vesicaria* Kom., *L. alpigena* L., *Lonicera x bella* f. *candida* Zabel, *L. praeflorens* Batalin pavyzdžiuose. Šio DNR fragmento iš trijų taksonominiu požiūriu skirtingų pavyzdžių *L. caerulea* L., *L. caerulea* L. subsp. *stenantha* (Pojark.) ir *L. caerulea* L. subsp. *kamtschatica* (Pojark.) klonavimas ir sekoskaita parodė nedidelį polimorfizmą ( $\approx 3,2\%$ ). Atlikę panašių sekų BLAST paiešką duomenų bazėse, homologiškų sekų nenustatėme. Klonuoti skirtingų sausmedžio pavyzdžių DNR fragmentai, nors ir buvo panašūs, bet skyrėsi nežymiai savo nukleotidų sekomis (10 pav.). Šiuos skirtumus galima paaiškinti homologiškų nekoduojančių sekų divergencija. Didesni (apie 9%) vienodo dydžio monomorfinių RAPD fragmentų sekų skirtumai buvo nustatyti *Vitis* spp. veislėse (Böhm and Zyprian 1998). Nkongolo ir kt. (2002) nustatė ir sekvenavo DNR žymenis, kurie buvo saviti vienai iš aštuonių (*Pinus sylvestris*, *P. strobus*, *P. rigida*, *P. resinosa*, *P. nigra*, *P. contorta*, *P. monticola*, *P. banksiana*) ar keletui *Pinus* rūšių. Šiuo atveju sekoskaita atskleidė didelį tirtų skirtingų rūšių sekų panašumą, nors kai kurios pasižymėjo DNR polimorfizmu. Mūsų klonuotas 568 bp fragmentas neturėjo panašumo su žinomais augalų



judriaisiais genomo elementais, todėl gauti rezultatai neprieštarauja Bodénès ir kt. (1997) bei Lu ir kt. (1997) pastebėjimui, kad dalis RAPD fragmentų nėra kilę iš pasikartojančių sekų.

Kadangi RAPD žymenys turi tam tikrų trūkumų, norėjome mūsų identifiкуotą rūšiai savitą lokusą pažymėti labiau patikimu ir aiškesniu – SCAR žymeniu (Paran, Michelmore, 1993). SCAR žymenys gana plačiai naudojami rūšims, veislėms, genotipams ir atsparumo lokusams nustatyti (Paran, Michelmore, 1993; Bodénès et al., 1997; Klinbunga et al., 2000; Filho et al., 2002; Barabaschi et al., 2007). Deja, RAPD žymens konvertavimas į SCAR žymenį nebuvo informatyvus, nes pastarasis prarado RAPD būdingą polimorfizmą. Toks rezultatas leidžia manyti, kad A02<sub>570</sub> tarprūšinių polimorfizmą nulemia mutacijos, atsiradusios vieno iš pradmenų (viršutiniojo, 5' padėtyje) prisijungimo sekoje. Bodénès ir kt. (1997) nustatė, kad RAPD polimorfizmą dažniausiai sukelia taškinės mutacijos pradmenų prisijungimo vietose. Šie autoriai taip pat nustatė, kad apie 50% SCAR žymenų praranda polimorfizmą palyginti su pradiniu RAPD polimorfizmu. Dėl to tokie SCAR žymenys netinka rūšies identifikavimui. Atsižvelgiant į tai, melsvauogio sausmedžio pavyzdžiams identifiкуoti belieka naudoti A02<sub>570</sub> RAPD žymenį, kuris patikimai atsikartoja ir yra tinkamo dydžio (Fahima et al., 1999; Badenes et al., 2004).

Keletas VU Botanikos sodo sausmedžio kolekcijos genetinių linijų nenusileidžia savo agronominėms ir biologinėms savybėms pripažintoms veislėms. Atlikę keturiolikos *L. caerulea* L. genetinių linijų ir septynių veislių kai kurių biologinių ir agrotechninių savybių palyginimą nustatėme, kad kai kurios genetinės linijos ('1L', '2C63', '3U', '3-5', '96-4') pasižymi dideliu uogų svoriu bei atsparumu grybų sukeliams ligoms (Žilinskaitė et al., 2007). Be to beveik visoms šioms linijoms būdingi RAPD lokusai ('1L' – A11<sub>790</sub>; '2C63' – 170-08<sub>490</sub>; 380-01<sub>530</sub>; 380-02<sub>1500</sub>; A09<sub>1031</sub>; '3U' – 170-08<sub>490</sub>; 380-01<sub>530</sub>; 380-02<sub>1500</sub>; A11<sub>790</sub>; '3-5' – 380-01<sub>530</sub>; 380-02<sub>1500</sub>), kurių nėra tirtose elitinėse veislėse.

Apibendrinant melsvauogio sausmedžio genetinių linijų ir elitinių veislių tyrimo rezultatus galima teigti, kad VU Botanikos sodo sausmedžio kolekcijos genetinės linijos yra vertingos selekciniu požiūriu ir gali būti panaudotos kaip papildomos genetinės įvairovės šaltinis kuriant naujas veisles. Panaudojus perspektyviausias genetines linijas ir kai kurias elitines veisles, būtų galima tikėtis gauti vertingus hibridus. Dar vienas ateities uždavinys tiriant šią genetinę medžiagą – tai ūkiniu požiūriu svarbių požymių ir nustatytų molekulinį žymenų sąsajos paieška.

### **3. Sausmedžių filogenetiniai tyrimai**

#### **3.1. RAPD metodo panaudojimas sausmedžių filogenetiniams tyrimams**

Iki šiol RAPD žymenys plačiai naudojami ir įvairių organizmų filogenetiniams ryšiams tirti. Daugeliu atvejų filogenetinių tyrimų rezultatai, gauti RAPD metodu, sutampa su rezultatais, kurie gauti kitais metodais (Kochieva et al., 2002; Katsiotis et al., 2003; Makarevitch et al., 2003; Yang et al., 2008). RAPD juostos dažnai pagausinamos nuo pasikartojančių palindrominių sekų (Williams et al., 1990; Devos, Gale, 1992), kurios svarbios filogenetiniuose ir taksonominiuose tyrimuose (Nkongolo et al., 2001). Mūsų darbe RAPD žymenys buvo svarbūs ir rezultatyvūs nustatant skirtumus tarp įvairių *Lonicera* L. taksonų pavyzdžių. DNR polimorfizmas sausmedžio rūšių grupėje buvo labai didelis – 97,8%. RAPD juostų skirtumus panaudojome filogenetiniams ryšiams tirti *Lonicera* L. genties atstovų grupėje nustatyti. Remiantis molekuliniiais duomenimis ir taikant skirtingus genetinio giminingumo nustatymo metodus (UPGMA ir NJ), buvo nubraižytos filogenetinės dendrogramos. Kaip matyti iš šių dendrogramų (17 ir 18 pav.), genotipų grupavimasis pagal genetinį giminingumą gana gerai atitiko jų morfologinius požymius ir biologines savybes. Visi tirti pavyzdžiai, vienaip ar kitaip susiję su polimorfine *L. caerulea* L. rūšimi, pateko į tą patį klasterį.

Verta pažymėti, kad tarp šių visų *Lonicera* L. genties atstovų yra tokių, kurių vaisiai gali būti naudojami maistui. Sibire ir Tolimuosiuose Rytuose šių rūšių arealai persidengia, vyksta jų tarprūšinė hibridizacija. Raudonas uogas brandinančios sausmedžių rūšys *L. chrysantha* ir *L. xylosteum* dendrogramoje grupuojasi kartu. Į tą patį klasterį patenka ir *L. orientalis*, nors morfologiškai ši rūšis labiau skiriasi nuo minėtų dviejų rūšių. Šių trijų rūšių neabejotiną giminingumą patvirtina aukštos įkėlų vertės ir kitų autorių filogenetinių tyrimų rezultatai (Theis et al., 2008; Smith, 2009). Šių autorių duomenimis, rūšys *L. chrysantha* ir *L. xylosteum* yra ypač artimai giminingos. Dendrogramos, sudarytos naudojant skirtingus metodus, turi ir daugiau panašumų. Tiek UPGMA, tiek NJ metodais sudarytose dendrogramose matyti, kad artimai giminiškos yra *L. caerulea* subsp. *pallasii*, *L. boczkarnikowae* ir *L. caerulea* subsp. *kamtschatica*; *L. edulis* ir *L. caerulea* subsp. *altaica*; *L. emphylocalyx* ir *L. caerulea*. Tačiau *L. caerulea* subsp. *stenantha* ir *L. venulosa* padėtys šiose dendrogramose labai skiriasi. Aiškiai matyti, kad nėra akivaizdaus *L. caerulea* ir jos porūšių grupavimosi, todėl manome, kad porūšių statusas turėtų būti toks pat, kaip ir dažnai atskiromis rūšimis laikomų *L. venulosa*, *L. emphylocalyx*, *L. edulis* ir *L. boczkarnikowae*.

### 3.2. Filogenetinė analizė naudojant sekoskaitos tyrimo duomenis

Siekiant objektyviau įvertinti filogenetinius ryšius, vis dažniau naudojami skirtingi molekuliniai žymenų metodai ir branduolio bei organoidų DNR sekoskaita. Filogenetinės analizės duomenys, pagrįsti molekuliniais tyrimų rezultatais, palyginami su morfologiniais požymiais paremta taksonų klasifikacija (Soltis, Soltis, 2000; Gehrig et al., 2001; Corazza-Nunes et al., 2002; Lee et al., 2004; Theis et al., 2008; Ikegami et al., 2009; Jacobs et al., 2010). Be jau minėtos RAPD analizės, kaip pagrindinį metodą sausmedžio taksonų pavyzdžių filogenetiniams ryšiams nustatyti naudojome nekoduojančių cpDNR regionų sekoskaitą (16 pav.). DNR sekoskaita statistiškai daug patikimesnė ir leidžia sudaryti tikslesnes filogenijos schemas palyginti su

RAPD metodu (Blattner et al., 2001; Gehrig et al., 2001). Filogenetinio tyrimo informatyvumą apsprendžia evoliucinių pokyčių tam tikrame genomo DNR regione greitis, kuris įvairiose organizmų grupėse gali skirtis. Todėl kiekvienai tiriamai organizmų grupei būtina surasti DNR regionus, kurie būtų tinkamiausi filogenetiniams tyrimams. Mūsų ištirtų cpDNR šešių regionų svarba filogenetiniams tyrimams yra nevienoda. Kaip nurodo Shaw ir kt. (2007), cpDNR nekoduojančių regionų variabilumas labai skiriasi ir dažnai filogenetiniams tyrimams yra naudojamos ne pačiu didžiausiu kintamumu pasižyminčios sekos. Autorių nuomone, iki šiol nepakankamai panaudojamos labai variabilios sekos. Dideliu nukleotidų polimorfizmu pasižyminčios sritys labai svarbios nustatant žemiausio rango taksonų filogenetinius ryšius (Gielly, Taberlet, 1994; Shaw et al., 2005). Pavyzdžiui, cpDNR *trnH-psbA* regionas naudojamas augalų DNR brūkšniniam kodui kurti (Kress et al., 2005; Cowan et al., 2006; Kress, Erickson, 2007; Lahaye et al., 2008; Whitlock et al., 2010). Kaip matyti iš filogenetinės dendrogramos, sudarytos remiantis cpDNR *trnH-psbA* regiono sekoskaitos duomenimis (16 A pav.), mūsų ištirtų sausmedžio pavyzdžių sekos aiškiai skiriasi ir dendrogramoje jie grupuojasi į du klasterius. Į pirmąjį klasterį patenka valgomus vaisius vedančių sausmedžių rūšys ir porūšiai artimai giminingi *L. caerulea*, o į antrąjį – *L. chrysantha*, *L. xylosteum* ir *L. orientalis*. Toks šių pavyzdžių grupavimasis klasteriuose panašus į grupavimąsi, gautą RAPD metodu (17 pav.). Be to, šiame cpDNR regione nustatėme daugiausia variabilų vietų – 5,7%. Palyginus mūsų rezultatais pagrįstas filogenetines dendrogramas gautas skirtingais metodais, o taip pat ir su kitų autorių sudarytomis dendrogramomis, galima daryti išvadą, kad *trnH-psbA* regionas yra tinkamas melsvauogio sausmedžio vidurūšinei filogenetinei analizei (Bell, Donoghue, 2005; Ferri et al., 2009; Kress et al., 2009; Chen et al., 2010; Yang et al., 2011). Atlikus pasirinktų sausmedžio taksonų pavyzdžių filogenetinę analizę naudojant trijų kitų cpDNR regionų (*trnS-trnG*, *rpS16* ir *trnS-psbZ*) sekoskaitos duomenis, buvo gauti panašūs rezultatai. Visais atvejais aiškiai atsiskiria *L. caerulea* giminingų taksonų grupė ir *L. chrysantha*, *L. xylosteum* bei *L. orientalis* sausmedžių rūšys (16 D, E, F pav.). Tai dalinai

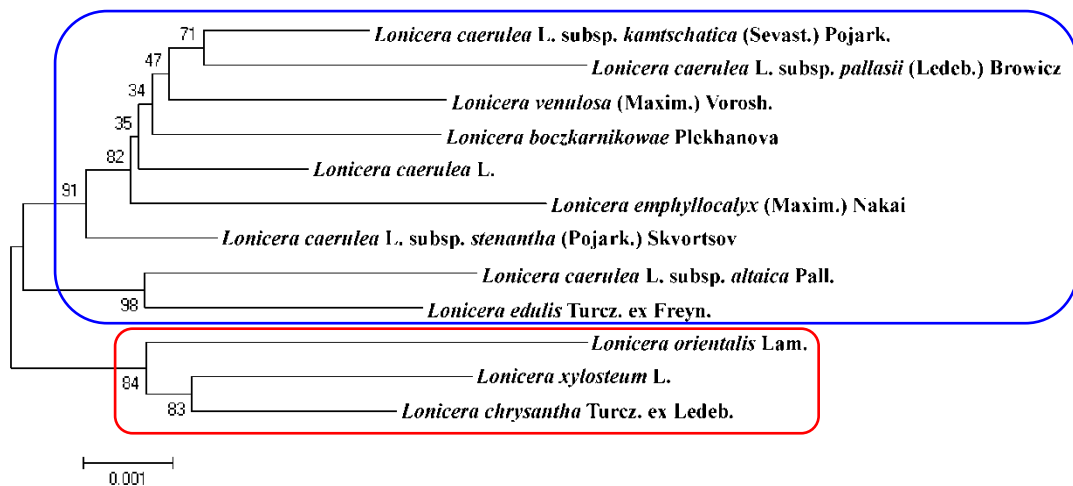
patvirtina ir cpDNR 5'*rpS12-rpL20* regiono sekų filogenetinė analizė (16 B pav.). Šio regiono sekoskaitos duomenis mes pirmieji panaudojome *Lonicera* L. genties ir *Caprifoliaceae* šeimos filogenetiniams tyrimams. Polimorfinių vietų skaičius cpDNR 5'*rpS12-rpL20* regiono sekoje sudarė 5,2%. Šis tarpgentinis tarpiklis pasižymėjo didžiausiu vieno nukleotido polimorfizmu skaičiumi (45 VNP) palyginti su kitų cpDNR regionų tirtomis sekomis (22 lentelė). Gana prieštaringsus rezultatus gavome tirdami cpDNR *trnL-trnF* regioną. Jame nustatėme pakankamą variabilių vietų skaičių (5,3%), tačiau sekoskaitos duomenys, skirtingai nei kitų sekų sekoskaitos rezultatai, nerodė tokio aiškaus *L. caerulea* grupės taksonų pavyzdžių atsiskyrimo nuo *L. chrysantha*, *L. xylosteum* ir *L. orientalis* rūšių grupės. Manome, kad cpDNR *trnL-trnF* regionas yra mažiau informatyvus sausmedžio rūšių filogenetinėje analizėje palyginti su kitais tirtais cpDNR regionais. Tai patvirtina ir kitų autorių tyrimų rezultatai, kurie parodė, kad cpDNR *trnL-trnF* regionas netinka įvairių taksonominių grupių filogenetinei analizei (Hardig et al., 2000; Klak et al., 2003; Muellner et al., 2003; Samuel et al., 2003).

Įvertinome rūšių grupavimąsi pagal kiekvieną ištirtą cpDNR regioną atskirai ir atlikome sausmedžio rūšių ir porūšių filogenetinę analizę, naudodami visas nustatytas sekas bei sudarėme jungtinę filogenetinę dendrogramą (19 pav.). Jungtinė dendrograma buvo nubraižyta ML metodo pagalba, tačiau duomenų analizei pritaikėme ir kitus filogenetinių dendrogramų sudarymo metodus: NJ, ME, UPGMA, MP. ML metodą pasirinkome kaip dažniausiai naudojamą cpDNR regionų sekų analizei (Bell et al., 2001; Bell, Donoghue, 2005; Jacobs et al., 2010; Bell, 2010). Papildomai buvo pritaikytas ir Tamura-Nei modelis (Tamura, Nei, 1993). Jungtinių duomenų pagrindu sudarytoje dendrogramoje (19 pav.) matyti, kad visi sausmedžio pavyzdžiai aiškiai atsiskiria, dauguma medžio šakų yra patikimos, nes jas patvirtina pakankamai aukštos įkėlų vertės. Joje taip pat matyti du klasteriai, į kuriuos grupuojasi *L. caerulea* L. giminiškos (pirmasis klasteris) ir nuo jų nutolusios sausmedžio rūšys (antrasis klasteris). Dendrograma taip pat rodo, kad valgomųjų sausmedžių klasteris sudarytas iš dviejų subklasterių.

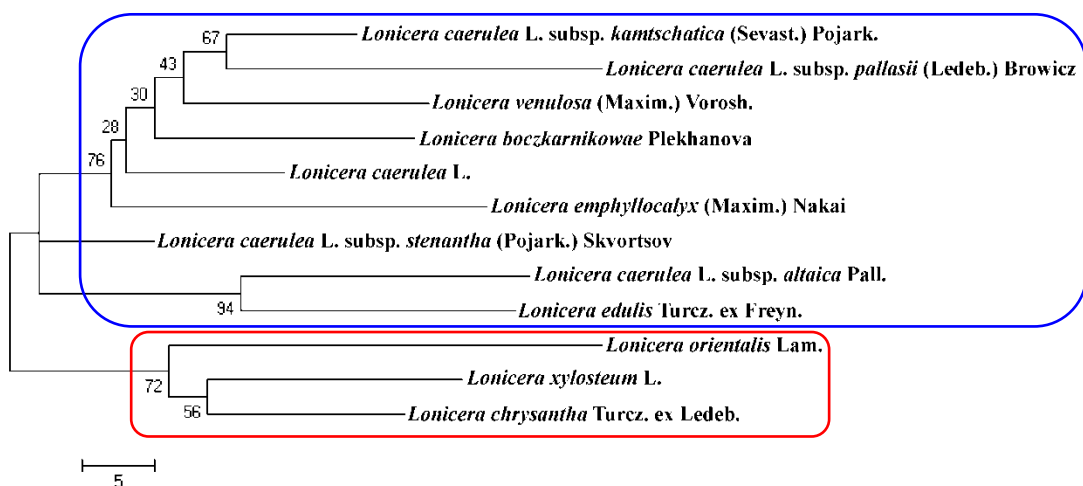
Mažesnijį subklasterį sudaro *L. edulis* ir *L. caerulea* subsp. *altaica* pavyzdžiai. Šie du pavyzdžiai grupuojasi kartu ir RAPD žymenų pagrindu sudarytoje dendrogramoje (17 pav., 18 pav.). Tiesa, RAPD-UPGMA dendrogramoje kartu grupuojasi ir *L. venulosa* rūšies pavyzdys. Tiek cpDNR sekoskaitos, tiek RAPD duomenų pagrindu nubraižytose dendrogramose, *L. xylosteum*, *L. chrysantha* ir *L. orientalis* sudaro vieną klasterį. Rūšiai *L. xylosteum* genetiškai artimesnė *L. chrysantha* nei *L. orientalis*. Artimą šių trijų rūšių genetinį giminingumą parodo ir kiti autoriai (Theis et al., 2008; Smith 2009).

ML metodu gautą dendrogramą (19 pav.) palyginome su kitais metodais sudarytomis filogenetinėmis dendrogramomis (25 pav. A, B ir C). NJ ir ME metodais gautos identiškos filogenetinės dendrogramos, todėl ME dendrograma nepateikiama. Pavyzdžių filogenija ir klasterių sandara NJ ir ML filogenetinėse dendrogramose nesiskiria (19 pav.). MP dendrograma, kuri sudaryta tų pačių sekų analizės pagrindu (25 pav. B), taip pat kongruentiška ML ir NJ dendrogramoms, nors šiuo metodu sudarant dendrogramą nenaudojami pagalbiniai modeliai ar algoritmai, o atsižvelgiama tik į parsimoniškai informatyvias vietas. UPGMA dendrogramoje daugelio šakų įkėlų vertės buvo gana mažos, todėl joje pateikiami duomenys nėra patikimi.

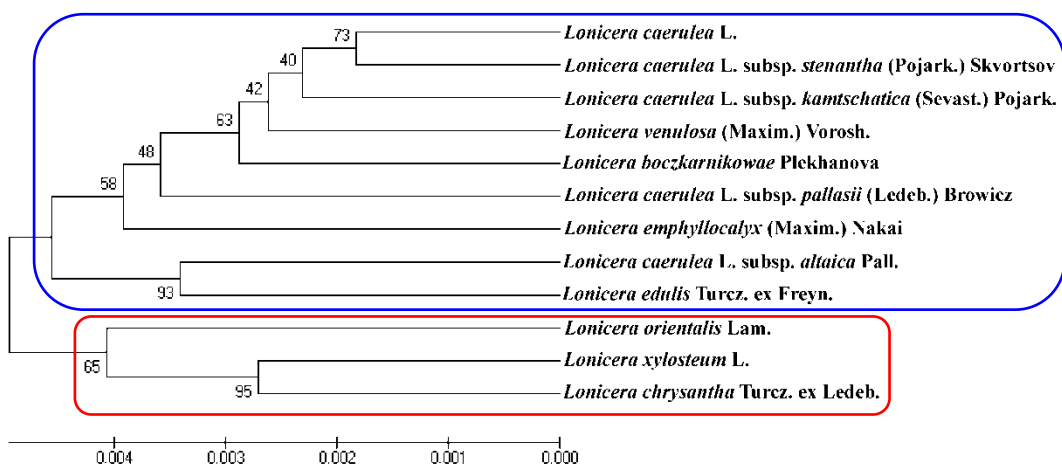
Norėdami patvirtinti, kad filogenetinio tyrimo rezultatai, gauti RAPD ir cpDNR sekoskaitos metodais, yra panašūs, palyginome tarpusavyje genetinius atstumus, apskaičiuotus naudojant RAPD žymenis ir cpDNR regionų sekoskaitos duomenis (24 ir 25 lentelės). Naudodami Spearman'o pasiskirstymą ir skirtingas duomenų reikšmes, apskaičiavome genetinių atstumų tarpusavio koreliaciją. Gauta vidutinė teigiama koreliacija –  $r = 0,59$  ( $p < 0,0001$ ) leidžia teigti, kad RAPD ir cpDNR duomenų pagrindu sudarytos filogenetinės dendrogramos yra panašios, o jų atitikimas labiausiai pasireiškia klasterių lygmenyje.



A



B



C

**25 pav.** *Lonicera* L. genties atstovų filogenetinė analizė pagrįsta cpDNR šešių nekoduojančių regionų sekoskaita. Filogenetinių dendrogramų, sudarytų įvairiais metodais, palyginimas: A – NJ metodu, B – MP metodu, C – UPGMA metodu

Ryškesni skirtumai matomi pirmojo klasterio subklasteriuose. Mūsų gauti filogenetinio tyrimo rezultatai neprieštarauja kitų autorių nustatytiems sausmedžio rūšių filogenetiniams ryšiams (Theis et al., 2008; Smith, 2009). *L. caerulea* L. vidurūšiniai filogenetiniai tyrimai, naudojant DNR žymenis (RAPD ir cpDNR sekoskaitą), yra nauji, todėl neturime su kuo jų palyginti. Kadangi filogenetinės analizės, atliktos dviem skirtingais ir tarpusavyje nesusijusiais metodais, rezultatai yra panašūs, tai nustatytus filogenetinius taksonų pavyzdžių ryšius galime vertinti kaip patikimus ir objektyviai egzistuojančius. Dendrogramos, sudarytos remiantis tiek originalių sekų sekoskaitos duomenimis (19 pav.), tiek duomenų bazėse esančiomis giminingų taksonų pavyzdžių homologiškomis sekomis (20 pav.) rodo, kad valgomojo sausmedžio taksonai sudaro monofiletinę grupę. Tačiau *L. caerulea* L. porūšiai nesuformuoja vienos klados monofiletinėje grupėje, kaip būtų galima tikėtis, jeigu juos laikyti žemesnio rango taksonais, nei keleto autorių siūlomos rūšys.

Apibendrinami gautus sausmedžių tyrimo rezultatus ir pateikdami rekomendacijas, turėtume atsižvelgti į tai, kad VU Botanikos sodo sausmedžių kolekcija turi Augalų nacionalinių genetinių išteklių *ex situ* kolekcijos statusą. Todėl tolimesniam kolekcijos tvarkymui (pvz., naujų pavyzdžių genotipavimui, jų genetinio savitumo įvertinimui) rekomenduotume panaudoti DNR žymenis, nustatytus šiame darbe. Remiantis mūsų tyrimų rezultatais, būtų galima atsisakyti tų kolekcijos pavyzdžių, kurių taksonominis statusas ar kilmė kelia abejonių. Tai padėtų efektyviau panaudoti turimus žemės plotus kolekcijai auginti ir plėsti. Siūlytume pilniau išnaudoti turimų sausmedžio genetinių linijų ir elitinių veislių genetinį potencialą selekciniam ir tiriamajame darbe.



## IŠVADOS

1. RAPD metodas yra tinkamas *Lonicera* L. genties augalų kolekciniais pavyzdžiams genotipuoti. Panaudojus dvylika oligonukleotidinių pradmenų genotipuota šimtas skirtingo taksonominio rango sausmedžio pavyzdžių.
2. Melsvauogis sausmedis *Lonicera caerulea* L. pasižymi dideliu (83,2%) DNR polimorfizmu.
3. Melsvauogio sausmedžio *L. caerulea* L. veislių UPGMA dendrograma, sudaryta naudojant RAPD žymenis, neprieštarauja šių veislių kilmės duomenims.
4. Identifikuotas ir sekvenuotas *L. caerulea* L. polimorfinei kompleksinei rūšiai savitas RAPD žymuo.
5. Du chloroplastų DNR regionai – *trnH-psbA* ir *5'rpS12-rpL20* – iš šešių ištirtų (*trnH-psbA*, *5'rpS12-rpL20*, *trnL-trnF*, *trnS-trnG*, *rpS16*, *trnS-psbZ*) yra tinkamiausi *Lonicera* L. genties atstovų filogenetiniams tyrimams.
6. Pirmą kartą *Caprifoliaceae* šeimos augalų filogenetiniams tyrimams panaudoti cpDNR *5'rpS12-rpL20* regiono sekoskaitos duomenys. Ši seka pasižymėjo didžiausiu vieno nukleotido polimorfizmų skaičiumi palyginti su kitų cpDNR regionų tirtomis sekomis.
7. Filogenetinės dendrogramos, sudarytos remiantis RAPD žymenimis ir cpDNR sekoskaitos duomenimis, yra panašios.
8. *L. caerulea* L. porūšiai *L. subsp. kamtschatica*, *L. subsp. stenantha* ir *L. subsp. pallasii*, *L. subsp. altaica* nesudaro vienos kladės filogenetinėje dendrogramoje ir savo taksonominiu statusu nesiskiria nuo *L. venulosa* (Maxim.) Worosh., *L. edulis* Turcz. ex Freyn, *L. emphylocalyx* (Maxim.) Nakai ir *L. bozkarnikowae* Plekhanova, kurias kai kurie autoriai vertina kaip atskiras rūšis.

9. Filogenetinė analizė, atlikta pagal cpDNR *trnH-psbA*, *5'rpS12-rpL20*, *trnL-trnF*, *trnS-trnG*, *rpS16* ir *trnS-psbZ* regionų sekoskaitos duomenis rodo, kad visi ištirti *Lonicera* L. genties valgomųjų sausmedžių atstovai sudaro monofiletinę grupę.
10. VU Botanikos sodo kolekcijoje saugomos melsvauogio sausmedžio genetinės linijos, pasižyminčios savitais RAPD lokusais, gali būti naudojamos sausmedžio selekcijoje naujų veislių genetinei įvairovei didinti. Kai kurios iš šių linijų pasižymi ir geromis ūkinėmis savybėmis.

## **MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS**

### **Publikacijos, susijusios su disertacijos tematika**

**Moksliniai straipsniai leidiniuose turinčiuose citavimo indeksą ir referuojamuose Mokslinės informacijos instituto duomenų bazėje *ISI Web of Science*:**

**Naugžemys D., Žilinskaitė S., Kleizaitė V., Skridaila A., Žvingila D.** 2011. Assessment of Genetic Variation among Elite and Wild Germplasm of Blue Honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.). *Baltic Forestry*, in press.

### **Moksliniai straipsniai įtraukti ISI Journal Master List sąrašą:**

**Naugžemys D., Žilinskaitė S., Denkovskij J., Patamsytė J., Liderskis J., Žvingila D.** 2007. RAPD based study of genetic variation and relationships among *Lonicera* germplasm accessions. *Biologija*, 53 (3): 34-39.

### **Moksliniai straipsniai kituose Lietuvos mokslo leidiniuose:**

**Žilinskaitė S., Naugžemys D., Radaitienė D., Žvingila D.** 2007. Investigation of blue-berried honeysuckle lines and cultivars at Vilnius university botanical garden. *Sodininkystė ir daržininkystė*, 26 (3): 47-56.

### **Konferencijų tezės:**

**Žilinskaitė S., Naugžemys D., Radaitienė D., Žvingila D.** 2007. Investigation of blue-berried honeysuckle lines and cultivars at Vilnius university botanical garden. Breeding of horticultural plants and investigation of cultivars. Present and future. *Babtai*; 5.

**Наугжемис Д.,** Жилинскайте С., Жвингила Д. 2008. „Интродукция, изучение голубой жимолости (*Lonicera L.*, подсекция *Caeruleae* Rehd.) в Ботаническом саду Вильнюсского университета. Международная научно-методическая конференция. Интродукция нетрадиционных, редких растений. Россия, Мичуринск, Том 1: 125-127.

**Наугжемис Д.,** Жилинскайте С., Жвингила Д. 2009. Изучение генетического родства RAPD – методом между сортами, видами жимолости (*Lonicera L.*) Ботанического сада Вильнюсского университета. ([http://Lonicera-conference.narod.ru/eng\\_version.html](http://Lonicera-conference.narod.ru/eng_version.html))

Pašakinskienė I., Skridaila A., Žilinskaitė S., **Naugžemys D.**, Dapkūnienė S., Štukienė G., Ryliškis D. 2009. Molecular marker approach in plant biodiversity and taxonomy studies at the Botanical Garden of Vilnius University. Third International Barcode of Life Conference, 7-12 November. Mexico, *abstracts volume*, 213.

#### **Dalyvavimas tarptautinėse mokslo konferencijose:**

VIII Международная научно-методическая конференция "Интродукция нетрадиционных, редких растений". 2008. Россия, г. Мичуринск, 8-12, июня.

‘1st Virtual International Scientific conference on *Lonicera caerulea L.*’ 2009. Russia, 23 March – 23 April.

#### **Publikacijos, tiesiogiai nesusijusios su disertacijos tematika**

Meškauskaitė E., **Naugžemys D.**, Žvingila D., Naujalis J.R. 2010. Morphological and genetic differentiation of *Saxifraga hirculus L.*

(*Saxifragaceae*) populations in Lithuania. *Acta Biologica Universitatis Daugavpiliensis*, Supplement, 2: 69-78.

Žvingila D., Vaitkūnienė V., Balčiūnienė L., Čėsniėnė T., Kleizaitė V., **Naugžemys D.**, Rančelis V. 2008. Biologinės ir genetinės įvairovės miežių mutantų kolekcijoje įvertinimas. *Jaunuųjų mokslininkų darbai*, 3: 163-166.

Kuisys T., **Naugžemys D.**, Skridaila A., Žilinskaitė S., Žvingila D. 2007. Random Amplified Polymorphic DNA Analysis of Genetic Diversity of *Taxus baccata* L. in Provenances of Baltic Sea Countries. *Baltic forestry*, 13(2): 184-189.

**Naugžemys D.**, Žvingila D., Meškauskaitė E., Naujalis J.R. 2007. Analysis of DNA polymorphism in Lithuanian populations of *Saxifraga hirculus* L. *Biologija*, 1: 81-86.

**Naugžemys D.**, Aučina A., Žvingila D., Skridaila A. 2006. Comparison of DNA polymorphism in seedlings of *Pinus sylvestris* L. from different populations by RAPD markers. *Biologija*, 1: 30-35.

## **PADEKA**

Nuoširdžiai dėkoju disertacinio darbo vadovui prof. Donatui Žvingilai už vadovavimą, nuoširdų rūpestį ir visokeriopą paramą, patarimus ir kritines pastabas. Taip pat esu dėkingas dr. Silvai Žilinskaitei už pagalbą, vertingus patarimus ir dalyvavimą diskusijose.

Dėkoju Botanikos ir genetikos katedros vedėjui prof. habil. dr. J. R. Naujaliui už pagalbą ir palaikymą bei visam katedros kolektyvui už supratingumą, jaukią darbinę atmosferą. Taip pat nuoširdžiai dėkoju kolegoms iš Augalų genetikos laboratorijos: prof. habil. dr. V. P. Rančeliui, dr. V. Kleizaitei, doc. T. Česnienei, dr. J. Patamsytei, doc. K. Žukui bei doktorantui R. Šiukštai, kurie buvo geriausi kolegos, draugai ir parama visus šiuos mano studijų metus.

Taip pat norėčiau padėkoti Vilniaus universiteto Botanikos sodo direktoriui dr. A. Skridailai už paramą rašant disertacinį darbą bei visam Augalų fiziologinių ir biocheminių tyrimų laboratorijos kolektyvui, visiems Botanikos sodo darbuotojams už malonų bendravimą, šiltus santykius.

Malonu padėkoti dr. L. Bagdonienei ir doc. T. Česnienei už disertacijos rankraščio recenzijas ir vertingas pastabas, dr. V. Kleizaitei ir dr. J. Patamsytei už kritines pastabas redaguojant disertacijos tekstą.

Noriu labai padėkoti savo mamai, kuri visą mano gyvenimą buvo šalia, rūpinosi manimi, palaikė ir tikėjo mano pasirinktu mokslo keliu.

Dėkoju Lietuvos valstybiniam mokslo ir studijų fondui, 2006 – 2010 metais skyrusiam stipendiją bei Botanikos ir genetikos katedrai, parėmusiai šiuos mokslinius tyrimus finansiškai.

Finansinė parama šiam darbui vykdyti (2004 – 2008) buvo gauta iš Lietuvos valstybinės mokslo programos „Augalų genetinių išteklių moksliniai tyrimai”.

Ačiū Jums visiems, kurie buvote su manimi.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Aagaard J.E., Vollmer S.S., Sorensen F.C., Straus S.H. 1995. Mitochondrial DNA products among RAPD profiles are frequent and strongly differentiated between races of Douglas fir. *Molecular Ecology*, 4: 441-446.
2. Adams R.P., Demeke T. 1993. Systematic relationships in *Juniperus* based on random amplified polymorphic DNAs (RAPDs). *Taxon*, 42: 553-571.
3. Aldrich J. 1997. R.A. Fisher and the making of maximum likelihood 1912-1922. *Statistical Science*, 12(3): 162-176.
4. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-410.
5. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25: 3389-3402.
6. Angiolillo A., Reale S., Pilla F., Baldoni L. 2006. Molecular analysis of olive cultivars in the Molise region of Italy. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53: 289-295.
7. 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: 73-102.
8. Ayad W.G., Hodgkin T., Jaradat A., Rao R.V. 1997. Molecular genetic techniques for plant genetic resources. Report of an IPGRI workshop. Rome. IPGRI.
9. Badenes M.L., Canyámas T., Romero C., Martínez-Calvo J., Giordani E., Llácer G. 2004. Characterization of under-utilized fruits by molecular markers. A case study of loquat. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 51: 335-341.
10. Barabaschi D., Campani L., Francia E., Toubia-Rahme H., Valè G.P., Gianinetti A., Delogu G., Stanca M., Pecchioni N. 2007. Haplotype

- structure around the *nud* locus in barley and its association with resistance to leaf stripe (*Pyrenophora graminea*). *Plant Breeding*, 126: 24-29.
11. Baur E. 1914. Die Bedeutung der primitiven Kulturrassen und der wilden Verwandten unserer Kulturpflanzen für die Pflanzenzüchtung. *Jahrbuch der Deutschen Landwirtschafts Gesellschaft*, 29: 104-110.
  12. Baxevanis A.D., Francis Ouellette B.F. 2004. A practical guide to the analysis of genes and proteins. A John Wiley, Sons, 505.
  13. Bell C.D. 2004. Preliminary phylogeny of *Valerianaceae* (Dipsacales) inferred from nuclear and chloroplast DNA sequence data. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 31(1): 340-350.
  14. Bell C.D. 2010. Towards a species level phylogeny of *Symphoricarpos* (*Caprifoliaceae*), based on nuclear and chloroplast DNA. *Systematic Botany*, 35(2): 442-450.
  15. Bell C.D., Donoghue M.J. 2005. Phylogeny and biogeography of *Valerianaceae* (Dipsacales) with special reference to the South American valerians. *Organisms, Diversity, Evolution*, 5: 147-159.
  16. Bell C.D., Edwards E.J., Kim S.T., Donoghue M.J. 2001. Dipsacales phylogeny based on chloroplast DNA sequences. *Harvard Papers in Botany*, 6(2): 481-499.
  17. Blattner F.R., Weising K., Bänfer G., Maschwitz U., Fiala B. 2001. Molecular analysis of phylogenetic relationships among myrmecophytic *Macaranga* species (*Euphorbiaceae*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 19: 331-344.
  18. Bock R., Hagemann R. 2000. Plastid genetics: Manipulation of plastid genomes and biotechnological applications. *Progress in Botany*, 61: 76-90.
  19. Bodénès C., Joandet S., Laigret F., Kremer A. 1997. Detection of genomic regions differentiating two closely related oak species *Quercus petraea* (Matt.) Liebi. and *Quercus robur* L. *Heredity*, 78: 433-444.
  20. Böhm A., Zyprian E. 1998. RAPD marker in grapevine (*Vitis* spp.) similar to plant retrotransposons. *Plant Cell Reports*, 17: 415-421.



21. Böhm M., Löw R., Haag-Kerwer A., Lüttge U., Rausch Th. 1993. Evaluation of comparative DNA amplification fingerprinting for rapid species identification within the genus *Clusia*. *Botanica Acta*, 106: 448-453.
22. Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *The American Journal of Human Genetics*, 32: 314-331.
23. Bowditch B.M., Albright D.G., Williams J.G.K., Braun M.J. 1993. Use of amplified polymorphic DNA markers in comparative genome studies. *Methods in Enzymology*, 224: 294-309.
24. Bremer B., Bremer K., Heidari N., Erixon P., Olmstead R.G., Anderberg A.A., Kallersjö M., Barkhordarian E. 2002. Phylogenetics of asterids based on 3 coding and 3 non-coding chloroplast DNA markers and the utility of non-coding DNA at higher taxonomic levels. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 24(2): 274-301.
25. Browicz K. 1974. *Caprifoliaceae*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 68(4): 267-281.
26. Brown T.A. 2006. Genomes 3. *Garland Science*, 750.
27. Caetano-Anollés G. 1993. Amplifying DNA with arbitrary oligonucleotide primers. *PCR methods and Applications*, 4: 85-94.
28. Caetano-Anollés G. 1994. MAAP: a versatile and universal tool for genome analysis. *Plant Molecular Biology*, 25: 1011-1026.
29. Caetano-Anollés G., Bassam B., Gresshoff P.M. 1991. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary primers. *Nature Biotechnology*, 9: 553-557.
30. Caetano-Anollés G., Bassam B., Gresshoff P.M. 1992. Primer-template interactions during DNA amplification fingerprinting with single arbitrary oligonucleotides. *Molecular and General Genetics*, 235: 157-165.
31. Carelli B.P., Gerald L.T.S., Grazziotin F.G., Echeverrigaray S. 2006. Genetic diversity among Brazilian cultivars and landraces of tomato

- Lycopersicon esculentum* Mill. revealed by RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53: 395-400.
32. Carlson S.E., Mayer V., Donoghue M.J. 2009. Phylogenetic relationships, taxonomy, and morphological evolution in *Dipsacaceae* (*Dipsacales*) inferred by DNA sequence data. *Taxon*, 58(4): 1075-1091.
  33. Chaovanalikit A., Thompson M.M., Wrolstad R.E. 2004. Characterization and quantification of anthocyanins and polyphenolics in blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 848-852.
  34. Chase M.W., Soltis D., Olmstead R.G., Morgan D., Les D.H., Mishler B., Duvall M.R., Price R.A., Hills H.G., Qiu Y-L., Kron K.A., Rettig J.H., Conti E., Palmer J.D., Manhart J.R., Sytsma K.J., Michaels H.J., Kress W.J., Karol K.G., Clark W.D., Hedrén M., Gaut B.S., Jansen R.K., Kim K-J., Wimpee C.F., Smith J.F., Furnier G.R., Straus S.H., Xiang Q-Y., Plunkett G.M., Soltis P.S., Swensen S.M., Williams S.E., Gadek P.A., Quinn C.J., Eguiarte L., Golenberg E., Learn G.H., Graham S.W., Barrett S.C.H., Dayanandan S., Albert V.A. 1993. Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 80(3): 528-580.
  35. Chen S., Yao H., Han J., Liu C., Song J., Shi L., Zhu Y., Ma X., Gao T., Pang X., Luo K., Li Y., Li X., Jia X., Lin Y., Leon C. 2010. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS one*, 5(1).
  36. Clusius C. 1583. *Rariorum aliquot stirpium per Pannoniam et Austriam Observatarum historia*. Antverpae: Chr. Palatius.
  37. Cooper H.D., Spillane C., Hodgkin T. 2001. Broadening the genetic base of crops: an overview. In: Cooper H.D., Spillane D. and Hodgkin T. (eds), *Broadening the Genetic Base of Crop Production*, FAO, IPGRI and CAB International, Wallingford, Oxon, UK, 1-23.
  38. Corazza-Nunes M.J., Machado M.A., Nunes W.M.C., Cristofani M., Targon M.L.P.N. 2002. Assessment of genetic variability in grapefruits

- (*Citrus paradise* Macf.) and pummelos (*C. maxima* (Burm.) Merr.) using RAPD and SSR markers. *Euphytica*, 126: 169-176.
39. Cordeiro A.I., Sanchez-Sevilla J.F., Alvarez-Tinaut M.C., Gomez-Jimenez M.C. 2008. Genetic diversity assessment in Portugal accessions of *Olea europaea* by RAPD markers. *Plant Biology*, 52: 642-647.
  40. Cowan R.S., Chase M.W., Kress W.J., Savolainen V. 2006. 300,000 species to identify: problems, progress, and prospects in DNA barcoding of land plants. *Taxon*, 55(3): 611-616.
  41. Cox T.S., House L.R., Frey K.J. 1984. Potential of wild germplasm for increasing yield of grain sorghum. *Euphytica*, 33: 673-684.
  42. Demeke T., Adams R.P., Chibbar R. 1992. Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA (RAPD): a case study in *Brassica*. *Theoretical and Applied Genetics*, 84: 990-994.
  43. Devos K.M., Gale M.D. 1992. The use random amplified polymorphic DNA markers in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 84(5-6): 567-572.
  44. Dice L. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, 26: 297-302.
  45. Doldi M.L., Vollmann J., Lelley T. 1997. Genetic diversity in soybean as determined by RAPD and microsatellite analysis. *Plant Breeding*, 116: 331-335.
  46. Dowling T.E., Moritz C., Palmer J.D., Riesenber L.H. 1996. Nucleic acids III: Analysis of fragments and restriction sites. In *Molecular systematics* (eds Hillis D.M., C. Moritz C., Mable B.K.), Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 249-320.
  47. Doyle J.J., Doyle J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12(1): 13-15.
  48. Eck R.V., Dayhoff M.O. 1966. Evolution of the structure of ferredoxin based on living relics of primitive amino acid sequences. *Science*, 152, 363-366.

49. Edgar R.C. 2004a. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*, 5: 113.
50. Edgar R.C. 2004b. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5): 1792-1797.
51. Efron B. 1979. Bootstrapping methods: Another look at the jackknife. *American Statistician*, 7: 1-26.
52. Efron B., Gong G. 1983. A leisurely look at the bootstrap, the jackknife, and cross-validation. *American Statistician*, 37: 36-48.
53. 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.
54. Fang D.Q., Federici C.T., Roose M.L. 1997. Development of molecular markers linked to a gene controlling fruit acidity in citrus. *Genome*, 40(6): 841-849.
55. Fazekas A.J., Steeves R., Newmaster S.G. 2010. Improving sequencing quality from PCR products containing long mononucleotide repeats. *BioTechniques*, 48: 277-285.
56. Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.
57. Felsenstein J. 2004. Inferring Phylogenies. *Sinauer Associates*, Massachusetts, 664.
58. Fernald M.L. 1925. The American representatives of *Lonicera caerulea*. *Rhodara*, 27: 1-11.
59. Ferri G., Alu M., Corradini B. 2009. Forensic Botany: species identification of botanical trace evidence by using a multigene barcoding approach. *International Journal of Legal Medicine*, 123: 395-401.
60. Filho S.M., Sedyama C.S., Moreira M.A. 2002. RAPD and SCAR markers linked to resistance to frogeye leaf spot in soybean. *Genetics and Molecular Biology*, 25(3): 317-321.
61. Fisher R.A. 1920. A mathematical examination of the methods of determining the accuracy of an observation by the mean error, and by the

- mean square error. *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society*, 80: 758-770.
62. Fitch W.M. 1971. Towards defining the course of evolution: Minimum change for a specific tree topology. *Systematic Zoology*, 20: 406-416.
  63. Fritsch P., Hanson M.A., Spore C.D., Pack P.E., Rieseberg L.H. 1993. Constancy of RAPD primer amplification strength among distantly related taxa of flowering plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 11(1): 10-20.
  64. Fu Y.B., Peterson G., Diederichsen A., Richards K.W. 2002. RAPD analysis of genetic relationships of seven flax species in the genus *Linum* L. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 49: 253-259.
  65. 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.
  66. Gaut B.S. 1998. Molecular clocks and nucleotide substitution rates in higher plants. *Journal of Evolutionary Biology*, 30: 93-120.
  67. Gawel N.J., Jarret R.L., Whittmore A.P. 1992. Restriction fragment length polymorphism (RFLP)-based phylogenetic analysis of *Musa*. *Theoretical and Applied Genetics*, 84: 286-290.
  68. Gehrig H., Gaussmann O., Marx H., Schwarzott D., Kluge M. 2001. Molecular phylogeny of the genus *Kalanchoe* (*Crassulaceae*) inferred from nucleotide sequences of the *ITS-1* and *ITS-2* regions. *Plant Science*, 160: 827-835.
  69. Gielly L., Taberlet P. 1994. The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: Noncoding versus *rbcL* sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 11(5): 769-777.
  70. Gimenes M.A., Lopes C.R., Galgaro M.L., Valls J.F.M., Kochert G. 2000. Genetic variation and phylogenetic relationships based on RAPD analysis in section *Caulorrhizae*, genus *Arachis* (Leguminosae). *Euphytica*, 116: 187-195.

71. Gleason H.A. 1963. *Lonicera* L. Illustrated flora of the Northeastern United States and adjacent Canada. N.Y. *Botanical Garden*, 3: 297-301.
72. Gotoh O. 1982. An improved algorithm for matching biological sequences. *Journal of Molecular Biology*, 162: 705-708.
73. Goulão L., Cabrita L., Oliveira C.M., Leitão J.M. 2001. Comparing RAPD and AFLP<sup>TM</sup> analysis in discrimination and estimation of genetic similarities among apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars. *Euphytica*, 119: 259-270.
74. Gravendeel B., Chase M.W., de Vogel E.F., Roos M.C., Mes T.H., Bachmann K. 2001. Molecular phylogeny of *Coelogyne* (Epidendroidae; *Orchidaceae*) based on plastid RFLPS, *matK*, and nuclear ribosomal ITS sequences: evidence for polyphyly. *American Journal of Botany*, 88(10): 1915-1927.
75. Gudžinskas Z. 1999. Lietuvos induočiai augalai. Vilnius, Botanikos instituto leidykla, 212.
76. Hadrys H., Balick M., Schierwater B. 1992. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology*, 1: 55-63.
77. Hamilton M.B. 1999. Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology*, 8: 521-523.
78. Hansen M., Halldén C., Säll T. 1998. Error rates and polymorphism frequencies for three RAPD protocols. *Plant Molecular Biology Reporter*, 16: 139-146.
79. Hara H. 1983. A revision of *Caprifoliaceae* of Japan with reference to allied plants in other districts and to *Adoxaceae*. Tokyo: Academia Scientific Book Inc. *Ginkgoana*, 5: 1-336.
80. Hardig T.M., Soltis P.S., Soltis D.E. 2000. Diversification of the North American shrub genus *Ceanothus* (*Rhamnaceae*): conflicting phylogenies from nuclear ribosomal DNA and chloroplast DNA. *American Journal of Botany*, 87: 108-123.

81. Harlan J.R. 1975. Our vanishing genetic resources. *Science*, 188: 618-621.
82. Harris S.A. 1999. RAPDs in systematics – a useful methodology? *In Molecular Systematics and Plant Evolution*. Taylor, Francis, London.
83. Hasegawa M., Kishino H., Yano T.A. 1985. Dating of the human ape splitting by a molecular clock of mitochondrial-DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 22: 160-174.
84. Haskell G. 1960. The raspberry wild in Britain. *Watsonia*, 4: 238-255.
85. Havey M.J., Muehlbauer F.J. 1989. Variation for restriction fragment length and phylogenies in lentil. *Theoretical and Applied Genetics*, 77: 839-843.
86. Hedges S.B. 1992. The number of replications needed for accurate estimation of the bootstrap P value in phylogenetic studies. *Molecular Biology and Evolution*, 9: 366-369.
87. Hillis D.M., Bull J.J. 1993. An empirical test of bootstrapping as a methods for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology*, 42: 182-192.
88. Hiratsuka J., Shimada H., Whittier R., Ishibashi T., Sakamoto M., Mori M., Kondo C., Honji Y., Sun C.R., Meng B.Y., Li Y.Q., Kanno A., Nishizawa Y., Hirai A., Shinozaki K., Sigiura M. 1989. The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome: intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals. *Molecular and General Genetics*, 217(2-3): 185-194.
89. Hosaka K., Matsubayasi M., Kamijima O. 1985. Peroxidase isozyme in various tissues for discrimination of two tuberose *Solanum* species. *Japanese Journal of Breeding*, 35: 375-382.
90. Huelsenbeck J.P., Hillis D.M. 1993. Success of phylogenetic methods in the four-taxon case. *Systematic Biology*, 42: 247-264.
91. Hultén E. 1930. Flora of Kamtchatka. Stockholm, 4: 358.
92. Hultén E. 1971. Circumpolar plants. Stockholm, *Vetenskapsakad. Handl. Fjärde Ser.*, 4: 13.

93. Ikegami H., Nogata H., Hirashima K., Awamura M., Nakahara T. 2009. Analysis of genetic diversity among European and Asian fig varieties (*Ficus carica* L.) using ISSR, RAPD, and SSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56: 201-209.
94. Jaccard P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la Societe Vaudense des Sciences Naturelles*, 44: 223-270.
95. Jaccoud D., Peng K., Feinstein D., Kilian A. 2001. Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic Acids Research*, 29: 25.
96. Jacobs B., Pyck N., Smets E. 2010. Phylogeny of the *Linnaea* clade: Are *Abelia* and *Zabelia* closely related? *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57(2): 741-752.
97. Jakse J., Satovic Z., Javornik B. 2004. Microsatellite variability among wild and cultivated hops (*Humulus lupulus* L.). *Genome*, 47: 889-899.
98. Janick J., Paull R.E. 2008. The encyclopedia of fruit and nuts. CAB International, Cambridge.
99. Jansen R.K., Palmer J.D. 1987. A chloroplast DNA inversion marks an ancient evolutionary split in the sunflower family (*Asteraceae*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84: 5818-5822.
100. Jogaitė V., Lazutka J., Stapulionytė A., Naujalis J., Odland A., Bjerketvedt D. 2006. Analysis of DNA polymorphism in wild populations of herb-Paris (*Paris quadrifolia* L., *Trilliaceae*) from Lithuania and Norway. *Biologija*, 1: 18-23.
101. John M.E. 1992. An efficient methods for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. *Nucleic Acids Research*, 20(9): 2381.
102. Johnson R.C. 2008. Gene banks pay big dividends to agriculture, the environment, and human welfare. *PLoS Biology*, 6: 148.
103. Judd W.S., Sanders R.W., Donoghue M.J. 1994. Angiosperms family pairs: Preliminary phylogenetic analyses. *Harvard Papers in Botany*, 5: 1-



51.

104. Judd, W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A., Stevens P.F., Donoghue M.J. 2007. Plant systematics a phylogenetic approach. Sinauer Associates, Inc, USA, 580.
105. Jukes T.H., Cantor C.R. 1969. Evolution of protein molecules. *In Mammalian protein metabolism*, ed. Munro H.H. Vol. 3: 21-132. New York: Academic Press.
106. Karlin S., Altschul S.F. 1990. Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(6): 2264-2268.
107. Karp A., Edwards K.J., Bruford M., Funk S., Vosman B., Morgante M., Seberg O., Kremer A., Boursot P., Arcander P., Tautz D., Hewitt G.M. 1997. Molecular technologies for biodiversity evaluation: opportunities and challenges. *Nature Biotechnology*, 15: 625-628.
108. Katsiotis A., Hagedimitriou M., Drossou A., Pontikis C., Loukas M. 2003. Genetic relationships among species and cultivars of pistacia using RAPDs and AFLPs. *Euphytica*, 132: 279-286.
109. Kelchner S.A. 2000. The evolution of non-coding chloroplast DNA and its application in plant systematics. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 87: 499-527.
110. Kidd K.K., Sgaramella-Zonta L.A. 1971. Phylogenetic analysis: concepts and methods. *The American Journal of Human Genetics*, 23: 235-252.
111. Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111-120.
112. Kirillov P. 1849. Die Loniceren des Russischen Reiches geschichtlich und kritisch behandelt. *Dorpat: Druck von H. Lakmann*, 72.
113. Klak C., Hedderson T.A., Linder P. 2003. A molecular systematic study of the *Lampranthus* group (*Aizoaceae*) based on the chloroplast *trnT-trnF* and nuclear ITS and 5S NTS sequence data. *Systematic Botany*, 28: 70-85.

114. Klinbunga S., Ampayup P., Tassanakajon A., Jarayabhand P., Yoosukh W. 2000. Development of species-specific markers of the tropical oyster (*Crassostrea belcheri*) in Thailand. *Marine Biotechnology*, 2(5): 476-484.
115. Kochieva E.Z., Ryzhova N.N., Khrapalova I.A., Pukhalskyi V.A. 2002. Using RAPD for estimating genetic polymorphism in and phylogenetic relationships among species of the genus *Lycopersicon* (Tourn.) Mill. *Russian Journal of Genetics*, 38(9): 1104-1108.
116. Kress W.J., Erickson D.L. 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: The coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS ONE*, 6: e508.
117. Kress W.J., Erickson D.L., Jones F.A., Swenson N.G., Perez R., Sanjur O., Bermingham E. 2009. Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(44): 18621-18626.
118. Kress W.J., Wurdack K.J., Zimmer E.A., Weigt L.A., Janzen D.H. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(23): 8369-8374.
119. Krüssmann G. 1977. Handbuch der Laubgehölze (Band II E-Pro). Berlin, Verlag Paul Parey.
120. Lahaye R., Bank M., Bogarin D., Warner J., Pupulin F., Gigot G., Maurin O., Duthoit S., Barraclough T.G., Savolainen V. 2008. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(8): 2923-2928.
121. Lamboy W. 1994a. Computing genetic similarity coefficients from RAPD data: correcting for the effects of PCR artefacts caused by variation in experimental conditions. *Genome Research*, 4: 38-43.
122. Lamboy W. 1994b. Computing genetic similarity coefficients from RAPD data: the effects of PCR artefacts. *Genome Research*, 4: 31-37.

123. Laurentin H. 2009. Data analysis for molecular characterization of plant genetic resources. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56: 277-292.
124. Lee G.P., Lee C.H., Kim C.S. 2004. Molecular markers derived from RAPD, SCAR, and the conserved 18S rDNA sequences for classification and identification in *Pyrus pyrifolia* and *P. communis*. *Theoretical and Applied Genetics*, 108: 1487-1491.
125. Leipe D.D., Wainright P.O., Gunderson J.H., Porter D., Patterson D.J., Valois F., Himmerich S., Sogin M.L. 1994. The Stramenopiles from a molecular perspective: 16S-like rRNA sequences from *Labyrinthuloides minutum* and *Cafeteria roenbergensis*. *Phycologia*, 33: 369-377.
126. Lemey P., Salemi M., Vandamme A.M. 2009. The phylogenetic handbook: A practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing. *Cambridge University Press*. 723.
127. Link W., Dixkens C., Singh M., Schwall M., Melchinger A. 1995. Genetic diversity in European and Mediterranean faba bean germplasm revealed by RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 90: 27-32.
128. Linnaeus K. 1753. *Species plantarum* L. Vol. 1, 560.
129. Löve A., Löve D. 1982. IOPB chromosome number reports LXXIV. *Taxon*, 31(2): 344-360.
130. Lu M.Z., Wang X.K., Szmidt A.E. 1997. Molecular properties of RAPDs in *Pinus sylvestris* (L.) and their implications for genetic analysis. *Forest Genetics*, 4: 227-234.
131. Ma R., Yli-Mattila T., Pulli S. 2004. Phylogenetic relationships among genotypes of worldwide collection of spring and winter ryes (*Secale cereale* L.) determined by RAPD-PCR markers. *Hereditas*, 140: 210-221.
132. Madden T. 2003. The BLAST sequence analysis tool. *The NCBI Handbook*.
133. Makarevitch I., Golovnina K., Scherbik S., Blinov A. 2003. Phylogenetic relationships of the siberian *Iris* species inferred from noncoding chloroplast DNA sequences. *International Journal of Plant Sciences*, 164(2): 229-237.

134. Maliouchenko O., Palmé A.E., Bounamici A., Vendramin G.G., Lascoux M. 2007. Comparative phylogeography and population structure of European *Betula* species, with particular focus on *B. pendula* and *B. pubescens*. *Journal of Biogeography*, 34: 1601-1610.
135. Manen J.F., Natali A. 1995. Comparison of the evolution of ribulose-1, 5-biphosphate carboxylase (*rbcL*) and *atpB-rbcL* noncoding spacer sequences in a recent plant group, the tribe Rubieae (*Rubiaceae*). *Journal of Molecular Evolution*, 41: 920-927.
136. Manhart J.R. 1994. Phylogenetic analysis of green plant *rbcL* sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 3(2): 114-127.
137. Matsuoka Y., Yamazaki Y., Ogihara Y., Tsunewaki K. 2002. Whole chloroplast genome comparison of rice, maize and wheat: implications for chloroplast gene diversification and phylogeny of cereals. *Molecular Biology and Evolution*, 19: 2084-2091.
138. Mekbib F. 2008. Genetic erosion of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) in the centre of diversity, Ethiopia. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55: 351-364.
139. Minoo D., Jayakumar V.N., Veena S.S., Vimala J., Basha A., Saji K.V., Nirmal Babu K., Peter K.V. 2008. Genetic variations and interrelationships in *Vanilla planifolia* and few related species as expressed by RAPD polymorphism. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55: 459-470.
140. Miyashita T., Hoshino Y. 2010. Interspecific hybridization in *Lonicera caerulea* and *Lonicera gracilipes*: The occurrence of green/albino plants by reciprocal crossing. *Scientia Horticulturae*, 125: 692-699.
141. Mizrachi I. 2007. GenBank: The nucleotide sequence database. *The NCBI Handbook*.
142. Moore M.J., Soltis P.S., Bell C.D., Burleigh J.G., Soltis D.E. 2010. Phylogenetic analysis of 83 plastid genes further resolves the early diversification of eudicots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(10): 4623-4628.

143. Morton B.R., Clegg M.T. 1993. A chloroplast DNA mutational hotspot and gene conversion in a noncoding region near *rbcL* in the grass family (*Poaceae*). *Current Genetics*, 24(4): 357-365.
144. Mount D.W. 2004. Bioinformatics – Sequence and genome analysis. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 665.
145. Muellner A.N., Samuel R., Johnson S.A., Cheek M., Pennington T.D., Chase M.W. 2003. Molecular phylogenetics of *Meliaceae* (Sapindales) based on nuclear and plastid DNA sequences. *American Journal of Botany*, 90: 471-480.
146. Mullis K.B., Faloona F.A. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155(F): 335-350.
147. Murray M.G., Thompson W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8(19): 4321-4325.
148. Muse S.V., Gaut B.S. 1997. Comparing patterns of nucleotide substitution rates among chloroplast loci using the relative ratio test. *Genetics*, 146: 393-399.
149. Nakai T. 1921. *Caprifoliaceae*. Flora sylvatica Coreana. Seoul, 11: 67-70.
150. Namkoong G., Lewontin R.C., Yanchuk A.D. 2004. Plant genetic resource management: the next investments in quantitative and qualitative genetics. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 51: 853-862.
151. Naugžemys D., Žilinskaitė S., Denkovskij J., Patamsytė J., Literskis J., Žvingila D. 2007. RAPD based study of genetic variation and relationships among *Lonicera* germplasm accession. *Biologija*, 53(3): 34-39.
152. Navasaitis M. 2005. Dendrologija. Vilnius, Margi raštai 856.
153. Navasaitis M., Ozolinčius R., Smaliukas D., Balevičienė J. 2003. Lietuvos dendroflora. Kaunas, Lututė 576.
154. Needleman S.B., Wunsch C.D. 1970. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequences of two proteins. *Journal of Molecular Biology*, 48: 443-453.

155. Nei M., Kumar S. 2000. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press, Inc USA, 356.
156. 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: 5269-5273.
157. Newbury H.J., Ford-Lloyd B.V. 1993. The use of RAPD for assessing variation in plants. *Plant Growth Regulation*, 12: 43-51.
158. Nkongolo K.K., Deck A., Michael P. 2001. Molecular and cytological analyses of *Deschampsia cespitosa* populations from Northern Ontario (Canada). *Genome*, 44(5): 818-825.
159. Nkongolo K.K., Michael P., Gratton W.S. 2002. Identification and characterization of RAPD markers inferring genetic relationships among *Pine* species. *Genome*, 45: 51-58.
160. Notredame C., Higgins D.G., Heringa J. 2000. T-Coffee: a novel methods for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of Molecular Biology*, 302: 205-217.
161. Nybom H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*, 13: 1143-1155.
162. Nybom H., Shaal B.A. 1990. DNA 'fingerprinting' applied to paternity analysis in apples (*Malus x domestica*). *Theoretical and Applied Genetics*, 79: 763-768.
163. Nybon H., Bartish J.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.
164. Ohwi J. 1965. *Lonicera* L. Flora of Japan. Wash, 839-843.
165. Oxelman B., Lidén M., Berglund D. 1997. Chloroplast *rps16* intron phylogeny of the tribe *Sileneae* (*Caryophyllaceae*). *Plant Systematics and Evolution*, 206: 393-410.

166. Paran I., Michelmore R.W. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics*, 85: 985-993.
167. Patamsytė J., Kleizaitė V., Čėsniėnė T., Rančelis V., Žvingila D. 2010. The genetic structure of red raspberry (*Rubus idaeus* L.) populations in Lithuania. *Central European Journal of Biology*, 5: 496-506.
168. Patamsytė J., Žvingila D., Labokas J., Baliuckas V., Balčiūnienė L., Kleizaitė V., Rančelis V. 2008. Study of genetic diversity among in wild raspberry (*Rubus idaeus* L.) germplasm collection using morphological characters and markers. *Biologija*, 2: 66-74.
169. Paux E., Sourdille P. 2009. A toolbox for *Triticeae* genomics. *Plant Genetics and Genomics: Crops and Models*, 7(2): 255-283.
170. 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.
171. Peng Y, Schertz K.F., Cartinhour S., Hart G.E. 1999. Comparative genome mapping of *Sorghum bicolor* (L.) Moench using an RFLP map constructed in a population of recombinant inbred lines. *Plant Breeding*, 118(3): 225 - 235.
172. Pérez T., Albornoz J., Domínguez A. 1998. An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. *Molecular Ecology*, 7: 1347-1357.
173. Perry A.S., Wolfe K.H. 2002. Nucleotide substitution rates in legume chloroplast DNA depend on the presence of the inverted repeat. *Journal of Molecular Evolution*, 55: 501-508.
174. Petersone A. 1959. Dzimta *Caprifoliaceae* Lindl. Latvijas PSR Flora. Rīga, *Latvijas valsts izdevniecība*, 4: 284-298.
175. Plekhanova M.N. 2000. Blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.) – a new commercial berry crop for temperate climate: genetic resources and breeding. *Acta Horticulture*, 538: 159-164.
176. Pojarkova A.I. 1999. *Caprifoliaceae* Vent. In: Komarov V.I. (ed). The Flora of the USSR, Vol. 23. Amerind Publishing, New Delhi, 464-482.

177. Raddová J., Baránek M., Oukropec J., Vachůn M., Pidra M. 2003. RAPD analysis of peaches within Czech National Collection. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 39: 113-119.
178. Rafalski J.A., Tingey S.V. 1993. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends in Genetics*, 9(8): 275-280.
179. Raina S.N., Rani V., Kojima T., Ogiwara Y., Singh K.P., Devarumath R.M. 2001. RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. *Genome*, 44(5): 763-772.
180. Ram S.G., Parthiban K.T., Kumar R.S. 2008. Genetic diversity among *Jatropha* species as revealed by RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55: 803-809.
181. Ramanauskas V. 1976. Šeima *Caprifoliaceae* Juss. Lietuvos TSR Flora. Vilnius, *Mokslas*, 5: 513-528.
182. Rao L.S., Usha Rani P., Deshmukh P.S., Kumar P.A., Panguluri S.K. 2007. RAPD and ISSR fingerprinting in cultivated chickpea (*Cicer arietinum* L.) and its wild progenitor *Cicer reticulatum* Ladizinsky. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54: 1235-1244.
183. Rao N.K. 2004. Plant genetic resources: advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal of Biotechnology*, 3(2): 136-145.
184. Rao V.R., Hodgkin T. 2002. Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68: 1-19.
185. Raubeson L.A., Jansen R.K. 2005. Chloroplast genomes of plants. Ed. Henry R.J. Plant diversity and evolution: Genotypic and phenotypic variation in higher plants. CAB International.
186. Regner F., Stadbauer A., Eisenheld C. 2001. Molecular markers for genotyping grapevine and for identifying clones of traditional varieties. *Acta Horticulturae*, 546: 331-341.



187. Rehder A. 1903. Synopsis of the genus *Lonicera*. *Annual Report of the Missouri Botanical Garden*, 27-232.
188. Rieseberg L.H. 1996. Homology among RAPD fragments in interspecific comparisons. *Molecular Ecology*, 5: 99- 105.
189. Rzhetsky A., Nei M. 1993. Theoretical foundation of the Minimum-Evolution methods of phylogenetic inference. *Molecular Biology and Evolution*, 10: 1073-1095.
190. Sachs M.M. 2009. Cereal germplasm resources. *Plant Physiology*, 149: 148-151.
191. Saitou N., Nei M. 1987. The neighbor-joining methods: a new methods for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4): 406-425.
192. Sale M.M., Potts B.M., West A.K., Reid J.B. 1996. Molecular differentiation within and between *Eucalyptus risdonii*, *E. amygdalina* and their hybrids using RAPD markers. *Australian Journal of Botany*, 44: 559-569.
193. Salemi M., Vandamme A.M. 2003. The phylogenetic handbook: A practical approach to DNA and protein phylogeny. Cambridge University Press, 406.
194. Sambrook J, Russell D.W. 2001. Molecular cloning. A laboratory manual. 3rd ed. Vol. 1. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
195. Samuel R., Stuessy T.F., Tremetsberger K., Baeza C.M., Siljak-Yakovlev S. 2003. Phylogenetic relationships among species of *Hypochaeris* (*Asteraceae*, *Cichorieae*) based on ITS, plastid *trnL* intron, *trnL-F* spacer, and *matK* sequences. *American Journal of Botany*, 90: 496-507.
196. Sang T., Crawford D.J., Stuessy T.F. 1997. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (*Paeoniaceae*). *American Journal of Botany*, 84: 1120-1136.
197. Scoggan H.J. 1979. *Lonicera* L. The flora of Canada. Ottawa: *National Museum of Natural Sciences*, 4: 1416-1420.

198. Sedgley M., Wirthensohn M.G., Delaporte K.L. 1996. Interspecific hybridisation between *Banksia hookeriana* Meisn. and *Banksia prionotes* Lindl. (*Proteaceae*). *International Journal of Plant Sciences*, 157: 638-643.
199. Semagn K., Bjørnstad Å., Ndindjop M.N. 2006. An overview of molecular marker methods for plant. *African Journal of Biotechnology*, 5(25): 2540-2569.
200. Sensoy S., Büyükalaca S., 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.
201. Sharma H.C., Pampapathy G., Reddy L.J. 2003. Wild relatives of pigeonpea as a source of resistance to the pod fly (*Melanagromyza obtusa* Malloch) and pod wasp (*Tanaostigmodes cajaninae* La Salle). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 50: 817-824.
202. Shaw J., Lickey E.B., Beck J.T., Farmer S.B., Liu W., Miller J., Siripun K.C., Winder C.T., Schilling E.E., Small R.L. 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany*, 92(1): 142-166.
203. Shaw J., Lickey E.B., Schilling E.E., Small R.L. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and hare III. *American Journal of Botany*, 94(3): 275-288.
204. Shields D.C., Wolfe K.H. 1997. Accelerated evolution of sites undergoing mRNA editing in plant mitochondria and chloroplasts. *Molecular Biology and Evolution*, 14: 344-9.
205. Shui Qing Ye. 2008. Bioinformatics: a practical approach. Boca Raton: Chapman, Hall / CRC, 618.
206. Skvortsov A.K. 1986. Blue honeysuckles (*Lonicera* subsection *Caeruleae*) of Eurasia: distribution, taxonomy, chromosome numbers, domestication. *Acta Universitatis Upsaliensis Symbolae Botanicae Upsalienses*, 27(2): 95-106.

207. Smith J.J., Scott-Craig J.S., Leadbetter J.R., Bush G.L., Roberts D.L., Fulbright, D. W. 1994. Characterization of random amplified polymorphic DNA (RAPD) products from *Xanthomonas campestris* and some comments on the use of RAPD products in phylogenetic analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 3: 135-145.
208. Smith S.A. 2009. Taking into account phylogenetic and divergence-time uncertainty in a parametric biographical analysis of the Northern Hemisphere plant clade *Caprifolieae*. *Journal of Biogeography*, 1-14.
209. Smolik M., Ochmian I., Grajkowski J. 2010. Genetic variability of Polish and Russian accessions of cultivated blue honeysuckle (*Lonicera caerulea*). *Russian Journal of Genetics*, 46(8): 960-966.
210. Sneath P.H.A., Sokal R.R. 1973. Numerical Taxonomy. W.H. Freeman and Company, San Francisco.
211. Soleimani V.D., Baum B.R., Johnson D.A. 2007. Analysis of genetic diversity in barley cultivars reveals incongruence between S-SAP, SNP and pedigree data. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54: 83-97.
212. Soltis D.E., Soltis P.S. 2000. Contributions of plant molecular systematics to studies of molecular evolution. *Plant Molecular Biology*, 42: 45-75.
213. Soltis P.S., Soltis D.E. 1998. Molecular evolution of 18S rDNA in angiosperms: implications for character weighting in phylogenetic analysis. In *Molecular systematics of plants II: DNA sequencing*, Soltis, D.E., Soltis, P.S., and Doyle, J.J., Eds., Kluwer Academic, Dordrecht, 188-210.
214. Song K.M., Osborn T.C., Williams P.H. 1988. *Brassica* taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). 1. Genome evolution of diploid and amphidiploid species. *Theoretical and Applied Genetics*, 75: 784-794.
215. Sourdis J., Krimbas C. 1987. Accuracy of phylogenetic trees estimated from DNA sequence data. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 159-166.
216. Stalker H.T. 1980. Utilization of wild species for crop improvement. *Advances in Agronomy*, 33: 111-147.

217. Staub J., Bacher J., Poetter K. 1996. Sources of potential errors in the application of random amplified polymorphic DNAs in cucumber. *Hortscience*, 31: 262-266.
218. Stegemann H., Francksen H., Masco V. 1973. Potato proteins: genetic and physiological changes, evaluated by one- and two-dimensional PAA-gel-techniques. *Zeitschrift fur Naturforschung*, 28(11): 722-732.
219. Stewart C.N., Porter D.M. 1995. RAPD profiling in biological conservation: an application to estimating clonal variation in rare and endangered *Iliamna* in Virginia. *Biological Conservation*, 74, 135-142.
220. Stothard J. R. 1997. Phylogenetic inference with RAPDs: some observations involving computer simulation with viral genomes. *Journal of Heredity*, 88: 222-228.
221. Studier J.A., Kepper K.J. 1988. A note on the neighbor-joining algorithm of Saitou and Nei. *Molecular Biology and Evolution*, 5: 729-731.
222. Svarcova I., Heinrich J., Valentova K. 2007. Berry fruits as source of biologically active compounds: the case of *Lonicera caerulea*. *Biomedical Papers*, 151(2): 163-174.
223. Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, 17: 1105-1109.
224. Tajima F. 1989. Statistical methods for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585-595.
225. Tamura K. 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Molecular Biology and Evolution*, 9: 678-687.
226. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Likelihood distance, and Parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, (in press).

227. Tamura K., Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10: 512-526.
228. Tamura K., Nei M., Kumar S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 11030-11035.
229. Tate J.A., Simpson B.B. 2003. Paraphyly of *Tarasa* (*Malvaceae*) and diverse origins of the polyploid species. *Systematic Botany*, 28: 723-737.
230. Tetsuo D., Koja A., Yokota M. 2007. Chromosomal studies of insular endemic *Lonicera japonica* Thunb. var. *miyagusukiana* (*Caprifoliaceae*) in the Ryukyu Archipelago of Japan. *Caryologia*, 60: 331-337.
231. Theis N., Donoghue M.J., Li J. 2008. Phylogenetic of the *Caprifolieae* and *Lonicera* (Dipsacales) based on nuclear and chloroplast DNA sequences. *Systematic Botany*, 33(4): 776-783.
232. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22): 4673-4680.
233. Thompson M.M., Chaovanalikit A. 2003. Preliminary observations on adaptation and nutraceutical values of blue honeysuckle (*Lonicera caerulea*) in Oregon. *Acta Horticulture*, 626: 65-72.
234. Torrey N.S., Gray A. 1838. *Lonicera* L. Flora of North America. N.Y. Hafner, 2: 4-10.
235. Van De Peer Y., De Wachter R. 1994. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Computer applications in the biosciences*, 10(5): 569-570.
236. Van de Peer Y.S., De Rijk P., Wuyts J., Winkelmanns T., De Wachter R. 2000. The European small subunit ribosomal RNA database. *Nucleic Acid Research*, 28: 175-176.

237. Van de Peer, Y. 2003. Phylogeny inference based on distance methods. In: *The phylogenetic handbook: A phylogenetic approach to DNA and protein phylogeny*. M. Salemi and A.M. Vandamme (eds). Cambridge University Press, 406.
238. Venugopal G., Mohapatra S., Salo D., Mohapatra S. 1993. Multiple mismatch annealing: basis for random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 197: 1382-1387.
239. Vir R., Bhat K.V., Lakhanpaul S. 2009. Analysis of population substructure, genetic differentiation and phylogenetic relationships among selected Asiatic *Vigna* Savi species. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56: 783-795.
240. Wagner A., Blackstone N., Cartwright P., Dick M., Misof B., Snow P. 1994. Surveys of gene families using polymerase chain reaction: PCR selection and PCR drift. *Systematic Biology*, 43: 250-261.
241. Wakasugi M., Sugita M., Tsudzuki T., Sugiura M. 1998. Updated gene map of tobacco chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology Reporter*, 16: 231-241.
242. Wang D., Karle R., Iezzoni A.F. 2000. QTL analysis of flower and fruit traits in sour cherry. *Theoretical and Applied Genetics*, 100: 535-544.
243. Wang M., Gu An-gen, Wang Li-jun. 1990. Advanced studies on *Metanonicera*. *Ibid*, 10(1): 105-109.
244. Wang M., Gu An-gen. 1988. Fruit anatomy of *Lonicera edulis* and its taxonomic significance. *Bulletin of Botanical Research*, 8(4): 203-205.
245. Weising K., Nybom H., Wolf K., Kahl G. 2005. DNA fingerprinting in plants: Principles, methods, and applications. Second edition. CRC Press, Taylor, Francis, 444.
246. Weising K., Nybom H., Wolff K., Meyer W. 1995. DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press. London, 336.
247. Welsh J., McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18(24): 7213-7218.

248. Whitlock B.A., Hale A.M., Groff P.A. 2010. Intraspecific inversions pose a challenge for the *trnH-psbA* plant DNA barcode. *PLoS ONE*, 5(7): e11533.
249. 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.
250. Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers is useful are genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18(22): 6531-6535.
251. Wolfe K.H., Li H.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 the United States of America*, 84: 9054-9058.
252. Wolfe K.H., Sharp P.M., Li W.H. 1989. Rates of synonymous substitution in plant nuclear genes. *Journal of Molecular Evolution*, 29: 208-211.
253. Wouw M., Kik C., Hintum T., Treuren R., Visser B. 2009. Genetic erosion in crops: concept, research results and challenges. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 8(1): 1-15.
254. Wünsch A., Hormaza J.I. 2002. Cultivar identification and fingerprinting of temperate fruit tree species using DNA markers. *Euphytica*, 125: 59-67.
255. Xiang Q.P., Xiang J.Q.Y., Liston A., Zhang X.C. 2004. Phylogenetic relationship in *Abies* (*Pinaceae*): evidence from PCR-RFLP of the nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 145: 425-435.
256. Yamagishi M., Matsumoto S., Nakatsuka A., Itamura H. 2005. Identification of persimmon (*Diospyros kaki*) cultivars and phenetic relationships between *Diospyros* species by more effective RAPD analysis. *Scientia Horticulturae*, 105: 283-290.
257. Yang R.W., Zhou Y.H., Ding C.B., Zheng Y.L., Zhang L. 2008. Relationships among *Leymus* species assessed by RAPD markers. *Biologia Plantarum*, 52 (2): 237-242.

258. Yang Y., Zhai Y., Liu T., Zhang F., Ji Y. 2011. Detection of *Valeriana jatamansi* as an adulterant of medicinal Paris by length variation of chloroplast *psbA-trnH* region. *Planta Medica*, 77:87-91.
259. Yukawa M., Tsudzuki T., Sugiura M. 2005. The 2005 version of the chloroplast DNA sequence from tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Plant Molecular Biology Reporter*, 23: 359-365.
260. Zamora R., Jamilena M., Ruiz Rejón M., Blanca G. 1996. Two new species of the carnivorous genus *Pinguicula*, (*Lentibulariaceae*) from Mediterranean habitats. *Plant Systematics and Evolution*, 200: 41-60.
261. Zeid M., Schön C., Link W. 2003. Genetic diversity in recent elite faba bean lines using AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 107: 1304-1314.
262. Zhang D.P., Huaman Z., Rodriguez F., Rossel G., Ghislain M. 2001. Identifying duplicates in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) cultivars using RAPD. *Acta Horticulturae*, 546: 535-541.
263. Zhang W.H., Chen Z.D., Li J.H., Chen H.B. Tang Y.C. 2003. Phylogeny of the Dipsacales s.l. based on chloroplast *trnL-F* and *ndhF* sequences. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 26(2): 176-189.
264. Zharkikh A., Li W-H. 1992. Statistical properties of bootstrap estimation of phylogenetic variability from nucleotide sequences. I. Four taxa with a molecular clock. *Molecular Biology and Evolution*, 9: 1119-1147.
265. Žilinskaitė S., Naugžemys D., Radaitienė D., Žvingila D. 2007. Investigation of blue-berried honeysuckle lines and cultivars at Vilnius University botanical garden. *Sodininkystė ir daržininkystė*, 26(3): 47-56.
266. Zurawski G., Clegg M.T., Brown A.H.D. 1984. The Nature of nucleotide sequence divergence between barley and maize chloroplast DNA. *Genetics*, 106: 735-749.
267. Žvingila D. 2009. DNR žymenų panaudojimas augalų genominiams ir bioįvairovės tyrimams. Habilitacijos procedūrai teikiamų mokslo darbų apžvalga, Vilnius.



268. Бобров Е.Г. 1983. Интрогрессивная гибридизация и геоисторические смены формаций таежной зоны. *Ботанический журнал*, 68(1): 3-9.
269. Бочкарникова Н.М. 1975. Новый вид жимолости. *Труды по прикладной ботанике, ботанике, генетике, селекции*, 54(1): 241-245.
270. Бочкарникова Н.М. 1979. *Lonicera emphylocalyx* Maxim. – новый для флоры СССР вид жимолости. *ВНИИ растениеводства*, 96: 46-48.
271. Витковский В.Л. 2003. Плодовые растения мира. Санкт-Петербург. Лань, 592.
272. Вольф Э.Л. 1899. Материалы для изучения русских видов жимолости. *СПб. лесного института*, 3: 1-78.
273. Ворошилов В.Н. 1982. *Lonicera* L. Определитель растений Советского Дальнего Востока. Москва, Наука, 524-526.
274. Ворошилов В.Н. 1992. Этапно-хорологический анализ жимолости (*Lonicera* L., *Caprifoliaceae*) из подсекции *Caeruleae* Rehd. секции *Isica* (Adans) Rehd. *Бюллетень Московского общества испытателей природы. Отдел биологический*, 97(1): 89-94.
275. Гидзюк К. 1978. Синеплодная садовая жимолость. Томск, Издательство Томского университета, 162.
276. Гидзюк К. 1981. Жимолость со съедобными плодами. Томск, Издательство Томского университета, 168.
277. Говорухин В.С. 1937. *Lonicera* L. Флора Урала. Свердловск, Свердловское областное государственное издательство, 472-473.
278. Гроссгейм А.М. 1949. *Lonicera* L. Определитель растений Кавказа. Москва, Советская наука, 244-245.
279. Жолобова З.П., Прищепина Г.А. 2003. Жимолость: история и состояние, перспективы культуры в Сибири. Барнаул, Издательство АГАУ, 108.
280. Куваев В.Б. 1980. Высотное распределение растений в горах Путорана. Москва, Наука, 230.
281. Кудрявцев А.М., Мартынов С.П., Броджио М., Пухальский В.А. 2003. Оценка возможности, использования RAPD-анализа для

- выявления филогенетических связей между сортами яровой твердой пшеницы (*T. durum* Desf.). *Генетика*, 39(9): 1237-1245.
282. Куклина А.Г. 2006. Жимолость декоративная, съедобная. Москва, Кладезь-Букс, 95.
283. Куклина А.Г. 2007. Жимолость ирга. Пособие для садоводов-любителей. Москва, Ниола-Пресс, 240.
284. Куклина А.Г., Скворцов А.К. 1990. К интродукции жимолости лийской. *Бюллетень Главного Ботанического сада*, 157: 3-9.
285. Куминов Е. 1994. Нетрадиционные садовые культуры. Мичуринск, 6.
286. Мочалова О.В., Плеханова М.Н. 1986. К вопросу о пloidности видов жимолости подсемейства *Caeruleae* Rehd. *Труды по прикладной ботанике, ботанике, генетике, селекции*, 106: 76-78.
287. Недолужко В.А. 1984. Конспект видов рода *Lonicera* (*Caprifoliaceae*) Советского Дальнего Востока. *Ботанический журнал*, 69(3): 366-367.
288. Недолужко В.А. 1986. Систематический, географический обзор жимолостей Северо-Востока Евразии. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, *Комаровские чтения*, 33: 54-109.
289. Павлинов Я. 2005. Введение в современную филогенетику. Москва, Товарищество научных изданий КМК, 392.
290. Пименов М.Г. 2001. Что кариология может дать систематике высших растений. Москва. *Эволюция, экология, биоразнообразие*, 95-114.
291. Плеханова М.Н. 1990. Актинидия, лимонник, жимолость. Ленинград, Л. Агропромиздат, 87.
292. Плеханова М.Н. 1994а. Жимолость (*Lonicera* subssect *caeruleae*): (систематика, биология, селекция). Диссертация доктора биологических наук. Санкт-Петербург, 256.
293. Плеханова М.Н. 1994б. О новом названии вида *Lonicera regeliana* Wozkarn. (*Caprifoliaceae*). *Ботанический журнал*, 79(6): 60-62.
294. Плеханова М.Н., Гяврилюк, И.П., Зайцева Н. 1989. Изучение таксономического положения видов синей жимолости по запасным

- белкам семян. *Труды по прикладной ботанике, ботанике, генетике, селекции*, 123: 124-133.
295. Плеханова М.Н., Ростова Н.С. 1994. Анализ изменчивости морфологических, анатомических, биохимических признаков *Lonicera* из подсекции *Caeruleae* (*Caprifoliaceae*) методом главных компонент. *Ботанический журнал*, 79(2): 45-64.
296. Плеханова М.Н., Соловьева Л.В., Мочалова О.В. 1992. Числа хромосом, ареал *Lonicera* subsect. *Caeruleae* (*Caprifoliaceae*). *Ботанический журнал*, 77(9): 1-11.
297. Попов М.Г. 1959. *Lonicera* L. Флора средней Сибири. АН СССР, 2: 690-692.
298. Пояркова А.И. 1958. Род *Lonicera* L. Флора СССР. АН СССР, 23: 467-573.
299. Ретина Т.А. 1969. О числах хромосом шести видов голубых жимолостей. *Биологические науки*, 6: 62-64.
300. Рябова Н.В. 1980. Жимолость. Москва, 160.
301. Санкина А.С., Жолобова З.П. 1981. Цитологическая оценка селекционного материала по жимолости. *Сибирский вестник сельскохозяйственной науки*, 6: 106-108.
302. Скворцов А.К., Куклина А.Г. 2002. Голубые жимолости: Ботаническое изучение, перспективы культуры в средней полосе России. Москва, Наука, 160.
303. Стрельцина С.А., Сорокин А.А., Плеханова М.Н., Лобанова Е. В. 2006. Состав биологически активных фенольных соединений сортов жимолости в условиях северо-западной зоны плодоводства РФ. *Аграрная Россия*, 6: 67-72.
304. Хохряков А.П. 1975. Закономерности эволюции растений. Новосибирск, Наука, 202.
305. Черепанов С.К. 1995. Сосудистые растения России, сопредельных государств. Санкт-Петербург, 992.

## **PRIEDAI**







**4 priedas.** *Lonicera* L. genties rūšių genetiniai atstumai apskaičiuoti naudojant RAPD analizės duomenis

<i>Lonicera caerulea</i> L. subsp. <i>kamtschatica</i> (Pojark.) Plekhanova	<b>1</b>									
<i>Lonicera caerulea</i> L. subsp. <i>stenantha</i> (Pojark.) Skvortsov	<b>2</b>	0,2129								
<i>Lonicera caerulea</i> L. subsp. <i>pallasii</i> (Ledeb.) Browicz	<b>3</b>	0,2180	0,2258							
<i>Lonicera caerulea</i> L. subsp. <i>altaica</i> (Pall.) Plekhanova	<b>4</b>	0,1946	0,2568	0,2215						
<i>Lonicera xylosteum</i> L.	<b>5</b>	0,5338	0,5455	0,5790	0,5556					
<i>Lonicera chrysantha</i> Turcz. ex Ledeb.	<b>6</b>	0,4685	0,4930	0,4965	0,5147	0,2000				
<i>Lonicera venulosaa</i> (Maxim.) Worosh.	<b>7</b>	0,2740	0,2966	0,2603	0,2374	0,5772	0,5338			
<i>Lonicera emphylocalyx</i> (Maxim.) Nakai	<b>8</b>	0,2105	0,2318	0,2237	0,2276	0,5659	0,5396	0,2535		
<i>Lonicera orientalis</i> Lam.	<b>9</b>	0,4199	0,4923	0,4657	0,4516	0,5185	0,5085	0,5703	0,4803	
<i>Lonicera bozchkarnikowae</i> Plekhanova	<b>10</b>	0,1875	0,2327	0,2250	0,2549	0,5037	0,4830	0,2933	0,2436	0,4667
<i>Lonicera caerulea</i> L.	<b>11</b>	0,2432	0,2245	0,2568	0,2908	0,5680	0,5259	0,2319	0,2361	0,6098
<i>Lonicera edulis</i> Turcz. ex Freyn	<b>12</b>	0,2564	0,2645	0,2436	0,2081	0,5338	0,5105	0,2740	0,2632	0,4962
<i>Lonicera vesicaria</i> Kom.	<b>13</b>	0,5807	0,4959	0,5161	0,5556	0,5644	0,5315	0,5965	0,5500	0,4950
<i>Lonicera alpigena</i> L.	<b>14</b>	0,6135	0,5593	0,6807	0,6607	0,7083	0,6226	0,5596	0,5826	0,6596
<i>Lonicera xbella</i> ?Candida?	<b>15</b>	0,5038	0,5000	0,5338	0,5556	0,5455	0,5500	0,5447	0,4729	0,5185
<i>Lonicera praeflorens</i> Batalin	<b>16</b>	0,4615	0,5194	0,5231	0,5122	0,5888	0,5556	0,5500	0,4921	0,6000
		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
										<b>10</b>