

Raktažolės pelenėlės (*Primula farinosa* L.) genetiniai tyrimai Lietuvoje

Virginija Augėnaitė, Donatas Žvingila, Edita Meškauskaitė,
Jonas Remigijus Naujalis

Vilniaus universitetas, Gamtos mokslų fakultetas, Botanikos ir genetikos katedra,
M. K. Čiurlionio g. 21/27, Vilnius, LT-03101; el. paštas: virginija.augenaite@gf.stud.vu.lt

Anotacija

Genetiniams skirtumams tarp keturių Lietuvos raktažolės pelenėlės (*Primula farinosa* L.) populiacijų nustatyti buvo panaudotas RAPD (angl. *random amplified polymorphic DNA*) metodas. Iš viso buvo ištirti 79 *P. farinosa* individai. Naudojant septynis oligonukleotidinius pradmenis, nustatyti 55 RAPD lokusai, iš kurių 16 buvo polimorfiniai. Principinių koordinacijų analizės metodu (PCoA) buvo atlikta RAPD lokusų pasiskirstymo populiacijose analizė. Visos Lietuvoje tirtos *P. farinosa* populiacijos yra genetiškai savitos.

Reikšminiai žodžiai: *Primula farinosa*, RAPD, DNR polimorfizmas.

ĮVADAS

Augalų genetinių tyrimų ištakos Lietuvoje turi būti siejamos su prof. K. Regelio vardu. Būtent jis 1935 m. paskatino Vytauto Didžiojo universiteto asistentę M. Natkevičaitę, būsimą Vilniaus universiteto botanikos profesorę M. Natkevičaitę-Ivanauskienę, genetiškai tirti tūbės (*Verbascum*) ir celsijos (*Celsia*) genčių augalų kilmę (Natkevičaitė-Ivanauskienė ir kt., 2005). Paskutiniame dešimtmetyje Lietuvoje pradėti retųjų augalų genetiniai tyrimai. Viena tokių retųjų rūšių – *Primula farinosa* L. (raktažolė pelenėlė) yra daugiametis *Primulaceae* (raktažolinių) šeimos augalas. Lietuvoje, kaip ir daugelyje kitų Europos šalių, *P. farinosa* yra saugomas poledynmečio laikotarpio reliktas, kurio augaviečių XX a. antroje pusėje labai sumažėjo daugiausia dėl žmogaus veiklos. Lietuvoje *P. farinosa* auga

šiauriniuose ir vakariniuose rajonuose, kitur reta arba visai neaptinkama (Patalauskaitė, 2007). Lietuvos herbariumuose (BILAS, WI) saugoma beveik pusantro šimto šios rūšies pavyzdžių iš visos Lietuvos teritorijos. Vidurio ir Rytų Lietuvoje yra žinomos tik atskiros *P. farinosa* radavietės, kuriose dabartiniu metu šios rūšies populiacijos dažnai yra išnykusios (pavyzdžiui, Anykščių r. Levaniškių k., Molėtų r. prie Asvejos ežero, Panevėžio r. Pašilių k., Vilniaus r. Maišiagalos apylinkėse). Genetiniu požiūriu *P. farinosa* pasaulyje dar menkai ištirta, o Lietuvoje jos populiacijų genetiniai tyrimai iki šiol nebuvo daryti. Kai kurie retų augalų rūšių tyrimai (Junmin et al., 2006; Juchum et al., 2007) atskleidė, kad tokių rūšių populiacijose genetinės įvairovės lygis yra sumažėjęs. Tačiau kitų autorių (Cardoso et al., 1998; Hannan et al., 2000; Yang et al., 2005; Naugžemys et al., 2007) paskelbti duomenys rodo, kad retos rūšys gali turėti ir gana aukštą genetinės įvairovės lygį. Mūsų tyrimo tikslas – nustatyti *P. farinosa* genetinės įvairovės lygį Lietuvoje. Tokie duomenys leistų geriau suprasti dabartinę šios rūšies populiacijų būklę ir galimas jų raidos tendencijas mūsų krašte.

METODIKA

P. farinosa populiacijų genetinės įvairovės tyrimai atlikti keturiose vietovėse: šaltiniuotoje ganomoje pievoje Alukėnų kaime (Anykščių r.), nešienaujamoje pievoje po elektros linija Jauniūnų kaime (Joniškio r.), Gudmoniškės pelkėje netoli Kurtuvėnų miestelio (Kelmės r.) ir Velėnijos žemapelkėje netoli Platelių miestelio (Plungės r.). Surinktų pavyzdžių skaičius priklausė nuo populiacijos dydžio. Kurtuvėnų populiacijoje ištirta 22, Jauniūnų ir Platelių – po 24, Alukėnų – 9 pavyzdžiai. DNR išskirta iš šviežios gegužės–spalio mėnesiais surinktos medžiagos naudojant modifikuotą CTAB metodą (Doyle et al., 1990). Genominės DNR pagausinimas ir PGR produktų dokumentavimas atliktas pagal anksčiau aprašytas metodikas (Naugžemys et al., 2007). PCoA (angl. *Principal Coordinates Analysis*) atlikta taikant kompiuterinę programą *GenAlex v.6.3* (Peakall et al., 2006).

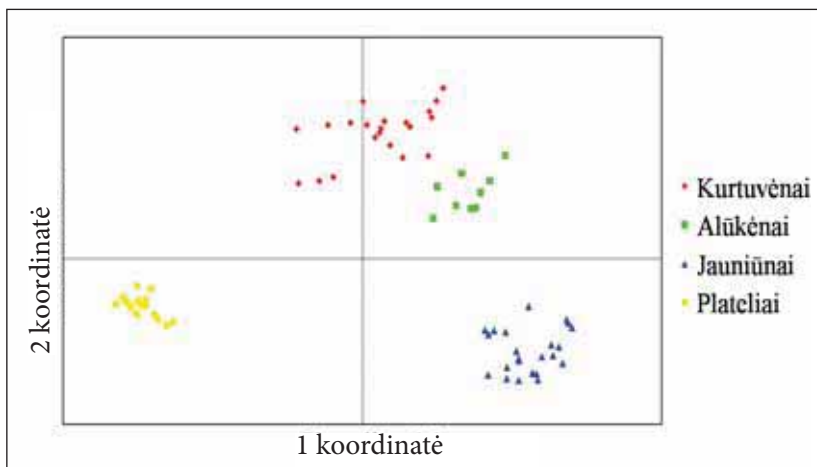
REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

P. farinosa DNR polimorfizmui tirti RAPD metodu buvo išbandyta 20 oligonukleotidinių 10 bp dydžio pradmenų. Naudojant septynis informatyviausius pradmenis, buvo ištirti 79 *P. farinosa* augalai. Atlikus RAPD analizę, nustatyti 55 RAPD lokusai, kurie patikimai kartojosi dviejuose-trijuose nepriklausomuose bandymuose (1 lentelė). Šių DNR fragmentų dydis svyravo nuo 80 bp iki 2000 bp. Didžiausią tinkamų analizuoti RAPD lokusų skaičių davė A03 (13), o mažiausią (2) – A08 pradmuo. Iš 55 lokusų 39 buvo monomorfiniai. Monomorfinių lokusų skaičius svyravo nuo 2 (A08, A10 pradmenys) iki 10 (A03 pradmuo). Vidutiniškai vienas pradmuo identifikavo 7,8 lokuso. Lyginant su kitų rūšių augalų tyrimų rezultatais, tai nėra didelis skaičius. Pavyzdžiui, *Synolycanthus chinensis* RAPD lokusų skaičius vienam pradmeniui yra 13,75 (Junmin et al., 2006), *Rosmarinus tomentosus* – 12,06 (Martin et al., 2000). Tuo tarpu *Dalbergia nigra* vidutinis RAPD lokusų skaičius, tenkantis vienam pradmeniui, yra 7,0 (Juchum et al., 2007). Nustatytas *P. farinosa* DNR polimorfizmo lygis siekė 29,1 %. Panašus žemas polimorfizmo lygis nustatytas tiriant kai kurias kitas retąsias rūšis: *Synolycanthus chinensis* populiacijose polimorfizmo lygis buvo 23,03 % (Junmin et al., 2006), *Paris quadrifolia* – 21,9 % (Jogaitė et al., 2006), *Dalbergia nigra* – 31 % (Juchum et al., 2007). Paprastai mažesnis genetinės įvairovės lygis būdingas savidulkiam augalams (Nybom et al., 2000). Mūsų tirta *P. farinosa* yra kryžmadulkis augalas, todėl mažą polimorfizmo lygį galėjo nulemti jos spartus nykimas mūsų šalyje, kažkada buvusio ištisinio arealo fragmentacija, sumažėjęs genų srautas tarp populiacijų. Šie procesai paprastai sukelia augalų genetinės įvairovės sumažėjimą ir riboja evoliucinius pokyčius rūšies ribose (Barret et al., 1999).

Principinių koordinacinių metodo (PCoA) buvo atlikta RAPD lokusų pasiskirstymo populiacijose analizė. Panaudojus Nei (1973) genetinių atstumų reikšmes, koordinacinių plokštumoje buvo atidėti taškai, rodantys individų skirtumus populiacijose (1 pav.). Trys PCoA ašys aprašo didžiąją tirtų populiacijų genetinės įvairovės dalį: pirmoji ašis – 44,98 %, antroji – 26,27 %, trečioji (paveiksle nepavaizduota) – 12,32 %.

1 lentelė. *Primula farinosa* 79 augalų genomines DNR polimorfizmas**Table 1.** Genomic DNA polymorphism of 79 *Primula farinosa* plants

Pradmuo Primer	Pradmens seka 5'. 3' Primer sequence	Monomorfinių lokusų skaičius Number of mono- morphic loci	Polimorfinių lokusų skaičius Number of poly- morphic loci	DNR fragmen- tų dydis (bp) Size of DNA fragments
A02	TGC CGA GCT G	6	2	600–1500
A03	AGT CAG CCA C	10	3	400–2000
A05	AGG GGT CTT G	7	4	400–2000
A07	GAA ACG GGT G	6	1	400–2000
A08	GTG ACG TAG G	2	0	80–230
A09	GGG TAA CGC C	6	1	230–1031
A10	GTG ATC GCA G	2	5	490–1990
Iš viso:	7	39	16	80–2000

**1 pav.** *Primula farinosa* populiacijų išsidėstymas dvimatėje erdvėje, gautas PCO**Fig. 1.** Two-dimensional representation of principal coordinate analysis of *Primula farinosa* populations

Koordinacijų sistemoje skirtingų *P. farinosa* populiacijų individai grupuojasi atskirai, – tai rodo šių populiacijų genetinį savitumą.

Mūsų gauti *P. farinosa* genetinių tyrimų rezultatai labai skiriasi nuo Šiaurės Alpešė (Reisch ir kt., 2005) atliktų tyrimų. Reisch su bendraautoriais nustatė 96 *P. farinosa* RAPD žymenis, o RAPD polimorfizmas buvo beveik tris kartus didesnis nei Lietuvoje ir siekė net 82,3 %. Manome, kad tokius skirtumus galėjo nulemti skirtingas *P. farinosa* paplitimas Lietuvoje ir Šiaurės Alpių regione. Kalnuose ekologinės sąlygos šiai reliktoinei rūšiai yra daug palankesnės, todėl ten ji yra plačiai paplitusi. Lietuvoje *P. farinosa* yra riboto geografinio paplitimo rūšis, per Lietuvą eina pietinė jos arealo riba (Natkevičaitė-Ivanauskienė ir kt., 2005). Dabartiniu metu Lietuvoje išlikusios tik nedidelės fragmentuotos populiacijos, tarp kurių genų srautas labai ribotas. Mūsų gauti rezultatai leidžia manyti, kad *P. farinosa* genetinė įvairovė Lietuvoje gali būti sumažėjusi, lyginant su populiacijomis iš Šiaurės Alpių regiono.

IŠVADOS

Primula farinosa populiacijų genetinės įvairovės tyrimams reikalinga augalinė medžiaga gali būti renkama per visą augalų vegetacijos sezoną. DNR, kurios reikia tinkamos kokybės tokio pobūdžio tyrimams atlikti, išskiriama tiek iš vasaros pradžioje, tiek iš rudenį surinktos augalinės medžiagos.

Nustatytas žemas *P. farinosa* DNR polimorfizmo lygis ($P=29,1$ %) rodo, kad šios rūšies genetinės įvairovės lygis Lietuvoje yra sumažėjęs.

Visos tirtos *P. farinosa* populiacijos yra genetiškai savitos. Susiformavę genetiniai skirtumai tarp šių populiacijų lemia visų jų išsaugejimo būtinybę Lietuvoje.

PADĖKA

Tyrimus rėmė Lietuvos valstybinis mokslo ir studijų fondas.

LITERATŪRA

- BARRET, S. C. H.; KOHN, J. R. 1999. Genetic and evolutionary consequences of small populations size in plants: implications for conservation. *Genetic and conservation of rare plants*, 4, p. 3–30.
- CARDOSO, M. A.; PROWAN, W.; POWELL, I.; OLIVEIRA, A. D. E. 1998. High genetic differentiation among remnant populations of the endangered *Caesalpinia echinata* Lam. (*Leguminosae* – *Caesalpinioidea*). *Molecular Ecology*, 7, p. 601–608.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, p. 3–5.
- HANNAN, G. L.; ORICK, M. W. 2000. Isozyme diversity in *Iris cristata* and the threatened glacial endemic *I. lacustris* (*Iridaceae*). *American Journal of Botany*, 87, p. 293–301.
- YOUNG, A. B.; BROWN, A. H. D. 2005. Comparative population genetic structure of the rare woodland shrub *Daviesia suaveolens* and its common congener *D. mimosoides*. *Conservation Biology*, 10, p. 1220–1228.
- JOGAITĖ, V.; NAUJALIS, J. R.; LAZUTKA, J. R. 2006. Genetic diversity in fragmented population of herb – *Paris* (*Paris quadrifolia* L., *Trilliaceae*). *Biologija*, 2, p. 5–12.
- JUCHUM, F. S.; LEAL, J. B.; SANTOS, L. M.; ALMEIDAM, P.; AHNERT, D.; CORREA, R. X. 2007. Evaluation of genetic diversity in a natural rosewood population (*Dalbergia nigra* Vell. Allmao ex Benth.) using RAPD markers. *Conservacao Internacional Belo Horizonte*, 69, p. 465–472.
- JUNMIN, L. I.; ZEXIN, J. 2006. High genetic differentiation revealed by RAPD analysis of narrowly endemic *Sinolycanthus chinensis* Cheng et S. Y. Chang, and endangered species of China. *Biochemical systematics and ecology*, 34, p. 725–735.
- MARTIN, J. P.; BERMJERO, J. E. 2000. Genetic variation in the endemic and endangered *Rosmarinus tomentosus* Huber – Morath and Maire (*Labiatae*) using RAPD markers. The genetical society of Great Britain, *Heredity*, 85, p. 434–443.
- NATKEVIČAITĖ-IVANAUSKIENĖ, M.; NAUJALIS, J. R.; TUPČIAUSKAITĖ, J.; RUKŠĖNIENĖ, J.; MEŠKAUSKAITĖ, E. 2005. *Lietuvos augalinių rūbų struktūra: profesorės Marijos Natkevičaitės-Ivanauskienės požiūris*. Vilnius, 226 p. ISBN 9986-19-776-7.
- NAUGŽEMYS, D.; ŽVINGILA, D.; MEŠKAUSKAITĖ, E.; NAUJALIS, J. R. 2007. Analysis of DNA polymorphism in Lithuanian populations of *Saxifraga hirculus* L. *Biologija*, 53, p. 81–86.
- 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, p. 93–114.

PATALAUSKAITĖ, D. 2007. Raktažolė pelenėlė. *Lietuvos raudonoji knyga*. Kaunas, 436 p.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E.; 2006. GENALEX 6. Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular ecology notes*, 6, p. 288–295.

REISCH, CH.; ANKE, A.; ROHL, M. 2005. Molecular variation within and between ten populations of *Primula farinosa* L. along altitudinal gradient in the northern Alps. *Basic and applied ecology*, 6/1, p. 34–35.

GENETIC STUDIES OF *PRIMULA FARINOSA* L. IN LITHUANIA

Summary

Genetic diversity of *Primula farinosa* L., an endangered species in Lithuania, was analyzed using RAPD method. Four populations from different places of Lithuania were studied. Totally, 55 RAPD bands were revealed from 7 primers. 29,1 % of RAPD bands were polymorphic. PCoA showed genetic specificity of studied populations.

Key words: *Primula farinosa*, RAPD, DNA polymorphism