

PAPRASTOSIOS EGLĖS (*PICEA ABIES* (L.) KARST.) PLUSINIŲ MEDŽIŲ KLONŲ GENETINĖS ĮVAIROVĖS IR TAPATUMO ĮVERTINIMAS APPD METODU

Ramunė Staniulytė¹, Donatas Žvingila^{1,2}, Sigutė Kuusienė¹

¹Lietuvos miškų institutas

Liepų g. 1, LT-53101 Girionys, Kauno r.

²Vilniaus universitetas

M. K. Čiurlionio g. 21, LT-03101 Vilnius

Santrauka

Staniulytė R., Žvingila D., Kuusienė S. Paprastosios eglės (*Picea abies* (L.) Karst.) plusinių medžių klonų genetinės įvairovės bei tapatumo įvertinimas APPD metodu. – Miškininkystė, 2004, Nr. 2 (56), 5–12.

APPD (atsitiktinai pagausinta polimorfinė DNR; angl. RAPD, *random amplified polymorphic DNA*) metodas buvo panaudotas paprastosios eglės (*Picea abies* (L.) Karst.) plusinių medžių klonų genetinei įvairovei įvertinti bei genotipo specifiniams žymenims nustatyti. Tirti 23 paprastosios eglės klonai, kilę iš įvairių Lietuvos vietovių ir auginami kloniniame archyve, esančiame Dubravos eksperimentinėje-mokomojoje miškų urėdijoje. Tyrimams buvo panaudota 20 oligonukleotidinių pradmenų. Iš viso nustatyti 299 atsitiktinai pagausinti DNR fragmentai, iš kurių 243 – polimorfiniai. Rezultatai atskleidė didelę tirtų klonų genetinę įvairovę. Genetinis atstumas svyravo nuo 0,2905 iki 0,5000. Nustatyta 14 genotipui specifinių molekulinį žymenų.

APPD metodas taip pat buvo panaudotas klonų tapatumui patikrinti. Šiam tyrimui paimti trijų paprastosios eglės plusinių medžių klonai (kiekvieno po 5 rametas). Palyginus APPD spektrus, buvo nustatyta keletas netikslumų, greičiausiai atsiradusių dėl klonų sodinimo ar žymėjimo klaidų. Taip pat buvo sukurta 23 klonų APPD spektrų biblioteka, kuri gali būti naudojama klonų tapatumui įvertinti. Tyrimai patvirtino, kad APPD metodas yra efektyvus ir patogus paprastosios eglės genetinei įvairovei tirti bei dauginamosios medžiagos tapatumo kontrolei miškų ūkyje atlikti. Šis metodas gali būti naudojamas Lietuvos paprastosios eglės genetiniams ištekliams analizuoti, tvarkyti bei išsaugoti.

Raktažodžiai: APPD, plusinių medžių klonai, genetinė įvairovė, klonų tapatumas, *Picea abies*.

Summary

Staniulytė R., Žvingila D., Kuusienė S. Estimation of genetic diversity and identity in plus tree clones of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) using RAPD method. – Miškininkystė, 2004, Nr. 2 (56), 5–12.

The RAPD (random amplified polymorphic DNA) was used to assess genetic diversity and to identify genotype specific markers in Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) plus tree clones. Twenty-three genotypes originally collected from different localities of Lithuania and now growing in a clonal archive at Dubrava experimental-training forest enterprise were analyzed by using 20 oligonucleotide primers. A total of 299 RAPD bands were scored, of which 243 were polymorphic. The estimated genetic distance varied from 0.2905 to 0.5000. These results confirm that studied *P. abies* clones exhibit a high genetic variation. Fourteen genotype-specific DNA bands were identified.

The RAPD technique was also used to check the clonal identity. We compared RAPD profiles of 5 ramets for each of 3 plus tree. Some differences in the RAPD patterns resulting from mis-planting or mis-labeling of cuttings were found. We also established a reference library of RAPD fingerprints for 23 clones, which could serve as a reference source in cases of litigation concerning clone identity. This study confirmed that the RAPD technique is a useful tool for *Picea abies* genetic analysis and for forestry service in managing propagation operations. Also it could be useful for Norway spruce genetic resources analysis and conservation in Lithuania.

Key words: RAPD, plus tree clone, genetic diversity, clonal identity, *Picea abies*.

Įvadas

Paprastoji eglė yra viena iš labiausiai paplitusių medžių rūšių Lietuvos miškuose. Remiantis 2003 metų Lietuvos miškų valstybinės apskaitos duomenimis, paprastoji eglė užima 22,8% viso miškų ploto (441,9 tūkst. ha.). Eglė – Lietuvoje antroji pagal užimamą plotą medžių rūšis, todėl eglynų būklė labai svarbi ne tik ekologine, bet ir ūkine prasme. Pagal daugiamečio miškų monitoringo duomenis, iki 1995 metų eglynų būklė Lietuvoje nuolat blogėjo, nes didėjo vidutinė defoliacija

ir mažėjo santykinai sveikų eglių. Paskutiniaisiais metais pastebima eglynų atsikūrimo tendencija. Svarbiausia didelės eglių defoliacijos 1993–1996 metais priežastis buvo žievėgraužio tipografo invazija (Ozolinčius ir kt., 1999).

Tiek Lietuvoje, tiek pasaulyje šiuo metu ypač aktualūs miško medžių genetinių išteklių tyrimai, jų analizė ir išsaugojimas. Lietuvos miškų išteklių yra vienas iš didžiausių Lietuvos nacionalinių turtų. Jų atranka, tyrimas ir išsaugojimas yra sudėtingas ir ilgai trunkantis procesas. Miško medžių genetiniai išteklių yra pagrindas miško selekcijai plėtoti, miškų produktyvumui ir kokybei didinti. 1972–1997 metais sukurtas platus Lietuvos pagrindinių miško medžių rūšių genetinių išteklių išsaugojimo *in situ* ir *ex situ*, tyrimų ir naudojimo objektų tinklas, susidedantis iš genetinių draustinių, sėklinių plantacijų, plusinių medžių, provenencijų, klonų archyvų, bandomųjų želdinių ir t. t. Naujų netradicinių metodų tinkamumo nagrinėjimas ir taikymas vertingiems Lietuvos miško genetiniams ištekliams testuoti ir identifikuoti sudarys galimybę įvertinti ir atrinkti vertingiausias miško genetinius išteklius, taip pat paspartinti miško medžių selekciją bei padidinti jos efektyvumą ir rezultatyvumą (Baliuckas ir kt., 1997).

Šiuo metu labai aktuali naujų požymių, tinkamų genetinei analizei, paieška. Vis dažniau moksle ir praktikoje taikomi molekuliniai žymenys, turintys nemažai pranašumų prieš tradicinius morfologinius: jų nepaprastai didelė įvairovė, neveikia aplinkos sąlygos, atranką galima vykdyti tiesiogiai DNR lygmenyje, tyrimams atlikti nereikia laukti, kol medis užaugs ir t. t. APPD – vienas iš tinkamiausių metodų siekiant nustatyti didelį kiekį molekulinį žymenų (Williams et al., 1990). Jis plačiai naudojamas ir augalų genetiniams tyrimams (Hwang et al., 2001; Fahima et al., 1999; Rodriguez et al., 1999; Volis et al., 2001).

Molekulinį žymenų paieškos miško medžiuose pradedamos vykdyti ir Lietuvoje. Jau atlikti paprastosios pušies plusinių medžių klonų genetinės įvairovės tyrimai, taikant atsitiktinai pagausintos polimorfinės DNR (APPD) metodą (Žvingila ir kt., 2002). Taip pat šis metodas pritaikytas paprastojo uosio Lietuvos populiacijų genetinės įvairovės tyrimams (Kuusienė ir kt., 2003) bei hibridinės drebulės (*Populus tremuloides* x *Populus tremula*) klonų Nr. 8 augalų regenerantų, išaugintų audinių kultūroje *in vitro*, tapatumui nustatyti (Kuusienė et al., 2003).

Tyrimo tikslas – iširti paprastosios eglės plusinių medžių klonų genetinę įvairovę, nustatyti specifinius genotipo žymenis atsitiktinai pagausintos polimorfinės DNR metodu (APPD), pritaikyti šį metodą klonų tapatumui nustatyti bei pradėti kurti APPD spektrų biblioteką.

Tyrimo medžiaga ir metodai

Visa augalinė medžiaga paimta iš paprastosios eglės plusinių medžių skiepytų klonų archyvo, esančio Dubravos eksperimentinėje-mokomojoje miškų urėdijoje. Klonų genetinės įvairovės tyrimams panaudoti 23 plusinių medžių klonai. Siekiant atskleisti genetinę įvairovę, atrinkti klonai, kilę iš įvairių Lietuvos vietovių. Klonų kilmė bei numeriai, atitinkantys plusinių medžių numerius, pateikti 1 lentelėje. Klonų tapatumo tyrimams panaudoti 050, 051, 053 plusinių medžių klonai – kiekvieno po penkis rametas. Surinkti spygliai saugomi -35°C temperatūroje.

Genominė DNR buvo išskirta iš spyglių, panaudojus genominės DNR išskyrimo rinkinį #K0512 (UAB *Fermentas*, Lietuva). DNR koncentracija nustatyta spektrofotometru (*BioPhotometer*, Eppendorf) 260 nm bangos ilgyje.

DNR polimorfizmui tirti APPD metodu panaudota 20 oligonukleotidinių pradmenų Roth 170-(01-10) ir 370-(01-10). Klonų tapatumo tyrimams panaudoti 6 informatyvūs pradmenys: Roth 170-01, Roth 170-03, Roth 170-04, Roth 170-05, Roth 370-09 ir Roth 370-10. Reakcijos mišinio sudėtis: 25 μl sudaro 200 ng genominės DNR, 1,0 vnt. Taq DNR polimerazės (UAB *Fermentas*, Lietuva), 0,4 μM pradmens, 0,2 mM dNTP, 3,0 mM MgCl_2 ir 2,5 μl 10x reakcijos buferio (UAB *Fermentas*, Lietuva). Genominės DNR pagausinimo reakcijos atliktos termocikleryje *TGradient* (*Biometra*).

Genominė DNR pagausinta per 45 ciklus, susidedančius iš tokių temperatūra kontroliuojamų pakopų: denatūracija 94°C 1 min.; oligonukleotidinių pradmenų prilipimas 35°C 1 min.; pradmenų ilginimas 72°C 2 min. Kiekviena reakcija buvo kartojama du kartus. PGR produktai buvo atskiriami 1,5% agarozės (Roth, Vokietija) gelyje elektroforezės metu ir išryškinti nudažius etidžio bomidu. Geliai buvo fotografuojami ant UV-transiliumatoriaus, naudojant *BioDocAnalyse* sistemą (*Biometra*).

Duomenų analizė atlikta vertinant tik aiškias, patikimai pasikartojančias DNR juostas. Tam tikro dydžio DNR fragmento buvimas ar nebuvimas objekto pagausintos genominės DNR spektre žymėtas atitinkamai 1 arba 0. Vienodo judrumo DNR juostos laikomos identiškomis. Gelio vietos, kurias dėl daugybės fragmentų sudėtinga tiksliai įvertinti, nebuvo analizuojamos. Genotipų palyginimas pagal RAPD rezultatus atliktas naudojant TREECON programą, pritaikytą *Windows* aplinkai (Van de Peer & De Wachter, 1994). Genetiniai atstumai apskaičiuoti naudojantis formule (Link et al., 1995):

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

čia N_{xy} – bendrų DNR juostų skaičius genotipuose x ir y,

N_x – DNR fragmentų skaičius genotipo x pagausinimo spektre,

N_y – DNR fragmentų skaičius genotipo y DNR pagausinimo spektre.

Dendrograma nubraižyta pritaikius UPGMA (*unweighed pair-group method of arithmetic averages*) grupavimo metodą.

Rezultatai**Genetinės įvairovės tyrimai**

Paprastosios eglės plusinių medžių klonų genetinės įvairovės tyrimams buvo panaudota 20 atsitiktinių pradmenų, iš kurių 18 buvo informatyvūs – su jais gauti DNR pagausinimo produktai, o su 2 pradmenimis pagausinimas visai nevyko. Apibendrinti APPD rezultatai pateikiami 2 lentelėje. Iš viso buvo nustatyti 299 DNR fragmentai, iš kurių 243 buvo polimorfiniai. Vidutiniškai su vienu pradmeniu gauta 16,6 fragmento. Daugiausia DNR fragmentų gauta su pradmenimis Roth 170-02, Roth 370-06, Roth 170-09, Roth 370-05, o mažiausiai su Roth 370-03. Fragmentų dydis įvairavo nuo 300 iki 4000 bazių porų (bp).

1 lentelė. Tirtų paprastosios eglės plusinių medžių klonų numeriai ir kilmė

Table 1. The numbers and origins of Norway spruce plus tree clones used in the study

Nr. No.	Plusinis medis (Nr.) <i>Plus tree (No.)</i>	Kilmė <i>Origin</i>
1.	050	Dubravos urėdija, Vaišvydavos girininkija
2.	051	Dubravos urėdija, Vaišvydavos girininkija
3.	053	Kazlų Rūdos urėdija, Kazlų Rūdos girininkija
4.	001	Prienų urėdija, Prienų girininkija
5.	012	Rokiškio urėdija, Vyžuonos girininkija
6.	016	Rokiškio urėdija, Sėlynės girininkija
7.	027	Rokiškio urėdija, Kamajų girininkija
8.	032	Alytaus urėdija, Punios girininkija
9.	042	Marijampolės urėdija, Sasnavos girininkija
10.	058	Šakių urėdija, Šilagirio girininkija
11.	084	Marijampolės urėdija, Varnabūdės girininkija
12.	089	Ukmergės urėdija, Šešuolėlių girininkija
13.	097	Ukmergės urėdija, Gelvonų girininkija
14.	101	Šakių urėdija, Gerdžių girininkija
15.	111	Kauno urėdija, Vilkijos girininkija
16.	124	Vilniaus urėdija, Mickūnų girininkija
17.	127	Vilniaus urėdija, Taurų girininkija
18.	128	Vilniaus urėdija, Dūkštų girininkija
19.	130	Alytaus urėdija, Daugų girininkija
20.	141	Kėdainių urėdija, Josvainių girininkija
21.	155	Pakruojo urėdija, Rozalimo girininkija
22.	161	Pakruojo urėdija, Lygumų girininkija
23.	301	Ignalinos urėdija, Kazitiškio girininkija

Iš 18 informatyvių pradmenų 17 atskleidė didelę 23 tirtų paprastosios eglės plusinių medžių klonų genetinę įvairovę. 81,3% ištirtų fragmentų buvo polimorfiniai. 1 ir 2 paveiksluose pateikti APPD rezultatai agarozės gelyje su Roth 370-09 ir Roth 370-10 pradmenimis. Tik Roth 370-03 pradmuo (3 paveikslas) neparodė genetinės įvairovės tarp tirtų klonų. Nors su šiuo pradmeniu buvo pagausinta 12 fragmentų, tačiau su visais tirtais klonais gauti vienodi DNR pagausinimo spektrai. Greičiausiai šie fragmentai yra būdingi rūšiai. Roth 370-03 pradmuo gali būti vertingas tarprūšiniams eglės tyrimams.

Išanalizavus APPD pagausinimo spektrus, aptikta 14 genotipui specifinių žymenų, kurie galėtų identifikuoti 12 tirtų klonų (3 lentelė). Daugiausiai genotipui specifinių žymenų – net trys – gauta su Roth 170-02 pradmeniu. Šis pradmuo tinkamas 053, 016 ir 089 klonams atpažinti. Roth 370-10 pradmuo pagausino du genotipui specifinius žymenis, o likusieji devyni pradmenys – po vieną. Tiriant kloną 053, aptikti trys žymenis su trim skirtingais pradmenimis (Roth 170-02, Roth 170-08 ir Roth 370-10).

Kituose 11-oje klonų aptikta po vieną atskiram genotipui būdingą DNR fragmentą. Remiantis APPD duomenimis, buvo apskaičiuotas genetinis atstumas (Link et al., 1995) tarp klonų (4 lentelė). Didžiausias genetinis atstumas nustatytas tarp 141 ir 016 klonų, o mažiausiai genetiškai nutolę klonai yra 161 ir 155. Vidutinis genetinis atstumas tarp tirtų 23 klonų yra 0,395. Remiantis gautais genetinėmis atstumais ir panaudojus UPGMA grupavimo metodą, buvo nubraižyta dendrograma, rodanti tirtų paprastosios eglės plusinių medžių klonų genetinę įvairovę (5 paveikslas).

Klonų tapatumo tyrimai

APPD metodas buvo pritaikytas paprastosios eglės plusinių medžių klonų tapatumui įvertinti, siekiant nustatyti galimas klonų sodinimo ar žymėjimo klaidas. Tyrimams buvo pasirinkti 050, 051 ir 053 plusinių medžių klonai. Kiekvienu atveju tarpusavyje buvo palyginti penkių skiepytų klonų (rametų) APPD spektrai, gauti panaudojus šešis skirtingus pradmenis. Tyrimų metu buvo aptikta keletas netikslumų. APPD spektruose aiškiai išryškėjo kai kurių tos pačios kilmės klonų skirtumai. Nustatyta, kad tik 053 plusinio medžio visos penkios rametos yra vienodos (4C pav.), nes su visais

panaudotais pradmenimis gauti penki tapatūs APPD spektrai. Tarp tirtų 050 plusinio medžio rametų (4A pav.) išsiskyrė 2 rameta, kurios APPD spektras su visais pradmenimis aiškiai skyrėsi nuo likusių keturių. Tiriant 051 rametas (4B pav.) gauti trys skirtingi APPD profiliai: 2, 3 ir 4 rametų spektrai vienodi, o 1 ir 5 rametų skyrėsi tiek tarpusavyje, tiek nuo likusių individų. Tai reiškia, kad sodinant buvo sumaišyti trijų skirtingų plusinių medžių klonai.

Sukaupta 23 klonų APPD spektrų biblioteka, gauta panaudojus 18 informatyvių pradmenų. Šie duomenys gali būti naudojami tirtų klonų tapatumui įvertinti (Scheepers et al., 1997).

2 lentelė. Paprastosios eglės 23 plusinių medžių klonų tyrimo APPD metodu rezultatai

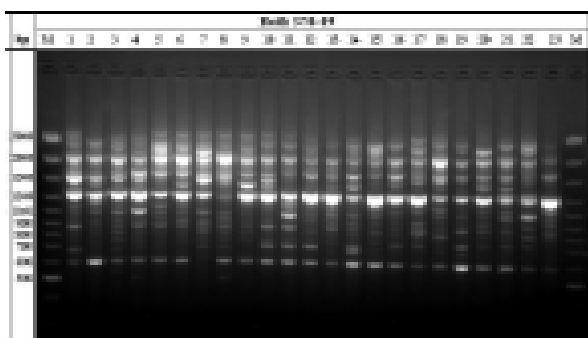
Table 2. The results of study of 23 Norway spruce plus tree clones using RAPD method

APPD pradmuo <i>RAPD primer</i>	Bendras fragmentų sk. <i>Total bands</i>	Polimorfinių fragmentų sk. <i>Polymorphic bands</i>	DNR fragmentų dydis (bp) <i>Size range of DNA fragments (bp)</i>	Genotipui specifinių fragmentų sk. <i>Genotype specific- bands</i>
Roth 170-01	13	10	300–4000	1
Roth 170-02	29	25	420–2900	3
Roth 170-03	14	9	690–2900	0
Roth 170-04	19	17	350–3100	0
Roth 170-05	13	11	510–3200	1
Roth 170-06	-	-	-	-
Roth 170-07	-	-	-	-
Roth 170-08	13	9	790–2580	1
Roth 170-09	20	19	520–3100	0
Roth 170-10	17	15	550–3000	1
Roth 370-01	16	15	850–3000	1
Roth 370-02	14	13	600–3500	1
Roth 370-03	12	0	880–3000	0
Roth 370-04	13	12	450–2500	1
Roth 370-05	20	18	450–3100	1
Roth 370-06	21	17	480–3100	0
Roth 370-07	13	10	650–2050	0
Roth 370-08	18	15	650–3400	1
Roth 370-09	19	15	500–3150	0
Roth 370-10	15	13	510–2600	2

3 lentelė. Genotipui specifiniai APPD fragmentai

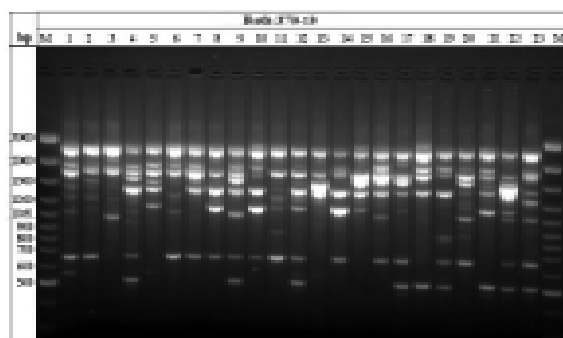
Table 3. Genotype-specific RAPD fragments

Nr. <i>No.</i>	Klonas <i>Clone</i>	Pradmuo <i>Primer</i>	DNR fragmento dydis (bp) <i>Size of DNA fragment (bp)</i>
1.	012	Roth 170-01	1200
2.	053	Roth 170-02	560
3.	016	Roth 170-02	700
4.	089	Roth 170-02	800
5.	032	Roth 170-05	510
6.	053	Roth 170-08	1050
7.	301	Roth 170-10	750
8.	051	Roth 370-01	900
9.	084	Roth 370-02	780
10.	027	Roth 370-04	700
11.	155	Roth 370-05	450
12.	027	Roth 370-08	1050
13.	130	Roth 370-10	850
14.	053	Roth 370-10	1000



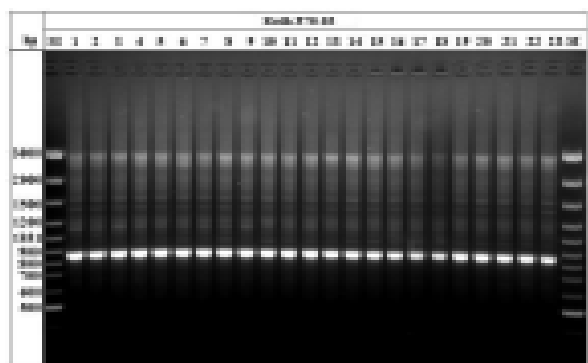
1 pav. Paprastosios eglės plusinių medžių klonų APPD spektrai, gauti naudojant Roth 370-09 pradmenį. Skaičiai nuo 1 iki 23 atitinkamai reiškia plusinių medžių klonų numerius (1 lentelė), M – 100 bp dydžio žymenį

Fig. 1. RAPD patterns of Norway spruce plus tree clones analyzed with primer Roth 370-09. Lanes 1 to 23 correspond to the plus tree clones listed in table 1. M – 100 bp size marker



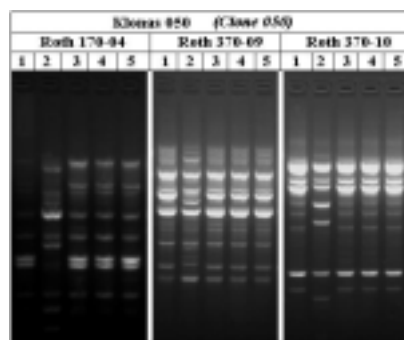
2 pav. Paprastosios eglės plusinių medžių klonų APPD spektrai, gauti naudojant Roth 370-10 pradmenį. Skaičiai nuo 1 iki 23 atitinkamai reiškia plusinių medžių klonų numerius (1 lentelė), M – 100 bp dydžio žymenį

Fig. 2. RAPD patterns of Norway spruce plus tree clones analyzed with primer Roth 370-10. Lanes 1 to 23 correspond to the plus tree clones listed in table 1. M – 100 bp size marker

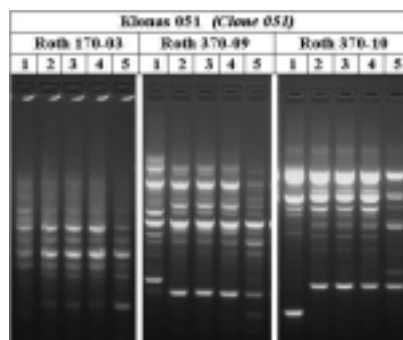


3 pav. Paprastosios eglės plusinių medžių klonų APPD spektrai, gauti naudojant Roth 370-03 pradmenį. Skaičiai nuo 1 iki 23 atitinkamai reiškia plusinių medžių klonų numerius (1 lentelė), M – 100 bp dydžio žymenį

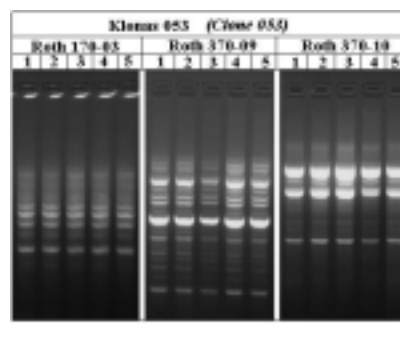
Fig. 3. RAPD patterns of Norway spruce plus tree clones analyzed with primer Roth 370-03. Lanes 1 to 23 correspond to the plus tree clones listed in table 1. M – 100 bp size marker



A



B



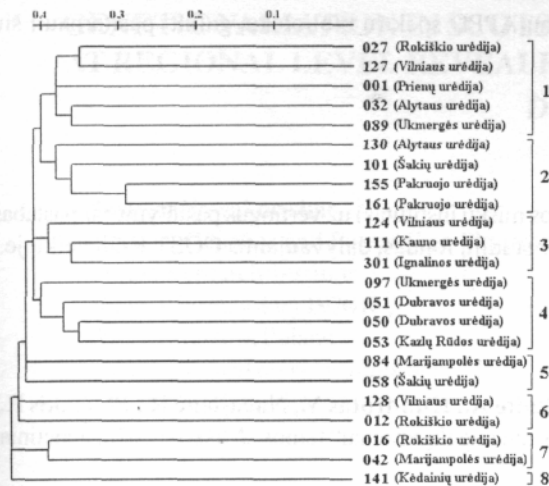
C

4 pav. Trijų paprastosios eglės plusinių medžių 5 rametų APPD spektrai. A 050 plusinio medžio rametos su Roth 170-04, Roth 370-09 ir Roth 370-10 pradmenimis. B 051 plusinio medžio rametos su Roth 170-03, Roth 370-09 ir Roth 370-10 pradmenimis. C 053 plusinio medžio rametos su Roth 170-03, Roth 370-09 ir Roth 370-10 pradmenimis

Fig. 4. RAPD profiles of 5 ramets for each of three Norway spruce plus tree. A 050 plus tree ramets using primers Roth 170-04, Roth 370-09 and Roth 370-10. B 051 plus tree ramets using primers Roth 170-03, Roth 370-09 and Roth 370-10. C 053 plus tree ramets using primers Roth 170-03, Roth 370-09 and Roth 370-10

Diskusijos

Lietuvoje yra keturi paprastosios eglės kloniniai archyvai, kuriuose sukaupta 412 plusinių medžių (23,1 ha plote). Sutelkus vertingiausias genotipus vienoje (ar keliose) vietoje, jie apsaugomi nuo sunaikinimo (ar žuvimo), galima iširti jų paveldimąsias savybes ir panaudoti miško reprodukcijai (Gabrilavičius, Danusevičius, 2003). Kloniniame archyve, esančiame Dubravos eksperimentinėje-mokomojoje miškų urėdijoje, saugomi ypatingi paprastosios eglės genotipai, tokie kaip buvusios aukščiausios Prienų (Prienų girininkija) ir Alytaus (Punios girininkija) eglės. Nors didelė dalis plusinių medžių, tarp jų ir minėti



5 pav. Paprastosios eglės tirtų plusinių medžių klonų dendrograma pagal genetinius atstumus (Link et al., 1995), sudaryta UPGMA grupavimo metodu

Fig. 5. Dendrogram of studied Norway spruce plus tree clones based on genetic distance (Link et al., 1995), generated by UPGMA cluster method

medžiai, jau žuvę, tačiau vegetatyviniai jų palikuonys išsaugo genetinę informaciją, o kartu ir vertingus fenotipinius požymius. Atlikti eglės kariotipiniai, izoenzimų tyrimai bei Lietuvos populiacijų fenotipinio ir genotipinio kintamumo analizė (Gabrilavičius, Danusevičius, 2003), taip pat ilgametis Lietuvos miškų monitoringas (Ozolinčius, 1999). Tai didžiulis indėlis, tiriant bei siekiant išsaugoti Lietuvos paprastosios eglės genetinius išteklius. Tačiau duomenų apie eglės DNR lygmens tyrimus Lietuvoje dar nėra. Tai pirmieji molekuliniai žymenų paieškos atsitiktinai pagausintos polimorfines DNR metodu tyrimai.

Skirtingos medžių rūšys reikalauja tiek DNR išskyrimo, tiek PGR sąlygų optimizavimo (Weising et al., 1995; Nkongolo et al., 1998; Thomas et al., 1999; Yeh et al., 1995; Gallois et al., 1998), todėl pradiniam tyrimų etape buvo nustatyta, kad naudojant UAB *Fermentas* genomines DNR skyrimo rinkinį #K0512 iš eglės spyglių išskiriamas pakankamas kiekis kokybiškos ir pagausinti tinkamos DNR. Mokslinių šaltinių duomenimis, DNR kiekis yra vienas iš svarbiausių veiksnų nustatyti PGR sąlygas ir nulemia APPD spektro kokybę. Tinkamai neatlikus sąlygų optimizacijos, gaunami neryškūs APPD fragmentai, kuriuos sudėtinga vertinti tolesniuose tyrimų etapuose (Scheepers et al., 1997).

Tyrimų metu buvo nustatyti genotipui specifiniai žymenys bei genotipui specifiniai genomines DNR pagausinimo spektrai. Iš 18 informatyvių pradmenų net 7 pradmenys (Roth 170-04, Roth 170-09, Roth 170-10, Roth 370-01, Roth 370-04, Roth 370-05 ir Roth 370-09), naudojami po vieną, gali atskirti visus tirtus genotipus, nes su jais gaunami 23 skirtingi APPD spektrai. Taip pat nustatyta 14 genotipui specifinių žymenų, galinčių identifikuoti 12 tirtų klonų. Tačiau išlieka galimybė, kad ištyrus daugiau pavyzdžių, šie žymenys prarastų unikalumą. Todėl kiekvienam klonui reikėtų nustatyti daugiau specifinių žymenų.

Remiantis Lietuvos miško gamtiniu rajonavimu ir populiacijų struktūrinių požymių skirtumais, išskiriami 6 paprastosios eglės sėkliniai rajonai: Žemaičių aukštumos (1), Vidurio žemumos (2), Aukštaičių aukštumos (3), Pajūrio žemumos (4), Sūduvos–Nemuno vidurpio (5) ir Dzūkijos–Sūduvos aukštumų (6) (Danusevičius ir kt., 1999). Tyrimams buvo atrinkti klonai, kilę iš antrojo, trečiojo ir penktojo sėklinio rajono. APPD tyrimai atskleidė didelę genetinę įvairovę tarp tirtų klonų, kadangi gauta net 81,3% polimorfinių produktų. Tačiau atitikimas tarp genotipų ir geografinių atstumų gana nežymus (5 pav.). Gauta dendrograma sudaryta iš 8 grupių (klasterių). Heterogeniškausias 1-as klasteris, į kurį patenka medžiai iš trijų skirtingų sėklinių rajonų. Tuo tarpu kiti klasteriai yra gana homogeniški ir juose galima pastebėti genotipų genetinio atstumo ir geografinės kilmės priklausomybę. Pavyzdžiui, 2-ąjį klasterį sudaro 50% penktojo ir 50% antrojo sėklinio rajono kilmės individų. 75% 4-ojo klasterio sudaro individai, kilę iš penktojo sėklinio rajono. 5-as klasteris yra homogeniškas ir sudarytas tik iš penkto sėklinio rajono individų. Be to, jis yra šalia 4-ojo, kuris taip pat didele dalimi sudarytas iš penkto sėklinio rajono eglė. Taigi tam tikra priklausomybė tarp geografinės kilmės ir genetinio giminingumo neabejotinai egzistuoja. To paties sėklinio rajono individų patekimą į skirtingus klasterius būtų galima aiškinti populiacine sėklinių rajonų diferenciacija, eglė biologijos ypatumais ir tuo, kad išanalizuota tik nedidelė tirtų individų geno dalis, bei galimais kloninio archyvo tvarkymo netikslumais. Kad netikslumai egzistuoja, parodė ir klonų tapatumo tyrimai.

Kuriant kloninius archyvus neretai pasitaiko klaidų skiepijant, sodinant ar žymint klonus. Panašūs paprastosios eglės klonų tapatumo tyrimai buvo atlikti Belgijos paprastosios eglės kloniniame archyve. APPD metodu, panaudojus 3 skirtingus pradmenis, buvo nustatyti genotipų neatitikimai (Scheepers et al., 1997). Tyrimai patvirtino, kad APPD metodas yra efektyvus genotipų tapatumui ar skirtumui nustatyti. Taikant šį metodą pradiniam kloninio archyvo kūrimo etape, būtų galima išvengti šių netikslumų ir kartu užtikrinti geresnę sėklinės medžiagos kokybę ir patikimumą.

Išvados

Tirti paprastosios eglės plusinių medžių klonai pasižymi didele genetinė įvairove, nes gauta 81,3% polimorfinių APPD produktų.

Surasti 7 oligonukleotidiniai pradmenys, kurių kiekvienas gali būti panaudotas APPD metodu nustatant visų 23 tirtų plusinių medžių klonų tapatumą. Aptikta 14 genotipui specifinių APPD žymenų.

Taikant APPD metodą galima nustatyti paprastosios eglės plusinių medžių klonų archyvo sudarymo klaidų.

Sukurta 23-jų tirtų paprastosios eglės plusinių medžių klonų APPD spektrų biblioteka, galinti pasitarnauti šių klonų tapatumui įvertinti.

Padėka

Nuoširdžiai dėkojame doc. dr. Rimvydui Gabrilavičiui (Lietuvos miškų institutas) už vertingus pasiūlymus ir pastabas rengiant šį straipsnį. Tyrimus finansavo Lietuvos valstybinis mokslo ir studijų fondas, dalyvaujantis COST E-28 veikloje.

Literatūra

Baliuckas V., Danusevičius J., Gabrilavičius R., Kanapickaitė A., Kundrotas V., Načajienė R., Plačiakis R., Pliūra A., Verbyla V. ir Statkus V. 1997. Mokslinės programos „Kultūrinių augalų resursai“ temos „Miško medžių genetiniai ištekliai“ 1994–1997 metų baigiamoji ataskaita.

Danusevičius J., Gabrilavičius R., Baliuckas V., Verbyla V. 1999. Lietuvos miško sėklinis rajonavimas: pušies, eglės, ąžuolo. 24–26.

Fahima T., Sun G. L., Baharav A., Krugman T., Beiles A. and Nevo E. 1999. RAPD polymorphism of wild emmer wheat populations, *Triticum dicoccoides*, in Israel. *Theor Appl Genet*, 98: 434–447.

Gabrilavičius R. ir Danusevičius D. 2003. Eglės genetiniai tyrimai ir selekcija Lietuvoje. Vilnius, 9–359.

Gallois A., Audtan J. C., Burrus M. 1998. Assessment of genetic relationships and population discrimination among *Fagus sylvatica* L. by RAPD. *Theor Appl Genet*, 97: 211–219.

Hwang S.-Y., Lin H.-W., Kuo Y.-S. and Lin T.-P. 2001. RAPD variation in relation to population differentiation of *Chamaecyparis formosensis* and *Chamaecyparis taiwanensis*. *Bot Bull Acad Sin*, 42: 173–179.

Yeh F. C., Chong D. K. X. And Yang R.-C. 1995. RAPD variation within and among Natural Populations of trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.) from Alberta. *Journal of Heredity*, 86: 69–75.

Kuusienė S., Abraitis R., Žvingila D., Gradeckas A., Abraitienė A., Staniulytė R., Skilandytė L., Jančiauskas J., Verbylaitė R. ir Mockeliūnaitė R. 2003. Teorinių ir metodinių pagrindų paruošimas miško medžių genetiniam polimorfizmo identifikavimui bei embriogeninio potencialo įvertinimui *in vitro*. 2002 metų ataskaita., LMI., 16–22.

Kuusiene S., Zvingila D., Gradeckas A., Mockeliunaite R., Verbylaite R., Staniulyte R. & Ozolinčius R. 2003. The application of *in vitro* and molecular genetics techniques for forest tree research in Lithuania. Proceedings of conference on tree biotechnology. June 7–12 2003, Umeå, Sweden.

Lietuvos miškų valstybinė apskaita. 2003. Kaunas.

Link W., Dixens C., Singh M., Schwall M., Melchinger A. E. 1995. Genetic diversity in European and Mediterranean faba bean germplasm revealed by RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.*, 90: 27–32.

Nkongolo K. K., Klimaszewska K. And Gratton W. S. 1998. DNA yields and optimization of RAPD patterns using spruce embryogenic lines, seedlings and needles. *Plant Molecular Biology Report*, 16: 1–9.

Ozolinčius R., Armolaitis K., Augustaitis A., Kairiūkštis L., Stakėnas V. ir Vaičys M. 1999. Monitoringas. Lietuvos miškų būklė ir ją sąlygojantys veiksniai. „Lututė“, Kaunas: 108–111.

Rodriguez J. M., Berke T., Engle L., Nienhuis J. 1999. Variation among and within *Capsicum* species revealed by RAPD markers. *Theor Appl Genet*, 99: 147–156.

Scheepers D., Eloy M.-C., Briquet M. 1997. Use of RAPD patterns for clone verification and in studying provenance relationships in Norway spruce (*Picea abies*). 94: 480–485.

Thomas B. R., Macdonald S.E., Hicks M., Adams D. L., Hodgetts R. B. 1999. Effects of reforestation methods on genetic diversity of lodgepole pine: an assessment using microsatellite and randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theor Appl Genet*, 98: 793–801.

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. *Comput. Applic. Biosci.*, 10: 569–570.

Volis S., Yakubov B., Shulgina I., Ward D., Zur V. and Mendlinger S. 2001. Tests for adaptive RAPD variation in population genetic structure of wild barley, *Hordeum spontaneum* Koch. *Biological Journal of the Linnean Society*, 74: 289–303.

Weising K., Nybom H., Wolff K. and Meyer W. 1995. DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press, 24–35.

Williams G. K., Kubelik A. R., Livak J., Rafalski J. A., Tingey S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531–6535.

Žvingila D., Verbylaitė R., Abraitis R., Kuusienė S. ir Ozolinčius R. 2002. Assessment of genetic diversity in plus tree clones of *Pinus sylvestris* L. using RAPD markers. *Baltic forestry*, 8 (2): 2–7.