

VILNIAUS UNIVERSITETAS

DONATAS ŽVINGILA

**DNR ŽYMENŲ PANAUDOJIMAS AUGALŲ GENOMINIAMS IR
BIOĮVAIROVĖS TYRIMAMS**

Habilitacijos procedūrai teikiamų mokslo darbų apžvalga
Biomedicinos mokslai, biologija (01B)

Vilnius, 2009

TURINYS

Įvadas	3
1. Augalų bioįvairovės tyrimai	5
1.1. Genetinių resursų tvarkymas ir kolekcijų genotipavimas	5
1.1.1. <i>Paprastosios avietės ir melsvauogio sausmedžio kolekcijų tyrimas</i>	6
1.1.2. <i>Miežių mutantų kolekcijos tyrimai</i>	10
1.1.3. <i>Miežių (<i>Hordeum vulgare</i> L.) veislių genetinės įvairovės įvertinimas</i>	13
1.1.4. <i>Rinktinių miško medžių klonų tyrimai RAPD metodu</i>	15
1.2. DNR žymenų panaudojimas ekologiniams ir populiaciniams tyrimams	17
1.2.1. <i>Populiacijų genetinės įvairovės ir diferenciacijos tyrimai</i>	17
1.2.2. <i>Paprastosios avietės <i>Rubus idaeus</i> L. RAPD polimorfizmo priklausomybė nuo radimvietės edafinių savybių</i>	28
1.2.3. <i>DNR žymenų panaudojimas pupų chlorofilinių morfozių tyrimams</i>	30
2.1. DNR žymenų panaudojimas atsako į stresą genų klonavimui	32
2.2. Javų genominiai tyrimai	34
2.3. Miežių <i>HVKNOX3</i> geno polimorfizmo tyrimas	34
Habilitacijos procedūrai teikiamų mokslinių straipsnių sąrašas	39
Literatūros sąrašas	41

Ivadas

DNR žymenys yra polimorfinės DNR sekos (polimorfinių DNR lokusų aleliai), lokalizuotos tam tikrose genomo vietose ir nustatomos naudojant įvairius molekulinės biologijos metodus. Jais nustatomi dviejų ar daugiau individų ląstelėse esančios genetinės informacijos skirtumai. DNR žymenys paveldimi iš kartos į kartą pagal tuos pačius Mendelio dėsnius kaip ir kiti genetiniai žymenys. Įvairių DNR žymenų sistemų atsiradimas per paskutiniuosius tris dešimtmečius yra glaudžiai susijęs su molekulinės biologijos ir biochemijos pažanga. Vis dėlto galima teigti, kad požymio, kaip žymens, naudojimo idėja turi gilesnes šaknis. Aštuonioliktame amžiuje K. Linėjus (C. Linnaeus), kurdamas sistematikos pagrindus, panaudojo augalų lytinių organų skaičiaus ir išsidėstymo dėsningumus. G. Mendelis (G. Mendel), tirdamas morfologinių žymenų paveldėjimą, nustatė svarbiausius paveldimumo dėsningumus. Tačiau konkrečiai apie genetinius žymenis ir jų panaudojimą prabilta tik XX a. pradžioje (Sax, 1923). Morfologiniai žymenys naudojami ir šiandien, bet dėl įvairių trūkumų jų panaudojimas labai ribotas (Semagn et al., 2006; Schulman, 2007). Morfologiniai žymenys yra negausūs, maža jų įvairovė, juos stipriai veikia aplinkos sąlygos, kai kurie iš jų mažina organizmo gyvybingumą, priklauso nuo raidos stadijos ir t.t. Daug patogesni už morfologinius, vėliau nustatyti ir pradėti naudoti genetinėje analizėje – biocheminiai žymenys, pagrįsti baltymų, dažniausiai izofermentų arba atsarginių baltymų, polimorfizmu (Markert & Moller, 1959) bei molekuliniai (DNR) žymenys (Botstein et al., 1980; Williams et al., 1990; Jordan & Humphries, 1994; Vos et al., 1995; Jaccoud et al., 2001 ir t. t.). Izofermentų, kaip žymenų trūkumai (ribotas fermentinių sistemų skaičius, jautrumas aplinkos poveikiams ir kt.) išryškėjo jau gana seniai (Tanksley, 1983). Taigi, DNR žymenys buvo ir išlieka patogiausias bei prieinamiausias genomų tyrimo būdas. DNR žymenų įvairovė lemia neribotas jų panaudojimo galimybes tiek kiekybiniu, tiek vietos genome atžvilgiu. Vis dėlto pasirenkant vieną ar kitą žymenų sistemą, būtina atsižvelgti į jų nustatymo principus ir savybes. Įvairius DNR žymenis galima grupuoti pagal tris svarbiausius principus: 1) paveldėjimo pobūdį (biparentalinis branduolinis, motininis branduolinis, motininis nebranduolinis, tėvinis nebranduolinis); 2) pasireiškimo pobūdį (dominuojantis ar kodominuojantis); 3) nustatymo metodą (nukleorūgščių hibridizacija ar PGR).

DNR žymenų tyrimai, prasidėję prieš tris dešimtmečius vis dažniau naudojami sprendžiant teorines ir praktines biologijos, ekologijos, medicinos, kriminalistikos ir kt. problemas. Kaip ir biocheminiai žymenys, DNR žymenys pirmiausia pradėti naudoti žmogaus genetiniams tyrimams (Botstein et al., 1980). Po keleto metų jie pradėti taikyti

ir augalams (Helentjaris et al., 1986). Šiuo metu žinoma apie keturiasdešimt DNR žymenų tipų, iš kurių vieni gana panašūs, o kiti labai skiriasi. Labai skiriasi ir jų praktinio pritaikymo galimybės. Kasmet sukuriamos naujos technologijos, kurios keičia senąsias, todėl vienus DNR žymenų nustatymo metodus keičia kiti. Ypač populiarūs tie metodai, kuriuose PGR naudojami nespecifiniai pradmenys. Nespecifinių pradmenų pagalba galima tirti rūšis, apie kurių genomą turima labai mažai duomenų. Tai tinka daugeliui augalų rūšių. Iki šiol dažniausiai naudojamas šio tipo metodas, yra RAPD (angl., *Random Amplified Polymorphic DNA*), sukurtas 1990 m. (Williams et al., 1990). RAPD žymenys nepriklauso nuo aplinkos, organizmo raidos stadijos, pasižymi dideliu polimorfiškumu ir yra santykinai nebrangūs. Siekiant patobulinti RAPD metodą, jis buvo įvairiai modifikuojamas. Vienas iš tokių modifikuotų metodų – RAMP (angl., *Random Amplified Microsatellite Polymorphism*) – leidžia tirti labai kintamus mikrosatelitų lokusus (Ziętkiewicz et al., 1994). Kai kurie žymenys gaunami veikiančių genų pagrindu, todėl juos galima tiesiogiai taikyti genams klonuoti ir genų raiškai tirti. Vieni iš tokių – EST (angl., *Expressed Sequence Tags*), gaunamų nustačius cDNR seką, kuri susintetinama atvirkštinės transkripcijos nuo tam tikro geno mRNR būdu (Adams et al., 1991).

Darbo tikslai ir naujumas. Bendradarbiaujant su Biotechnologijos institutu, VU Botanikos ir genetikos katedroje 1994 m. pradėti augalų tyrimai naudojant DNR žymenis (Žvingila & Popendikytė, 1994). Šie darbai toliau sėkmingai tęsiami bendradarbiaujant su įvairiomis Lietuvos ir užsienio mokslininkų grupėmis. 1994 – 2008 metais, naudodami įvairius DNR žymenis kaip molekulinis instrumentus, įvertinome genetinę įvairovės lygį pagrindinėse miežių veislėse, sukurtose Baltijos šalyse ir Baltarusijoje, pritaikėme DNR žymenų nustatymo metodus *Rubus idaeus*, *Lonicera ceruleae* genetinėse kolekcijose esančių pavyzdžių genotipavimui bei miško medžių (*Pinus sylvestris*, *Piceae abies*) rinktinių medžių klonų tapatumo nustatymui; naudodami EST žymenis klonavome ir ištyrėme du genus, dalyvaujančius *Solanum tuberosum* atsake į biotinę (*Erwinia carotovora* infekcija) ir abiotinę stresą. Naudodami RAPD metodą ištyrėme *Saxifraga hirculus*, *Piceae abies*, *Fraxinus excelsior*, *Taxus boccata*, *Rubus idaeus*, *Pinus sylvestris* populiacijų genetinę struktūrą, diferenciacijos lygį, kai kurių ekologinių veiksnių įtaką genetinę įvairovės pasiskirstymui populiacijose.

Genetinę įvairovės nustatymas ir tyrimas naudojant DNR žymenis gali padėti suprasti daugelio biologinių reiškinių, vykstančių augaluose (ląstelės, organizmo, rūšies lygmenyje), prigimtį. Vykdydami aptariamus tyrimus norime rasti atsakymą į pagrindinį klausimą: kokios naudotų DNR žymenų galimybės kai kurioms augalų biologijos

problemoms (genetinių išteklių išsaugojimo, adaptyvumo, populiacijų diferenciacijos, biotinio ir abiotinio streso ir kt.) spręsti?

Pagrindinės mūsų tyrimų kryptys buvo šios:

- augalų bioįvairovės tyrimai:

genetinių resursų tvarkymas ir kolekcijų genotipavimas;

ekologiniai ir populiacijų genetikos tyrimai:

-augalų genominiai tyrimai.

1. Augalų bioįvairovės tyrimai

1.1. Genetinių resursų tvarkymas ir kolekcijų genotipavimas

Augalų genetiniai resursai vieni iš labiausiai pažeidžiamų ir neatsinaujinančių gamtinių išteklių. Dėl to nenuostabu, kad jau keletą dešimtmečių visame pasaulyje stengiamasi surinkti augalų pavyzdžius ir juos išsaugoti kolekcijose bei genų bankuose ateities kartoms. Svarbus momentas šiame darbe buvo 1996 metais įvykusi tarptautinė Augalų genetinių resursų techninė konferencija, kurioje 150 pasaulio valstybių įsipareigojo saugoti augalų genetinius išteklius apgalvotai naudojant juos maisto gamyboje ir žemės ūkyje (FAO 1996). DNR žymenys yra labai svarbi priemonė visuose genetinių išteklių naudojimo ir saugojimo etapuose. Šis darbas remiasi trimis principais (Westman & Kresovich 1997): 1) DNR žymenys padeda atsakyti į klausimą, ar du lyginami pavyzdžiai yra genetiškai tapatūs, ar skirtingi. Tai susiję su veislių autorių teisių apsauga ir leidžia nuspręsti, ar siūlomas pavyzdys nedubliuoja jau esančių kolekcijoje; 2) DNR žymenys svarbūs kontroliuojant genetinės įvairovės lygį kolekcijoje, užtikrinant tam tikrų alelių, ypač susijusių su ekonomiškai svarbiais požymiais, išlikimą saugojimo metu bei periodiškai kolekcijas atnaujinant; 3) nustatant genetinę įvairovę *per se* individų, populiacijų ir rūšių lygmenyje. Tai ypač svarbu kuriant konservavimo *in situ* ir *ex situ* programas, bazines (angl., *core*) kolekcijas. Įvairius DNR žymenis naudojome VU Botanikos sode esančių paprastosios avietės (*Rubus idaeus* L.), melsvauogio sausmedžio (*Lonicera caerulea* L.) ir miežių (*Hordeum vulgare* L.) mutantų kolekcijų genetinei įvairovei įvertinti ir pavyzdžiams genotipuoti (Žvingila & Popendikytė, 2001; Rančelis et al., 2001; Patamsytė et al., 2004; Žvingila ir kt., 2004; Naugžemys et al., 2007; Patamsytė et al., 2008). Taip pat, dalyvaudami COST E28 „Genosilva“ veikloje, kartu su kolegomis iš Lietuvos miškų instituto vykdėme paprastosios pušies (*Pinus sylvestris* L.) ir paprastosios eglės (*Picea abies* (L.) Karst.) rinktinių medžių klonų iš kloninių archyvų, esančių Šlienavoje ir Dubravos eksperimentinėje – mokomojoje miškų urėdijoje, genotipavimo darbus (Žvingila et al., 2002; Staniulytė ir kt., 2004).

1.1.1. Paprastosios avietės ir melsvauogio sausmedžio kolekcijų tyrimas

Natūraliai gamtoje paplitę rūšys, kurios giminiškos kultūriniais augalams gali būti vertingų genų donorai, kuriant naujas augalų veisles. **Paprastoji avietė** (*R. idaeus* L.) priklauso erškėtinių (Rosaceae) šeimai, *Rubus* genčiai, *Idaeobatus* pogentei. Kadangi šiuolaikinėse aviečių veislėse genetinė įvairovė daug mažesnė, palyginti su laukinėmis rūšimis, tai paprastoji avietė gali būti potencialus vertingų genų šaltinis naujoms veislėms (Graham & McNicol, 1995; Badjakov et al., 2006). Genetinės įvairovės sumažėjimą paprastai nulemia domestikacijos procesas, nes selekcininkai dirba tik su ribotu genotipų ir genetinių žymenų skaičiumi. Todėl kultūriniai augalai pasižymi mažesne genetinė įvairove nei jų laukiniai giminaičiai (Ladizinsky, 1985). Siekiant išsaugoti Lietuvoje paplitusios laukinės avietės genetinius išteklius, 2001 m. VU Botanikos sode pradėta auginti paprastosios avietės pavyzdžių, surinktų iš daugelio Lietuvos vietų, kolekcija (Balčiūnienė et al., 2004). Norint racionaliai tvarkyti sukauptą avietės genetinę medžiagą, reikėjo įvertinti genetinės įvairovės lygį joje, pavyzdžių divergencijos laipsnį, surasti molekulinis žymenis, leidžiančius identifikuoti kolekcijos pavyzdžius. Vykdydami šį darbą, genotipavome 49-is kolekcijos pavyzdžius, ištyrėme jų morfologinę ir genetinę įvairovę (Patamsytė et al., 2008). Šių pavyzdžių genotipavimui naudojome šešis oligonukleotidinius pradmenis (1 lentelė). Šie pradmenys buvo pasirinkti po preliminarios jų atrankos, atliktos tiriant 20 avietės pavyzdžių (Patamsytė et al., 2004).

1 lentelė. *Rubus idaeus* L. RAPD juostų ir fenotipų skaičius nustatytas naudojant šešis oligonukleotidinius pradmenis

Pradmenis pavadinimas	Nustatytų RAPD juostų skaičius	Polimorfinių RAPD juostų skaičius	RAPD fenotipų skaičius	Polimorfizmas, %	RAPD juostų dydis (bp)
A3	10	8	22	80	450-1800
MP4	9	8	38	89	550-2500
Roth 270-6	14	9	30	64	500-2900
Roth 380-3	12	9	28	75	390-2100
Roth 470-8	11	8	36	73	440-3100
Roth 470-9	7	6	20	86	750-2000
Iš viso	63	48			
Vidutiniškai	10,5	8	20,6	77,83	

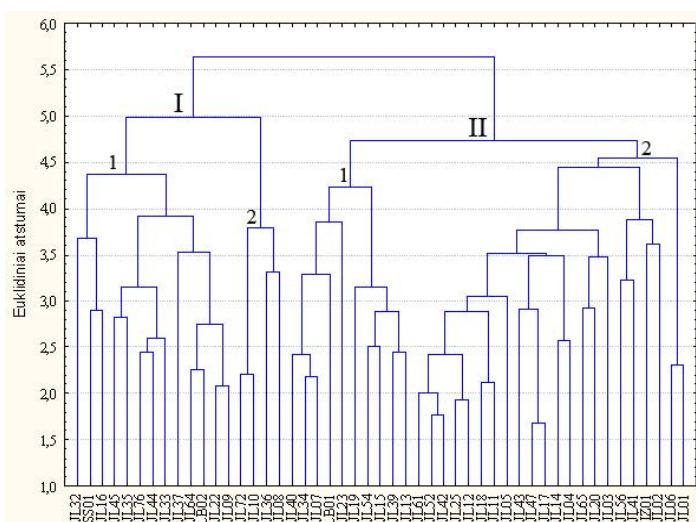
Naudojant šiuos šešis oligonukleotidinius pradmenis, buvo nustatyti 48 polimorfiniai RAPD lokusai. DNR polimorfizmo lygis buvo gana aukštas ir sudarė 78%. Parenkant pradmenis individų genotipavimui, svarbu nustatyti informatyviausių pradmenų derinius, su kuriais būtų galima identifikuoti kiek įmanoma didesnę kolekcinių pavyzdžių skaičių.

Kaip parodė individuali RAPD fenotipų, gautų naudojant pavienius pradmenis, analizė, nė vienas iš šešių pradmenų netiko visiems tirtiems individams genotipuoti (1 lentelė). Geriausi rezultatai buvo gauti su pradmenimis MP4 ir Roth 470-8, kuriais galima nustatyti atitinkamai 38 ir 36 RAPD fenotipus. Išanalizavus įvairius galimus gautų RAPD fenotipų derinius, nustatyti keturi skirtingų pradmenų poravimo deriniai, su kuriais nustatomų RAPD juostų skaičius yra pakankamas 49-iems kolekciniais pavyzdžiams identifikuoti (2 lentelė).

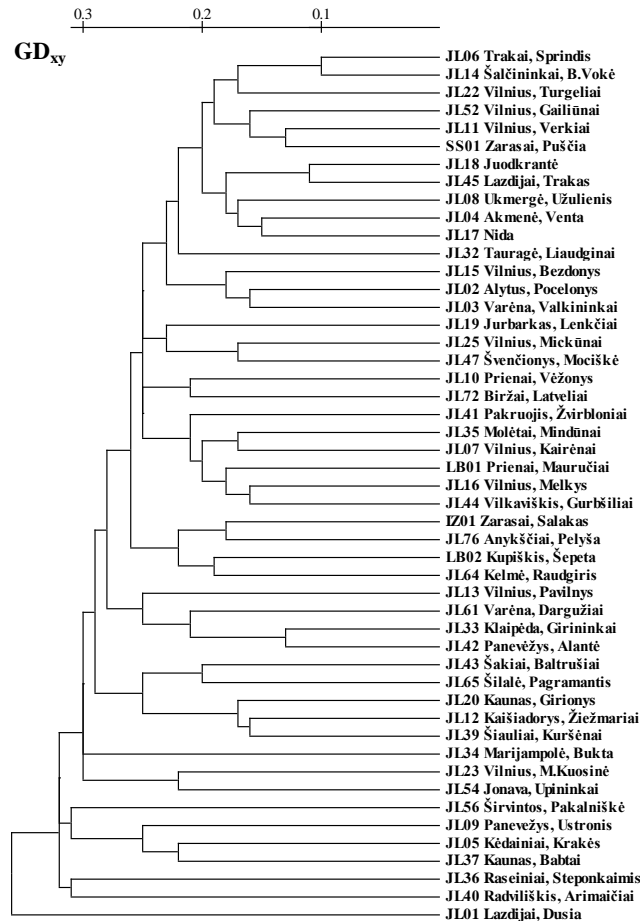
2 lentelė. Oligonukleotidiniai pradmenys ir jais nustatomų RAPD fenotipų skaičius

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

Kartu su DNR polimorfizmo tyrimais buvo vertinama ir morfologinė įvairovė. Pastaroji įvertinta pagal 13 kiekybinių požymių. Pagal šiuos morfologinius ir molekulinis žymenis buvo sudarytos euklidinių ir genetinių atstumų tarp tirtų individų lentelės bei nubraižyti individų giminiškumo medžiai (1 ir 2 pav.). Genetiniai atstumai buvo apskaičiuoti trimis būdais: 1) pagal Nei ir Li, 2) pagal Link, 3) paprasto suderinimo būdu (angl. *simple matching*). Nustatyta stipri koreliacija ($r \geq 0,95$; visais atvejais $p=0,001$) tarp visais trimis būdais apskaičiuotų genetinių atstumų. Palyginę morfologinius euklidinius atstumus su genetiniais, koreliacijos tarp jų nenustatėme ($r = 0,073$; $p = 0,012$).



1 pav. Giminiškumo medis, sudarytas UPGMA (angl. *Unweighted Pair - Group Method of arithmetic Averages*) metodu naudojant euklidinius atstumus, apskaičiuotus pagal morfologinius skirtumus tarp paprastosios avietės individų

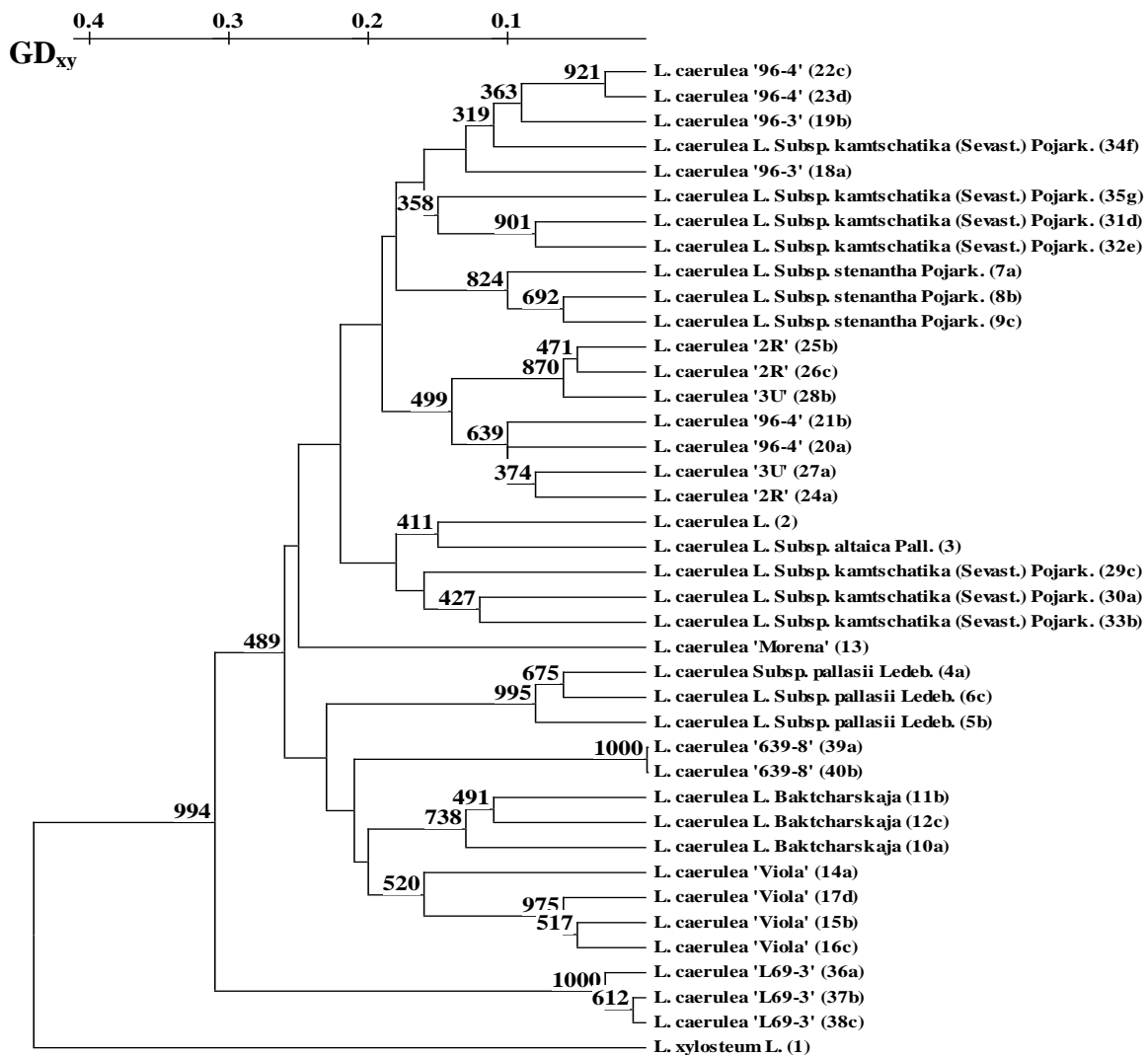


2 pav. Paprastosios avietės (*Rubus idaeus* L.) kolekcijos 49-ių pavyzdžių giminiškumo medis, sudarytas UPGMA metodu panaudojant Nei ir Li genetinių atstumų pagal polimorfinius RAPD lokusus matricą. Skalėje pateikti Nei ir Li (1979) genetiniai atstumai

Gauti rezultatai rodo, kad norint įvertinti paprastosios avietės tinkamumą selekcijoje reikia naudoti tiek morfologinius, tiek DNR žymenis. Kadangi tirti pavyzdžiai buvo iš įvairių Lietuvos vietų, nutolusių viena nuo kitos nevienodu atstumu, buvo įdomu įvertinti genetinių atstumų, apskaičiuotų pagal RAPD lokusų pasiskirstymą atskirų individų genomuose, priklausomybę nuo geografinių euklidinių atstumų. Atlikti skaičiavimai parodė, kad tarp šių dviejų parametru yra labai nedidelė patikima koreliacija ($r = 0,124$; $p = 0,001$). Šiame darbe nustatyti tirtų pavyzdžių RAPD fenotipai gali būti naudojami konkrečiam individui ar jo klonui identifikuoti, o ištirti paprastosios avietės kiekybiniai morfologiniai požymiai, šiuo požiūriu, yra daug mažiau informatyvūs, nes juos veikia aplinka ir jie labai priklauso nuo augalo ontogenezės stadijos (Patamsytė et al., 2008).

Melsvauogis sausmedis (*Lonicera caerulea* L.) priklauso sausmedinių (*Caprifoliaceae* Juss.) šeimai, *Isika* Rehd. sekcijai, *Caeruleae* Rehd. posekcijai. Ši rūšis vertinama dėl labai anksti subręstančių vertingos cheminės sudėties uogų. Dėl uogų sausmedį gana plačiai auginama Rusijoje, Kinijoje ir Japonijoje (Plekhanova, 2000; Chaovanalikit et al., 2004). Vilniaus universiteto Botanikos sodo kolekcijoje šiuo metu yra saugomi

pavyzdžiai, priklausantys keturiems melsvauogio sausmedžio porūšiams, 28 veislės ir 35 genetinės linijos (Žilinskaitė et al., 2007). Siekdami efektyvesnio šios genetinės medžiagos panaudojimo selekciniam ir tiriamajame darbe, mes atlikome 39-ių melsvauogio sausmedžio pavyzdžių genotipavimą RAPD metodu (Naugžemys et al., 2007). Prieš genotipavimą visi tirti pavyzdžiai buvo aprašyti pagal pagrindinius morfologinius ir fenologinius požymius. RAPD analizės metu buvo atrinkti 105 DNR fragmentai, iš kurių 83,9% buvo polimorfiški. Panaudojus RAPD žymenis, buvo genotipuoti visi tirti sausmedžio pavyzdžiai, išskyrus du (3 pav.). Pastarieji tikriausiai yra to paties genotipo klonai.



3 pav. Melsvauogio sausmedžio (*Lonicera caerulea* L.) kolekcijos 39-ių pavyzdžių genetinės įvairovės UPGMA dendrograma, gauta naudojant Nei ir Li (1979) genetinių atstumų (GD_{xy}) lentelę, sudarytą molekulinį RAPD duomenų pagrindu. Įkėlų (angl., *bootstrap*) reikšmės, pavaizduotos ant medžio šakų, gautos naudojant 1000 pakartojimų

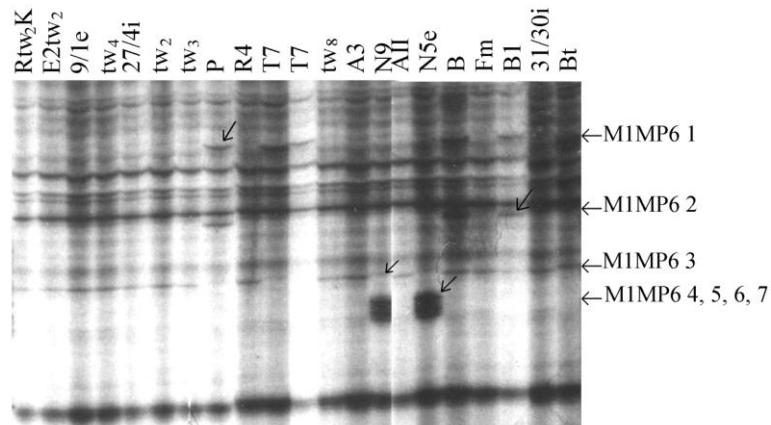
Nustatytas genetinis atstumas tarp tirtų *L. caerulea* pavyzdžių svyravo nuo 0,0 iki 0,366. UPGMA dendrogramoje visi sausmedžių pavyzdžiai susiskirstė į tris grupes. Paprastojo sausmedžio (*L. xylosteum* L.) pavyzdys akivaizdžiai skyrėsi nuo melsvauogio sausmedžio pavyzdžių (3 pav.). Mūsų nustatyti RAPD žymenys gana gerai atspindėjo tirtų pavyzdžių genetinį savitumą, tačiau porūšių lygmenyje toks savitumas buvo nustatytas tik porūšiui *L. caerulea* L. subsp. *pallasii* Ledeb. Gauti rezultatai rodo, kad RAPD metodu galima efektyviai genotipuoti melsvauogio sausmedžio kolekcijos pavyzdžius, nes juose DNR polimorfizmas žymiai viršija morfologinę įvairovę.

1.1.2. Miežių mutantų kolekcijos tyrimai

Jau seniai mutantų tyrimai yra svarbūs javų produktyvumui gerinti. Per paskutiniuosius 70 metų, panaudojus tiesioginius mutantus arba jų palikuonis, sukurta daugiau nei 2250 veislių (Ahloowalia et al., 2004). Didelio derlingumo kviečių veislės buvo sukurtos gavus šių augalų morfologinius žemaūgius mutantus. Tokių žemaūgių, neišgulančių ir produktyvių javų mutantų, galinčių įsisavinti didelį azoto kiekį, naudojimas buvo labai svarbus „žaliajai revoliucijai“ (Harlan, 1992). Taigi mutantų kolekcijų analizė molekuliniais metodais svarbi tiek teoriškai, tiek praktiškai. Teoriškai – ji leidžia nustatyti genų, valdančių įvairius organizmo vystymosi etapus, savybes, o praktiškai – leidžia padidinti ir objektyviai įvertinti genetinę įvairovę, atrasti augalus, pasižyminčius naujomis savybėmis. Pastarasis požiūris svarbus selekcijai, ypač molekulinei selekcijai (Korzun, 2002).

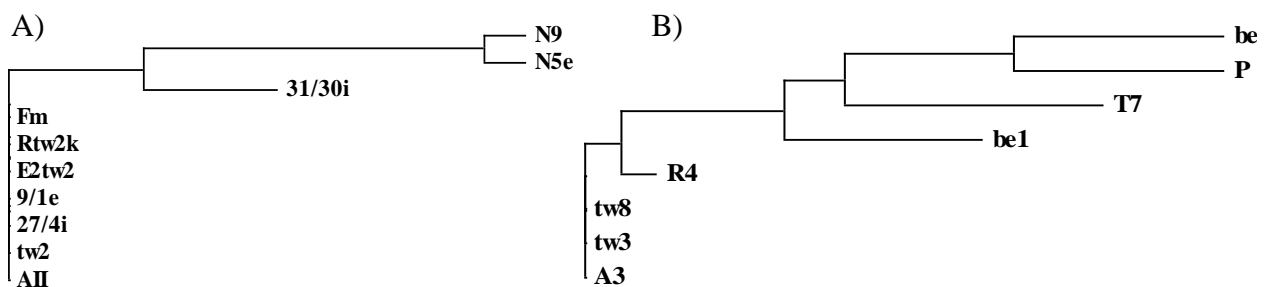
Originalioje VU Botanikos sodo miežių kolekcijoje yra daugiau nei 300 mutantų, genetinių linijų ir veislių pavyzdžių. Dauguma mutantų gauta iš miežių veislės 'Auksiniai II', todėl vertintini kaip izogeninės linijos (Rančelis, 2001), likusieji gauti iš veislės 'Auksiniai 3'. Ši kolekcija yra vertingas miežių genetinės įvairovės šaltinis, kurį būtina visapusiškai genetiškai ištirti. Kolekcijos homeozinių miežių mutantų pavyzdžiuose pakitusi žiedo ir/arba žiedyno raida, o kai kurie mutantai pasižymi genetiniu nestabilumu (Rančelis, 1993; Rančelis & Vaitkūnienė, 1998). Šios kolekcijos pavyzdžiai, juos visapusiškai ištyrus, gali būti medžiaga naujoms veislėms kurti. RAMP metodu buvo iširta šešiolika dvejopos kilmės miežių mutantų (Balčiūnienė et al., 2000; Rančelis et al., 2001). Devyni mutantai (*tw₂*, *N9*, *N5e*, *31/31i*, *Fm*, *Rtw2k*, *E2tw2*, *9/1e*, *27/4i*) gauti iš miežių veislės 'Auksiniai II', o septyni – iš veislės 'Auksiniai 3' (*be*, *tw₃*, *tw₈*, *P*, *T7*, *be1*, *R4*). Šios dvi veislės buvo sukurtos nepriklausomai viena nuo kitos ir nėra genetiškai artimos. Tyrimams panaudota keturiolika pradmenų derinių. Iš jų vienuolika buvo informatyvūs ir pagausino polimorfinius lokusus. Autoradiogramos

fragmentas, kuriame matomi kai kurie polimorfiniai lokusai, nustatyti naudojant pradmenų M1/MP6 derinį, pateiktas ketvirtame paveiksle. Iš viso nustatyti 65 polimorfiniai lokusai, kurie buvo panaudoti genetiniams atstumams tarp tiriamų individų įvertinti.



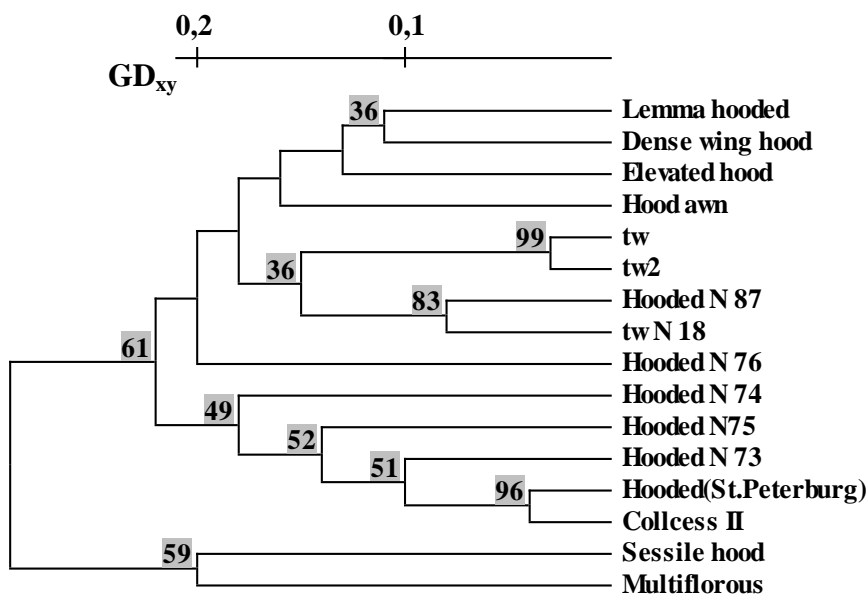
4 pav. Autoradiogramos, gautos RAMP metodu naudojant pradmenų M1/MP6 derinį, fragmentas. Polimorfiniai lokusai pažymėti rodyklėmis. Lokusų pavadinimai – paveikslo dešinėje, tirtų individų kodai – viršuje

Panaudojus gautus duomenis, buvo nubraižyti NJ (angl., *Neighbour – Joining*) giminingumo medžiai, kurie parodė, kad nustatytų polimorfinių lokusų skaičiaus nepakanka visiems tirtiems individams genotipuoti (5 pav.). Veislės 'Auksiniai II' grupėje tik trys mutantai (31/30i, N5e, N9) skyrėsi nuo likusių genotipų. Mutantai, gauti iš veislės 'Auksiniai 3', buvo labiau polimorfiški. Šioje grupėje pavyko genotipuoti penkis mutantus iš septynių. *tw3* ir *tw8* genetiškai nesiskyrė nuo pradinės veislės. Šie rezultatai patvirtina, kad tirtų mutantų atsiradimo priežastys yra skirtingos.



5 pav. Šešiolicos miežių mutantų ir dviejų miežių veislių 'Auksiniai II' bei 'Auksiniai 3' genotipavimo rezultatai, gauti naudojant RAMP žymenis. A – mutantų, gautų iš veislės 'Auksiniai II', giminiškumo medis; B – mutantų, gautų iš veislės 'Auksiniai 3', giminiškumo medis

Buvo tiriamas šešiolikos homeozinių miežių mutantų, kurių pakitusi žiedo morfologija, DNR polimorfizmas. Be trylikos skirtingos kilmės *Hooded* mutantų, gautų iš JAV ir Rusijos genų bankų, tyrime buvo naudojami ir trys originalūs *tw* tipo mutantai. Visi mutantai pasižymi varpos sandaros pokyčiais. *Hooded* (dar vadinami *Kap*) mutantuose ant akuoto arba jo vietoje susidaro papildomas žiedas. *tw* mutantuose žiedyno pokyčiai pasireiškia lodikulių transformacija į kuokelius arba/ir piesteles (Bieliūnienė et al., 2003; Vaitkūnienė et al., 2004). Mūsų tyrimo tikslas buvo nustatyti tiriamų mutantų genetinį giminingumą, į kurį reikia atsižvelgti analizuojant jų tarpusavio hibridus ir vertinant mutacijų tarpusavio sąveiką. Su dvylika atrinktų pradmenų buvo nustatyti 79 RAPD lokusai, iš kurių 72,15% buvo polimorfiniai. Toks didelis DNR polimorfizmo lygis rodo, kad nepaisant kai kurių žiedo morfologijos panašumų ištirti pavyzdžiai labai skiriasi genetiškai. Genetinis atstumas tarp tirtų individų buvo nuo 3,2 iki 36,5%. Išimtis – lietuviškos kilmės *tw* ir *tw*₂ mutantai, gauti iš tos pačios miežių veislės 'Aukšiniai II'. Jie giminiškumo medyje patikimai grupavosi kartu (6 pav.). *tw*N18 mutantas, kuris morfologiškai labai panašus į lietuviškus *tw* tipo mutantus, tačiau savo kilme (gautas iš JAV) su jais visai nesusijęs, visgi rodo tam tikrą genetinį panašumą su pastaraisiais.



6 pav. Šešiolikos miežių homeozinių žiedo mutantų genetinio giminingumo medis, sudarytas UPGMA metodu naudojant Nei ir Li (1979) genetinių atstumų reikšmes. Pilkame fone – statistinės įkėlų reikšmės (%)

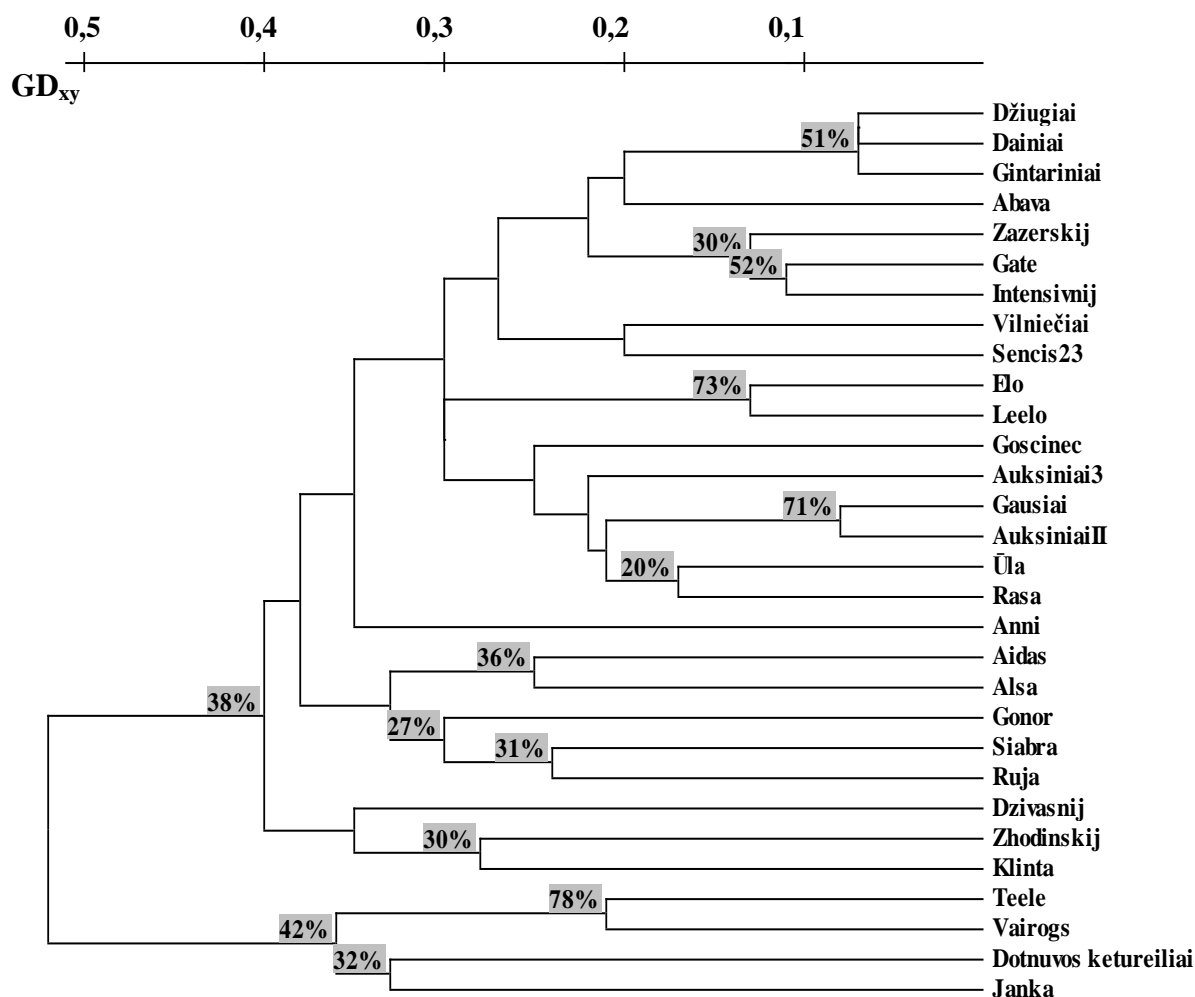
Labiausiai genetiškai nutolę yra mutantai *Sessile hood* ir *Hooded N76*. Gauti rezultatai rodo, kad *tw* mutantai yra unikalūs homeozinių mutantų pavyzdžiai, genetiškai mažai susiję su pavyzdžiais iš pasaulinių šio tipo mutantų kolekcijų.

1.1.3. Miežių (*Hordeum vulgare L.*) veislių genetinės įvairovės įvertinimas

Augalų selekcija pagrįsta efektyviu genetinės įvairovės panaudojimu. Genetinė įvairovė pasireiškia morfologiniais ir fenologiniais skirtumais, biocheminiu ir DNR polimorfizmu. Jos mažėjimas intensyvios žemdirbystės sąlygomis yra rimta problema (Asins & Carbonell, 1989). Dėl šios priežasties ateityje gali sumažėti javų ir kitų žemės ūkio kultūrų plastiškumas prisitaikant prie kintančių aplinkos sąlygų, naujų kenksmingų organizmų rasių atsiradimo bei žemdirbystės technologijų vystymosi. Aktualus ne tik egzistuojančios įvairovės išsaugojimo, bet ir jos didinimo klausimas, o taip pat objektyvus šio reiškinio įvertinimas šiuolaikiniais metodais. Pagrindinė problema, kuri iškyla atliekant tyrimus molekuliniam lygyje – nustatyti specifines sekas, lemiančias fenotipinius skirtumus arba glaudžiai susijusias su ūkiškai svarbiais lokusais.

Augalų selekcijos sėkmė labai priklauso nuo vidurūšinės įvairovės. Kai kurie autoriai yra išreiškę nuogąstavimus, kad šiuolaikinės javų veislės, tarp jų ir miežiai, stokoja genetinės įvairovės (Wilkes, 1983; Baum et al., 1997). Pagal užimamus pasėlių plotus Lietuvoje miežiai yra antras pagal svarbą (po kviečių) žemės ūkio augalas. Numatoma, kad mūsų šalyje ir ateityje (2010 m.) miežių plotai turėtų išlikti pastovūs. Jie turėtų sudaryti apie 300 tūkstančių hektarų, tai būtų apie 42% visų pasėlių ploto (http://www.zum.lt/min/failai/Augalininkystes_pletra.ppt).

Mus domino vietinių miežių veislių, sukurtų Lietuvoje (11 veislių) ir kaimyninėse šalyse (Latvijoje – 7 veislės, Baltarusijoje – 7, Estijoje – 5), genetinės įvairovės bei giminiškumo lygis (Žvingila & Popendikytė, 2000, 2001, 2002). Šios veislės yra svarbi medžiaga selekcijai, nes yra adaptuotos prie vietinių sąlygų. Patikrinę įvairius pradmenų, tinkamų mikrosatelitinių lokusų nustatymui, derinius, mes pasirinkome septynis, su kuriais 30-ties veislių genomine DNR nustatėme 60 RAMP žymenų. RAMP žymenų pasiskirstymas atskirų veislių individuose buvo vertinamas kaip RAMP fenotipas. Gautus veislių RAMP fenotipus panaudojome Nei ir Li (1979) genetiniams atstumams nustatyti. Naudojant genetinių atstumų tarp tirtų veislių matricą, UPGMA metodu buvo nubraižytas veislių giminingumo medis (7 pav.). Šioje dendrogramoje matyti keturios stambesnės veislių grupės (klasteriai). Viena estiška veislė 'Anni' nepateko nė į vieną iš šių klasterių. Dauguma lietuviškų miežių veislių ('Džiugiai', 'Dainiai', 'Gintariniai', 'Vilniečiai', 'Auksiniai II', 'Auksiniai 3', 'Gausiai' ir 'Ūla') pateko į pirmąją veislių grupę. Likusios trys lietuviškos veislės grupavosi atskirai: 'Aidas' ir 'Alsa' pateko į antrąjį, o 'Dotnuvos ketureiliai' – į trečiąjį klasterį.



7 pav. Baltijos šalyse ir Baltarusijoje sukurtų 30-ties miežių veislių UPGMA dendrograma, sudaryta naudojant Nei ir Li (1979) genetinių atstumų, apskaičiuotų pagal tirtų veislių RAMP fenotipus, lentelę. Pilkame fone – statistinės įkėlų reikšmės (%)

Išskyrus pirmąją veislių grupę, kurioje yra dauguma Lietuvoje sukurtų veislių, mūsų rezultatai neparodė kiek nors didesnio veislių grupavimosi pagal jų kilmės šalis ar regionus. Tai galima paaiškinti remiantis veislių genealoginiais duomenimis. Daugelis jų neseniai sukurtos naudojant ne vietinę, o tarptautinę selekcinę medžiagą.

Visos tirtos veislės genetiškai skyrėsi nevienodai. Genetiniai atstumai tarp jų buvo nuo 0,067 iki 0,714. Didžiausias genetinis atstumas (0,714) buvo nustatytas tarp estiškos veislės 'Teelė' ir Baltarusijoje sukurtos veislės 'Intensivnij'. Labiausiai tarpusavyje panašios buvo trys Lietuvoje sukurtos miežių veislės 'Džiugiai', 'Gintariniai' ir 'Dainiai'. Palyginus genealoginius duomenis, toks šių veislių panašumas buvo gana netikėtas. Kai kuriais kitais atvejais genetiniai ir genealoginiai duomenys gerai derėjo vieni su kitais. Pavyzdžiui, 'Gausiai' grupuojami su 'Auksiniais II', iš kurių jie gavo dalį savo genų. Genetinis atstumas tarp šių dviejų lietuviškų veislių sudarė tik 8%. Iš dendrogramos

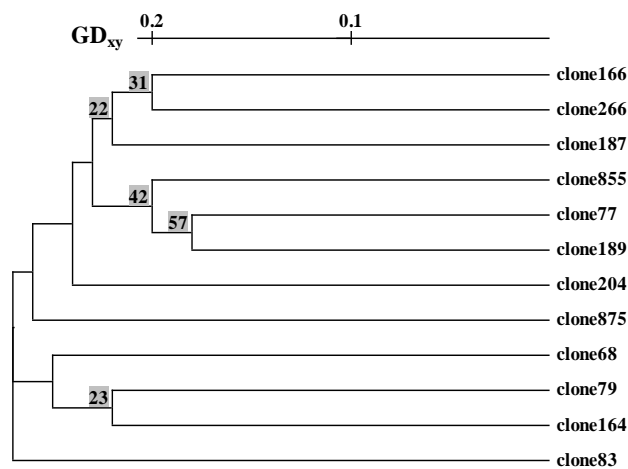
matyti, kad 'Leelo' veislė genetiškai artimiausia kitai Estijoje sukurtai veislei 'Elo' (GDxy = 0,119), iš kurios taip pat gavo dalį savo genetinės medžiagos. 'Gate' ir 'Intensivnij' tarpusavyje sieja veislė 'Nadja'. Tame pačiame klasteryje esančios veislės 'Vilniečiai' ir 'Gintariniai' buvo sukurtos naudojant veislę 'Pallas' (7 pav.). Palyginus genetinius ir genealoginius duomenis, kai kuriais atvejais buvo stebimas ir jų neatitikimas. Tokius neatitikimus paaiškinti visada gana sudėtinga, juos gali nulemti nepakankamai didelis nustatytų molekulinį žymenų skaičius, grūdų žymėjimo klaidos ir kt. priežastys. Tirtose lietuviškose veislėse buvo nustatyti 48 RAMP žymenys, o vidutinis genetinis atstumas sudarė 41%. Tarp latviškų veislių jis buvo 43,6%, tarp baltarusiškų – 40,8%, tarp estiškų – 53,7%. Davila ir kt. (1998), ištyrę 70 miežių veislių ir linijų RAMP metodu, nustatė 0,103 - 0,586 dydžio genetinį atstumą tarp vasarinių miežių veislių.

Kadangi naudojant septynis pradmenų derinius visoms tirtoms veislėms buvo nustatyti skirtingi RAMP fenotipai, tai šie molekuliniai žymenys gali būti naudojami minėtų veislių tapatumui nustatyti. Taip pat jie suteikia žinių apie minėtų veislių panašumus ir skirtumus. Ši informacija gali būti panaudota selekciniam darbe.

1.1.4. Rinktinių miško medžių klonų tyrimai RAPD metodu

Molekulinius žymenis naudojame ir sumedėjusių augalų klonų genotipavimui, kadangi tiek pasaulyje, tiek Lietuvoje yra aktualus miško medžių genetinių išteklių išsaugojimas ir jų racionalus panaudojimas. Miško medžių genetiniai ištekliai yra svarbūs miško selekcijoje, medžių plantacijų kokybei ir produktyvumui gerinti (Staniulytė ir kt., 2004). 1972 – 1997 m. sukurtas platus Lietuvos pagrindinių medžių rūšių genetinių išteklių išsaugojimo tyrimų ir naudojimo objektų tinklas, susidedantis iš genetinių draustinių, sėklinių plantacijų, pliusinių medžių, klonų archyvų ir kt. (Baliuckas ir kt., 1997). Pasaulyje molekuliniai žymenys pradėti naudoti ir miško medžių selekcijoje (Tammisola et al., 1992; Forrest et al., 2000). Lietuvoje paprastoji pušis ir paprastoji eglė – svarbiausios miško medžių rūšys, kurių miškai kartu sudėjus užima apie 60% viso miško ploto. Geriausi šios rūšies medžių pavyzdžiai yra kaupiami ir saugomi kaip klonai specialiose rinktinių medžių plantacijose, kloniniuose archyvuose. Tokių medžių subrandintos sėklos naudojamos įveisiant naujus arba atkuriant iškirstus miško plotus. Kadangi šių medžių genai išplatunami dideliuose plotuose, labai svarbu įvertinti tokių klonų tapatumą ir genetinę įvairovės lygį. Sumažėjusi genetinė įvairovė gali sumažinti rūšies sugebėjimą prisitaikyti prie kintamų aplinkos sąlygų, gali nulemti jos jautrumą kenkėjams ir kt. Nors **paprastosios pušies** (*Pinus sylvestris* L., Pinaceae) klonų

genetinės įvairovės tyrimai Lietuvoje buvo atliekami ir anksčiau (Baliuckas & Danusevičius, 1994; Gabrilavičius, 1995), tačiau iki šiol tai nebuvo tirta DNR lygmenyje. Mes tyrėme genetinės įvairovės lygį 12-oje paprastosios pušies rinktinių medžių klonų, kilusių iš įvairių Lietuvos vietų (Žvingila et al., 2002). Naudojant 25 oligonukleotidinius pradmenis, buvo nustatytas 78,2% DNR polimorfizmo lygis. Vidutinis genetinis atstumas tarp genotipų buvo 0,252. Tai rodo, kad tirti pavyzdžiai pasižymi didele genetine įvairove. Kad tirtieji klonai labai skiriasi pagal RAPD žymenų pasiskirstymą, rodo ir dendrograma, iš kurios matyti, kad genetiniai atstumai tarp individų yra gana dideli (8 pav.) Mes nustatėme penkis oligonukleotidinius pradmenis, kurių kiekvienas gali identifikuoti visus dvylika rinktinių medžių.



8 pav. UPGMA dendrograma, kuri rodo tirtų paprastosios pušies (*Pinus sylvestris* L.) rinktinių medžių klonų genetinės divergencijos laipsnį

Panašus tyrimas buvo atliktas ir **paprastosios eglės** (*Picea abies* (L.) Karst., Pinaceae) kloniniame archyve, esančiame Dubravos eksperimentinėje–mokomojoje miškų urėdijoje (Staniulytė ir kt., 2004). Buvo ištirti 23 eglės klonai, kilę iš įvairių Lietuvos vietų. Šiame darbe buvo nustatyti 299 RAPD lokusai, iš kurių 243 buvo polimorfiniai. Genetinis atstumas tarp tirtų pavyzdžių svyravo nuo 0,291 iki 0,5. Šiame darbe RAPD žymenys buvo panaudoti ne tik klonų genotipavimui, bet ir jų tapatumo nustatymui. Nustačius trijų klonų rametų (kiekvieno klonu po penkias rametas) RAPD fenotipus paaiškėjo, kad kai kurios rametos tarpusavyje skiriasi. Tai, manoma, nulėmė klonų sodinimo ir žymėjimo klaidos. Taip pat buvo sudaryta minėtų 23 klonų RAPD fenotipų biblioteka, kurią galima panaudoti klonų ir jų palikuonių tapatumui įvertinti, auginamosios medžiagos genetinio savitumo kontrolei miškų ūkyje atlikti.

1.2. DNR žymenų panaudojimas ekologiniams ir populiaciniams tyrimams

1.2.1. Populiacijų genetinės įvairovės ir diferenciacijos tyrimai

Genetinė įvairovė reikalinga populiacijoms prisitaikyti prie kintančių aplinkos sąlygų. Nykstančiose rūšyse ji dažnai yra sumažėjusi, dėl to, keičiantis klimatui, rūšys gali nesugebėti adaptuotis ir tai gali sumažinti jų evoliucinį potencialą (Hamrick & Godt, 1989). Genetinę įvairovę apibūdina šie pagrindiniai parametrai: polimorfizmo lygis, vidutinis heterozigotiškumas ir alelių įvairovė (Frankham et al., 2004). Biologus nuo seno domino retos bei endeminės rūšys. Tačiau XX a. pabaigoje šių rūšių tyrimas jau tapo būtinybe, kuri prieš mūsų akis iškyla kaip vis labiau nykstančios biologinės įvairovės išsaugojimo problema. Kadangi vis daugiau retų rūšių ištiriama genetiniais metodais, galima susidaryti išsamų genetinės įvairovės vaizdą jose ir suvokti kai kurių teorijų šiuo klausimu silpnąsias puses. Retų rūšių genetinėmis savybėmis susidomėta XX amžiaus 4-ame dešimtmetyje. 1936 m. Anderson, tyrinėdamas *Iris setosa* var. *Canadensis*, padarė išvadą, kad nedidelį rūšies paplitimą lemia „igimtas nekintamumas“. Nuo tada įsigalėjo bendras požiūris, kad retoms rūšims būdingas mažas genetinis kintamumas (Gitzendanner & Soltis, 2000). Vienas pirmųjų šios teorijos teisingumu suabejojo Stebbins (1980). Nors iš pradžių jis irgi pritarė bendrai nuomonei, tačiau savo nuomonę pakeitė, kai susidomėjo dviem labai polimorfiškais retomis augalų rūšimis (*Sequoiadendron giganteum* ir *Eriogonum apricum*) bei keletu plačiai paplitusių, tačiau nedidele genetinė įvairove pasižyminčių, augalų rūšių. Vėliau atlikti alozimų tyrimai irgi patvirtino, jog teiginys apie tai, kad retos rūšys genetiškai homogeniškos, yra pernelyg griežtas (Ranker, 1994; Young & Brown, 1996). Populiacijų genetikos teorija mažą retų rūšių genetinę įvairovę sieja su genetiniais procesais (genų dreifu, mutacijų dažniu), vykstančiais mažose populiacijose. Kai kuriuose apžvalginiuose straipsniuose buvo analizuojama koreliacija tarp genetinės įvairovės ir geografinio paplitimo, dauginimosi būdo ir kitų rūšies ypatybių (Hamrick & Godt, 1989). Šie autoriai nustatė, kad endeminės rūšys pasižymi statistiškai patikimai mažesne vidupopuliacine genetinė įvairove nei plačiai paplitusios populiacijos. Šie duomenys buvo gauti apibendrinus alozimų polimorfizmo tyrimus. Tačiau kiti autoriai, kurie atliko skaičiavimus remdamiesi RAPD metodu gautais rezultatais, tokios tendencijos endeminėse rūšyse nepastebėjo (Nybom & Bartish, 2000). Gitzendanner ir Soltis (2000) nustatė, kad kai kurie genetinės įvairovės parametrai endeminių rūšių populiacijų viduje statistiškai patikimai mažesni nei plačiai paplitusiose giminiškose rūšyse. Retų augalų rūšių biologinė įvairovė domina ir Lietuvos mokslininkus. Prieš keletą metų Lietuvoje pradėti

pelkinės uolaskėlės (*Saxifraga hirculus* L., Saxifragaceae) populiacijų demografinės struktūros ir ekologinių veiksnių poveikio joms tyrimai (Meškauskaitė & Naujalis, 2006). *S. hirculus* – daugiametis, vegetatyviniu būdu ir sėklomis besidauginantis, kryžmadulkis augalas. Lietuvoje, kaip ir kitose Centrinės Europos šalyse, ji yra poledynmečio reliktas, kurio augimvietės dėl klimato šiltėjimo labai sumažėjo. Norint sukurti tinkamą nykstančios rūšies išsaugojimo strategiją, šią rūšį reikia ištirti ir genetiškai. Dėl to vienas pagrindinių uždavinių mūsų darbe yra genetinės įvairovės nustatymas bei jos pasiskirstymo tarp populiacijų ir populiacijų viduje tyrimai (Naužemys et al., 2007; Meškauskaitė et al., *in press*). Žinant rūšies genetinę struktūrą, nustatčius populiacijų diferenciacijos priežastis, galima geriau įvertinti jos evoliucinį potencialą bei numatyti būdus jo išsaugojimui ir gerinimui. Iš kitos pusės, reliktnių populiacijų egzistavimas skirtingomis klimatinėmis sąlygomis leidžia tirti populiacijų diferenciaciją ir ekotipų formavimąsi.

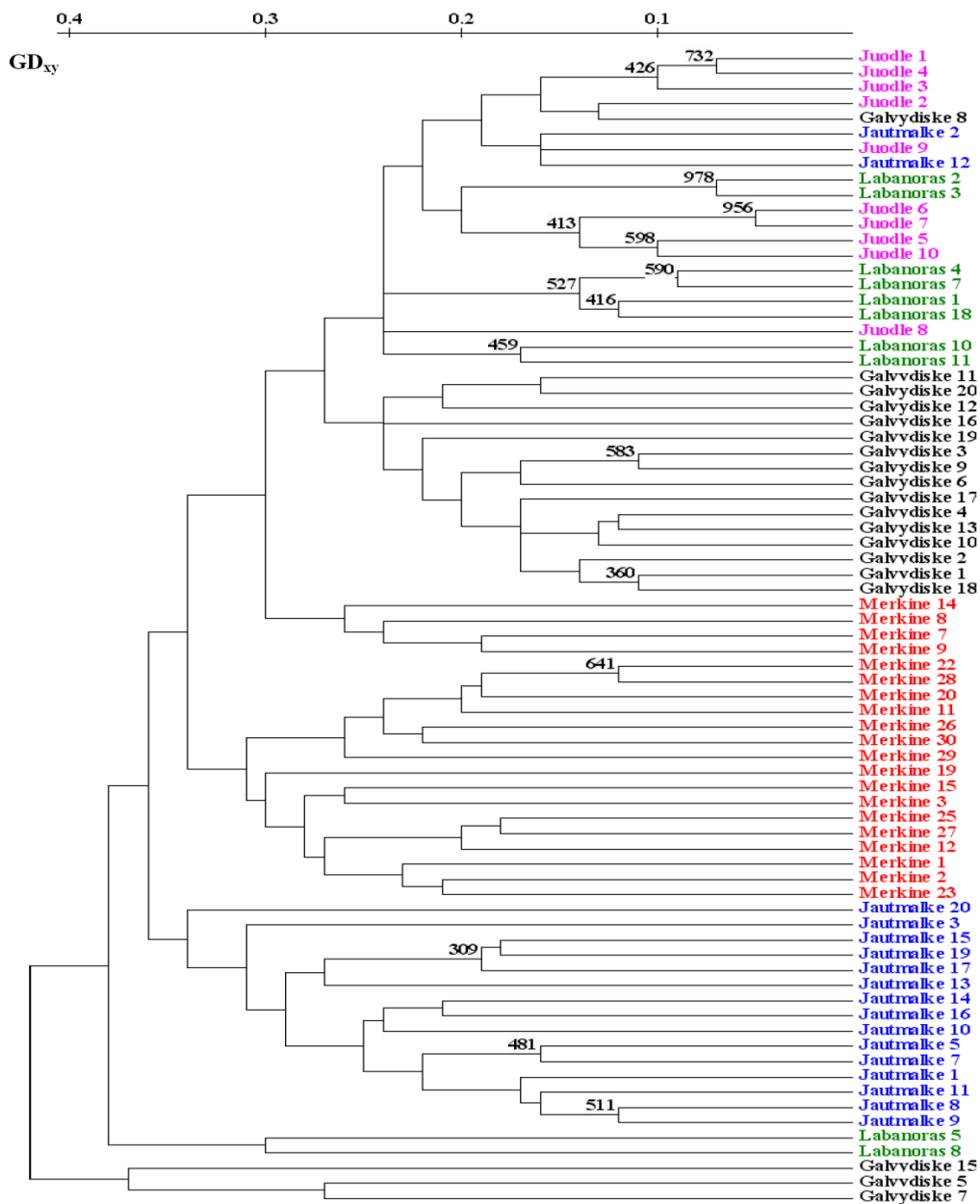
Kadangi Lietuvoje pelkinės uolaskėlės populiacijų genetinė struktūra iki šiol netirta, todėl, siekdami papildyti jau sukauptas botanines ir ekologines žinias apie šią rūšį naujais duomenimis, mes tyrėme genetinės įvairovės lygį penkiose *S. hirculus* populiacijose iš skirtingų ekoklimatinių rajonų. Pelkinės uolaskėlės DNR polimorfizmą tyrėme RAPD metodu naudodami devynis oligonukleotidinius pradmenis. Iš penkių *S. hirculus* L. populiacijų (3 lentelė) buvo surinkti 76 pavyzdžiai. Surinktų pavyzdžių skaičius priklausė nuo tirtos populiacijos dydžio.

3 lentelė. Pelkinės uolaskėlės (*Saxifraga hirculus* L.) populiacijos

Populiacijos pavadinimas	Populiacijos dydis m ²	Tirtas pavyzdžių skaičius	Šiaurės platumas	Rytų ilguma	Minimalių temperatūrų zona
Labanoras	200	10	55°15'20"	25° 44'45"	4
Merkinė	900	20	54° 11'07"	24° 08'41"	5
Galvydiškė	500	19	55° 47'01"	22° 58'16"	6
Jautmalkė	600	17	55° 47'49"	23° 01'16"	6
Juodlė	200	10	55° 48'44"	22°55'39"	6

Atlikę RAPD analizę nustatėme 93 RAPD lokusus. Tyrimams pasirinktų RAPD juostų dydis svyravo nuo 470 bp iki 2400 bp. Monomorfinius lokusus aptikome su visais pradmenimis. Monomorfinių lokusų skaičius naudojant įvairius pradmenis svyravo nuo 50% iki 18,2%. Kai kuriose populiacijose (Merkinės, Juodlės) nustatyti saviti RAPD lokusai. Tačiau jų dažnis tarp populiacijų individų neviršijo 5%, todėl šie lokusai buvo laikomi monomorfiniais ir į populiacijų genetinių parametrų skaičiavimus nebuvo įtraukti. Norėdami įvertinti pelkinės uolaskėlės augalų iš skirtingų populiacijų genetinius

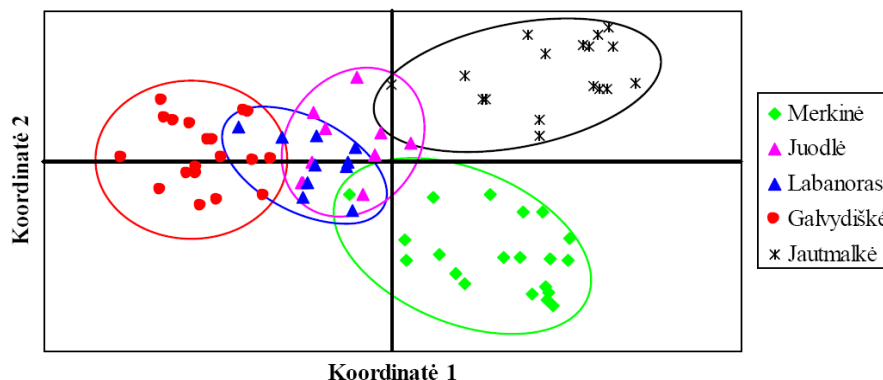
panašumus ir skirtumus, apskaičiuotų genetinių atstumų pagrindu nubraižėme UPGMA dendrogramą (9 pav.) bei atlikome genetinės įvairovės analizę principinių koordinacių



9 pav. Pelkinės uolaskėlės (*Saxifraga hirculus* L.) 76 individų genetinio panašumo dendrograma pagal gautus RAPD lokusus. Įkėlų vertės, gautos atlikus 1000 pakartojimų ir didesnės kaip 30%, pavaizduotos ant dendrogramos šakų

metodu (10 pav). Dendrogramoje matome, kad visi individai genetiškai skiriasi. Taip pat akivaizdu, kad populiacijos išlaiko savitumą, sudarydamos dendrogramoje kompaktiškas augalų grupes. Šiuo požiūriu ypač išsiskiria dvi populiacijos: Jautmalkės ir Galvydiškės. Jų individai grupuojasi tik tarpusavyje. Merkinės populiacijos individai irgi grupuojasi tarpusavyje, tačiau sudaro dvi greta išsidėsčiusias sankaupas. Labanoro ir Juodlės

populiacijos yra labiau heterogeniškos. Nepaisant to, giminingumo medyje stebime gana stipriai išreikštą augimvietės įtaką *S. hirculus* individų genetiniam giminingumui. Šią išvadą patvirtina ir RAPD lokusų pasiskirstymo populiacijose analizė, atlikta principinių koordinatinių metodo (10 pav.).



10 pav. Pelkinės uolaskėlės (*Saxifraga hirculus* L.) populiacijų išsidėstymas dvimatėje erdvėje, gautas principinių koordinatinių metodo

Trys koordinatinių ašys aprašo didžiąją tirtų populiacijų genetinės įvairovės dalį: pirmoji ašis - 27,44%, antroji – 22,34%, trečioji (paveiksle nepavaizduota) - 18,33%. Dešimtame paveiksle matyti, kad tos pačios populiacijos individai sudaro gana kompaktiškas grupes. Ypač tai pasakytina apie Jautmalkės, Merkinės ir Galvydiškės populiacijas, kurios praktiškai nepersidengia su likusiomis. Labanoro ir Juodlės populiacijų individai labiau išsibarstę dviejų koordinatinių sistemoje (panašiai kaip ir dendogramoje). Be to, Labanoro ir Juodlės populiacijos dalinai persidengia. Rezultatai, gauti principinių koordinatinių metodo, irgi patvirtina tam tikrą tirtų populiacijų genetinį savitumą.

Ištyrę DNR polimorfizmą *S. hirculus* populiacijų viduje pagal 66 polimorfinius lokusus nustatėme, kad didžiausias DNR polimorfizmo lygis buvo Merkinės populiacijoje – 86,36%, mažiausias Juodlės – 71,21% (4 lentelė). Panaši tendencija atsispindėjo ir kituose genetinės įvairovės parametruose populiacijų viduje. Juodlės populiacijai būdinga mažiausia Nei genų įvairovė (h), mažiausias Shannon'o indeksas (I) ir vidutinis alelių skaičius (n_a) lokuse. Mūsų tirtose populiacijose Nei genų įvairovė priklausė nuo populiacijos dydžio – $r = 0,67$; $p < 0,016$.

Kitas labai svarbus rūšies situaciją apibūdinantis parametras – populiacijų diferenciacija. Molekulinės genetinės įvairovės analizė (AMOVA) parodė, kad didžioji genetinės (RAPD) įvairovės dalis (73%) tenka individualiems augalų skirtumams populiacijose. Tarppopuliacinis molekulinės genetinės įvairovės komponentas sudaro 27% ($\Phi_{PT} = 0,27$). Iš vidutinių H_t ir H_s reikšmių apskaičiuotas populiacijų genetinės diferenciacijos koeficientas G_{ST} skaitine reikšme buvo labai panašus į Φ_{PT} ($G_{ST} = 0,26$).

Taigi, tiek Φ_{PT} , tiek G_{ST} rodo gana didelę populiacijų diferenciaciją. Kadangi mūsų tiriamos *S. hirculus* populiacijos yra skirtinguose klimatiniuose rajonuose, išskiriamuose

4 lentelė. Pelkinės uolaskėlės (*Saxifraga hirculus* L.) populiacijų genetiniai rodikliai

Populiacija	Polimorfizmas (%)	n_a	h	I	GD _{xy} *
Labanoras	75,76	1,7576	0,3090	0,4476	0,2809
Merkinė	86,36	1,8636	0,3253	0,4812	0,2899
Galvydiškė	84,85	1,8485	0,3376	0,4922	0,2442
Jautmalkė	80,30	1,8030	0,2974	0,4413	0,2673
Juodlė	71,21	1,7121	0,2950	0,4276	0,2253
Vidurkis ± SN*	79,70 ± 6,3	1,7970 ± 0,063	0,3129 ± 0,018	0,4580 ± 0,027	0,2615 ± 0,026

GD_{xy}* - vidutinis genetinis atstumas tarp augalų populiacijoje; n_a - stebimų alelių skaičius; h - Nei (1973) genų įvairovė; I - Shannon'o indekso vertė; SN- standartinis nuokrypis

atsižvelgiant į vidutinę ilgametę minimalią temperatūrą, norėjosi išsiaiškinti, ar pelkinės uolaskėlės populiacijų genetinei diferenciacijai neturi įtakos galimai skirtingos klimatinės sąlygos. Atsižvelgiant į tai, kad Galvydiškės, Juodlės ir Jautmalkės populiacijos priklausė šeštai temperatūrinei zonai, Merkinės – penktai, o Labanoro – ketvirtai (3 lentelė), apskaičiavome molekulinės genetinės įvairovės pasiskirstymą tarp šių trijų rajonų. AMOVA analizė parodė, kad jokios genetinės diferenciacijos tarp tokiu būdu išskiriamų rajonų nėra, nors yra pakankamai didelė ir statistiškai patikima diferenciacija tarp populiacijų. Pastarąją galėjo nulemti su rūšies arealo fragmentacija susijęs genų dreifas, gamtinės atrankos poveikis ir izoliacija.

Kalbant apie retas rūšis ir jų populiacijas, ilgą laiką buvo manoma, kad sumažėjusi genetinė įvairovė – jų visų bendras požymis. Tačiau, tiek kitų autorių, tiek mūsų atlikti tyrimai rodo, kad šis požiūris negali būti aksioma. DNR polimorfizmas mūsų tirtuose pelkinės uolaskėlės individuose buvo 71%, o vidutinis DNR polimorfizmas populiacijoje – 79,70 ± 6,3 %. Stebimas didelis vidupopuliacinės įvairovės lygis leidžia manyti, kad uolaskėlės populiacijų įvairovės susidarymui pastaruoju evoliuciniu laikotarpiu didelę įtaką turėjo lytinis dauginimasis. Didelį RAPD lokusų polimorfizmą *S. hirculus* rūšyje galėjo nulemti ir kitos šios rūšies ypatybės: gana ilga gyvenimo trukmė, alogaminis apvaisinimo būdas.

Aprašyta atveju, kai genetinė įvairovė retoje rūšyje netgi didesnė už plačiai paplitusių tos pačios genties rūšių genetinę įvairovę (Gitzendanner & Soltis, 2000). Pavyzdžiui, viena iš ledynmečio relikto *S. paniculata* yra endeminė rūšis Centrinėje Europoje. DNR polimorfizmas, ištirtas RAPD metodu, šioje rūšyje buvo 91,2% (Reich et al., 2003). Kitoje reliktinėje rūšyje *S. azoides* polimorfiškai buvo 72,8% alozimų lokusų

(Lutz et al., 2000). Aukštas RAPD lokusų polimorfizmas (89,71%) nustatytas ir nykstančioje *Antirrhinum microphyllum* rūšyje (Torres et al., 2003).

Jeigu pelkinė uolaskėlė (*S. hirculus* L.) priskiriama antrajai, t. y. greitai nykstančių augalų kategorijai ir ją globoja Berno konvencija, tai kitai mūsų tirtai rūšiai, **paprastajam uosiui** (*Fraxinus excelsior* L., Oleaceae), iš pirmo žvilgsnio, išnykimas lyg ir negresia. Uosio populiacijos užima apie 2,6% miškų ploto Lietuvoje, tačiau jo populiacijos sparčiai nyksta, stebimas didelis šių medžių žuvinimas (Ozolinčius ir kt., 1998; Skuodienė ir kt., 2003). Todėl daugelyje Europos šalių ši rūšis populiacijų lygmenyje laikoma nykstančia (Pliura, 1999). Kadangi rūšies sugebėjimas adaptuotis prie kintančių aplinkos sąlygų priklauso nuo genetinės įvairovės lygio, iškilo poreikis įvertinti paprastojo uosio populiacijų genetinę struktūrą bei genetinės įvairovės pasiskirstymą tarp populiacijų ir jo priklausomybę nuo kai kurių geografinių parametrų (Žvingila et al., 2005). Mes tyrėme dešimt paprastojo uosio populiacijų, iš viso 99 individus. Genetinė įvairovė uosio populiacijų viduje ir tarp populiacijų buvo analizuojama pagal 76 RAPD lokusus. Jos lygis tirtose populiacijose labai skyrėsi. Daugiausia polimorfinių lokusų nustatyta Šilutės ir Telšių populiacijose (92,1%), mažiausia – Pakruojo (57,9%). Vidutinė populiacijos genetinė įvairovė pagal Shannon'o indeksą (I) taip pat didžiausia buvo Šilutės populiacijoje (0,532), o mažiausia – Pakruojo (0,312) (5 lentelė). Populiacijoms specifinių RAPD juostų tyrimo metu nenustatėme. Didžiausi genetiniai atstumai tarp individų buvo Telšių populiacijoje (vidurkis apie 31%). Genų įvairovė, apskaičiuota M. Nei metodu, tirtose populiacijose kito nuo 0,210 iki 0,365. Naudodami STEPDISC SAS procedūrą, nustatėme lokusus, kurių įtaka populiacijų diferenciacijai yra didžiausia. Tokiu būdu nustatėme 13 reikšmingiausių lokusų, kuriuos naudodami atlikome analizę principinių komponentių metodu (11 pav.). Šiuo atveju pirmoji komponentė aprašė tik 5,8% viso kintamumo. Kai ši analizė buvo atlikta naudojant visus 76 lokusus, pirmoji komponentė aprašė 15,1% kintamumo. Kadangi principinių komponentių metodu aprašoma tik nedidelė bendrojo kintamumo dalis, tai rodo, kad populiacijų diferenciaciją lemia daug nesusijusių lokusų, kurių įtaka kiekvieno atskirai labai menka. Kaip matyti vienuoliktame paveiksle, populiacijos nevienodai skiriasi vienos nuo kitų: kai kurios persidengia, kitos, pavyzdžiui, Kėdainių ir Ignalinos, yra žymiai nutolę viena nuo kitos. Šiuos rezultatus patvirtina ir apskaičiuoti Nei genetiniai atstumai tarp populiacijų. Vis dėlto koreliacijos tarp geografinių ir genetinių atstumų uosio populiacijoms nenustatėme. Išanalizavę genetinės įvairovės pasiskirstymo priklausomybę nuo kitų geografinių parametrų, nustatėme, kad kai kurie jos rodikliai (polimorfizmas, Shanonn'o indeksas, vidutinis stebimų alelių skaičius) priklauso nuo populiacijos augimvietės kontinentalumo indekso ir ilgumos. Didesnė

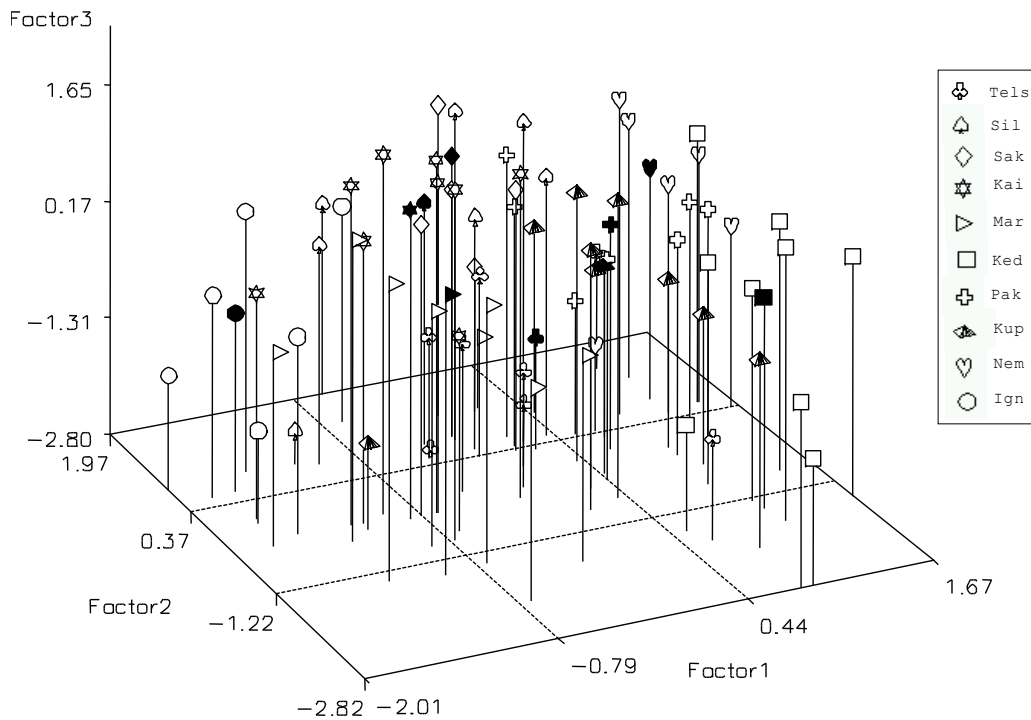
5 lentelė. Paprastojo uosio (*Fraxinus excelsior* L.) populiacijų genetinės įvairovės rodikliai nustatyti RAPD metodu

Populiacija	Stebimas alelių skaičius, N_a	Nei genų įvairovė	Shannon'o indeksas, I	GD_{xy}^*
Telšių	1.921	0.359	0.526	0.307
Šilutės	1.921	0.365	0.532	0.248
Šakių	1.895	0.358	0.522	0.235
Kaišiadorių	1.697	0.254	0.378	0.217
Marijampolės	1.829	0.313	0.461	0.259
Kėdainių	1.776	0.277	0.411	0.271
Pakruojo	1.579	0.210	0.312	0.183
Kupiškio	1.855	0.343	0.500	0.294
Nemenčinės	1.658	0.245	0.361	0.187
Ignalinos	1.711	0.273	0.401	0.205
Vidurkis	1.784±0.123	0.3±0.018	0.440±0.025	0.241±0.014

* GD_{xy} vidutinis genetinis atstumas tarp individų populiacijoje

genetinės įvairovės dalis, tenkanti Vakarų Lietuvoje esančioms uosio populiacijoms, galbūt atspindi šios rūšies migracijos kelią šiaurės rytų kryptimi. Molekulinė genetinės įvairovės analizė parodė, kad didžioji genetinės įvairovės dalis yra populiacijose, o tarp populiaciniam jos komponentui tenka 8,3% ($p = 0,001$). Nenustatėme jokios diferenciacijos tarp populiacijų iš skirtingų kilmės rajonų. Genetinės diferenciacijos lygis, nustatytas tarp uosio populiacijų, yra didesnis už gautą su kitais žymenimis (SSR) (Heuertz, 2003). Pasak kai kurių autorių, plačiai paplitusių medžių rūšių populiacijų diferenciacija yra mažesnė nei 3% (Slavov et al., 2002). Nors tarp RAPD ir kitais molekuliniais žymenų metodais nustatytų populiacijų genetinių rodiklių stebima koreliacija, tačiau RAPD atveju populiacijų diferenciacija yra šiek tiek didesnė (Nybom & Bartish, 2000). Šiuo atveju skirtumus galėjo nulemti ir skirtinga naudotų molekuliniai žymenų prigimtis (Tautz et al., 1986; Mengoni et al., 2000) ir uosio populiacijų būklė Lietuvoje. Tirdami paprastojo uosio populiacijas, nustatėme, kad jos skiriasi genetinės įvairovės lygiu. Deja, atsakyti į klausimą, ar šios įvairovės sumažėjimas kai kuriose populiacijose yra uosių nykimo priežastis, negalime, nes nepavyko gauti duomenų apie šių populiacijų ekologinę būklę ir jas sudarančių augalų pažeidimo mastą. Nepaisant to, gauta informacija bus naudinga rūpinantis uosio genetinių resursų išsaugojimu, o taip pat tai informacija apie tam tikru laiko momentu buvusį uosio genetinės įvairovės lygį. Tai gali būti atskaitos taškas būsimiems tyrimams ir ateityje leis objektyviai įvertinti galimus pokyčius.

Sėklinės medžiagos parinkimas labai svarbus vykdant tam tikros rūšies atkūrimo darbus. Naudojant sėklas, surinktas nuo nedidelio skaičiaus individų



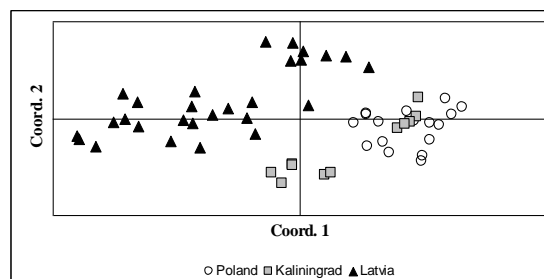
11 pav. RAPD lokusų, turinčių didžiausią įtaką uosių populiacijų diferenciacijai, analizė principinių komponentių metodu. Tai pačiai populiacijai priklausantys medžiai pažymėti vienodu simboliu. Juodas simbolis – tam tikros populiacijos individų pasiskirstymo trijų koordinatinių sistemos vidutinė reikšmė

neatsižvelgiant į jų genetinį giminingumą (genetinius atstumus, genetinės įvairovės lygį), galima sumažinti atkuriamų populiacijų efektyvų dydį ir padidinti inbrydingo tikimybę. Tai savo ruožtu gali sukelti prastą rūšies, atkuriamos tam tikroje teritorijoje, prisitaikymą prie aplinkos sąlygų, apsunkinti užsibrėžtos atkūrimo programos vykdymą (Barret & Kohn, 1991). Šis klausimas aktualus ir Lietuvai, nes nykstant augalų rūšims vis labiau domimasi jų išsaugojimu bei išnykusių atkūrimu. Viena tokių rūšių, kurios atkūrimo klausimas svarstomas, yra europinis kukmedis (Navys, 2000). Pasak literatūros, **europinis kukmedis** (*Taxus baccata* L., Taxaceae) Lietuvoje išnyko XIX a. (Lietuvos TSR flora, 1959; Navys, 2000). Kita vertus, kaimyninėse šalyse (Latvijoje, Lenkijoje, Rusijoje) yra išlikusios natūralios kukmedžio populiacijos, kurias būtų galima panaudoti kukmedžio atkūrimui Lietuvoje, nes tam yra tinkamos klimato sąlygos, ypač pajūrio regione (Navys, 2000). Lietuvoje, pavyzdžiui, Švėkšnos ir Šateikių parkuose, taip pat yra keletas senų kukmedžių, kurie galbūt yra kilę iš jau išnykusių populiacijų. Tirdami paprastojo kukmedžio populiacijų genetinės įvairovės lygį kaimyninėse šalyse, mes neatmetėme galimybės, kad ateityje ši informacija gali būti panaudota atkuriant šios rūšies populiacijas Lietuvos miškuose (12 pav.) (Kuisys et al., 2008).



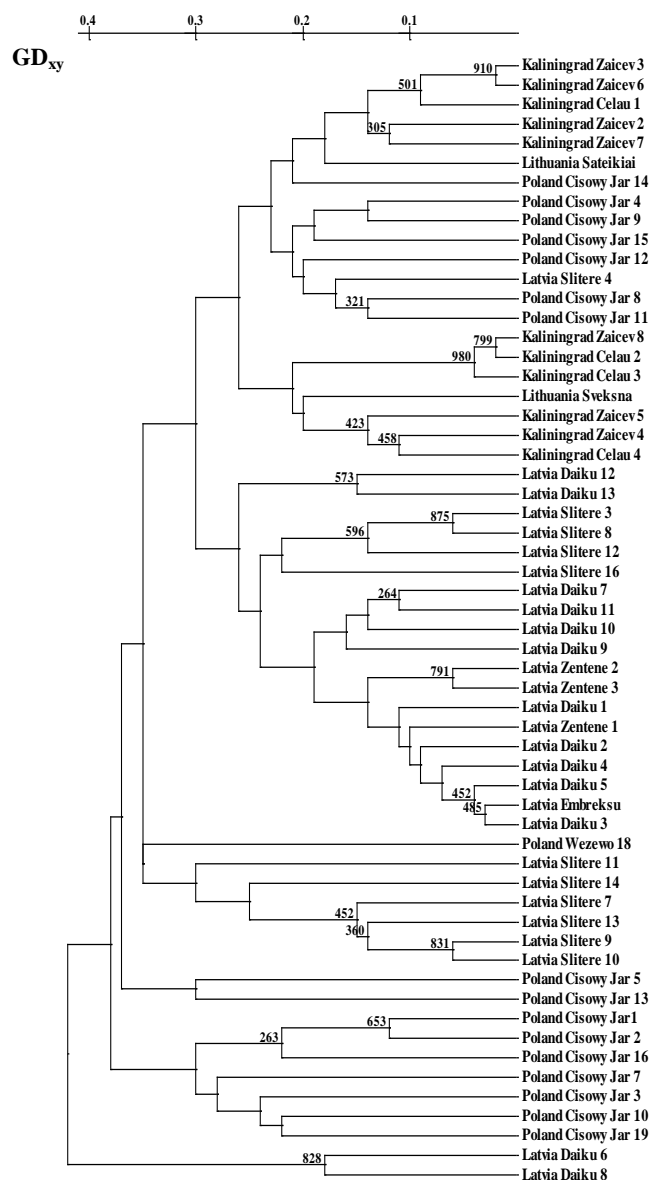
12 pav. Europinio kukmedžio radimvietės. Provenencijų žymėjimas: Sl – Slitere, Da – Daiku, Ze – Zentene, Em – Embreksu, Ša – Šateikiai, Šv – Švėkšna, Za – Zaicev, Ce – Celau, CJ – Cisowy Jar, W – Wezewo

Tyrimai UPGMA metodu parodė, kad skirtingos kilmės individai pasižymėjo tam tikru savitumu, nors analizė principinių koordinacių metodu rodė Lenkijos ir Kaliningrado populiacijų dalinį persidengimą (13, 14 pav.).



13 pav. Europinio kukmedžio (*Taxus baccata* L.) kilmų išsidėstymas dviejų koordinacių sistemoje. Rezultatai, gauti principinių koordinacių metodu, panaudojus genetinių atstumų tarp 58 tirtų individų reikšmes

Du kukmedžio pavyzdžiai iš Lietuvos parkų yra genetiškai artimi Kaliningrado srities pavyzdžiams (14 pav.). Klasterinės ir principinių koordinacių metodais atliktos analizės rezultatai, o taip pat Nei genų įvairovės (h) bei Shannon'o indekso (I) reikšmės rodo, kad didžiausias polimorfizmas ($h = 0,375$; $I = 0,539$) būdingas Latvijos provenencijos kukmedžiams, o Lenkijos – atitinkamai: $h = 0,291$; $I = 0,429$. Latvijos europinio kukmedžio populiacijos pasižymi gana didele genetinė įvairove ir jos, esant galimybės

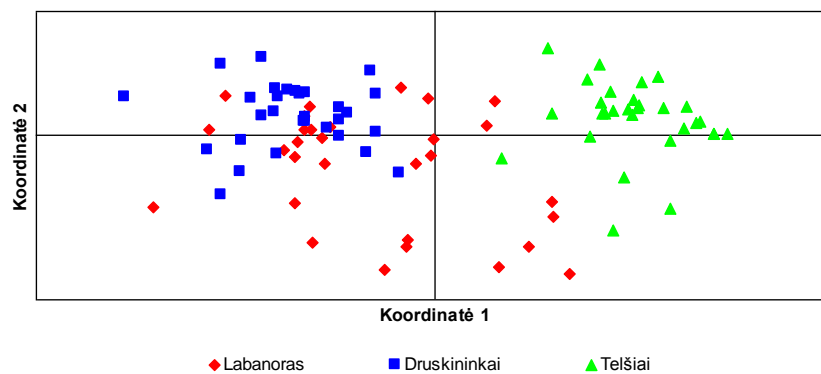


14 pav. Skirtingos kilmės europinio kukmedžio (*Taxus baccata* L.) pavyzdžių UPGMA dendrograma. Skalėje pateikti genetiniai atstumai pagal Nei ir Li (1979)

ir poreikiui, gali būti naudojamos europinio kukmedžio įveisimui Lietuvos miškuose. Be to ir kitų populiacijų genetinį savitumą reikėtų išnaudoti atkūrimo darbe.

Paprastosios pušies (*P. sylvestris* L.) populiacijų genetiniai tyrimai Lietuvoje prasidėjo 1956 m. (Ramanauskas, 1972; Danusevičius, 2000). Per šį laikotarpį atlikti didelės apimties fenotipinės populiacijų įvairovės, jų perkėlimo ir hibridizacijos tyrimai, sukurti rinktinių medžių klonų archyvai, parengta pušies genetinių išteklių saugojimo sistema (Danusevičius, 2000). Remiantis populiacijų skirtumais, Lietuvos teritorija padalinta į sėklinius rajonus. Tokį suskirstymą, tyrinėtojų nuomone, lemia skirtingos ekologinės sąlygos Lietuvos teritorijoje. Ypač daug duomenų šiuo klausimu sukaupta apie Telšių, Druskininkų ir Labanoro pušies provenencijas. Šių provenencijų pušys skiriasi savo šakojimosi pobūdžiu, biologiniu produktyvumu, sporifikacijos laiku, sugebėjimu

adaptuotis prie naujų ekologinių sąlygų (Andriuškevičienė & Ramanauskas, 1978; Aučina et al., 2005). Nežiūrint šių skirtumų, paprastosios pušies populiacijų genetinė įvairovė labai didelė (Pliūra & Gabrilavičius, 1994; Danusevičius, 2000). RAPD metodu tyrėme trijų populiacijų (Labanoro, Veisėjų (Druskininkų) ir Telšių) sėjinukų DNR polimorfizmą (Naugžemys et al., 2006). Visi sėjinukai buvo išauginti VU Botanikos sodo bandymų lauke tomis pačiomis sąlygomis. Ištyrę 90 augalų, nustatėme 63 RAPD lokusus, iš kurių 69,8% buvo polimorfiški. Pagal Nei (h) genų įvairovę, Shannon'o indeksą (I) ir genetinių atstumų tarp individų populiacijos viduje vidurkį (GDxy) didžiausia genetinė įvairovė pasižymėjo Labanoro populiacijos sėjinukai (atitinkamai $h = 0,225$; $I = 0,33$; $GD_{xy} = 0,15$), o mažiausia – Telšių populiacijos sėjinukai ($h = 0,176$; $I = 0,267$; $GD_{xy} = 0,091$). Įdomu tai, kad Labanoro populiacijos sėjinukai, kuriuose nustatytas didžiausias molekulinės genetinės įvairovės lygis, pasižymi didesniu produktyvumu ir augimo greičiu (Aučina et al., 2005). Iš šių trijų grupių Telšių populiacijos individai blogiausiai adaptuojasi naujose sąlygose, vykdant populiacijų perkėlimo eksperimentus. Geri Labanoro populiacijos rodikliai nustatyti ir ankstesniais tyrimais (Danusevičius, 2000). Principinių koordinačių metodu atliktos analizės rezultatai taip pat rodo, kad RAPD lokusų lygyje tarp tirtų populiacijų egzistuoja tam tikri skirtumai (15 pav.).



15 pav. Paprastosios pušies (*Pinus sylvestris* L.) Labanoro, Druskininkų ir Telšių populiacijų sėjinukų RAPD fenotipų analizės, atliktos principinių koordinačių analizės metodu, rezultatai

Taigi šie rezultatai neprieštaruoja požiūriui, kad tarp genetinės įvairovės ir populiacijų tinkamumo (angl., *fitness*) dažnai egzistuoja teigiama priklausomybė (Mitton et al., 1993; Dvorak et al., 2003). Didesnė genetinė įvairovė sudaro sąlygas reprodukinei ir adaptacinei heterozei (Leibenguth & Shoghi, 1998). Mūsų tyrimų rezultatai papildo jau atliktų svarbiausios Lietuvos miškų medžių rūšies tyrimų duomenis ir suteikia jiems tam tikrą molekulinį genetinį pagrindą, kuris gali būti naudingas kuriant naujas paprastosios pušies plantacijas ir atkuriant iškirstus miškų plotus.

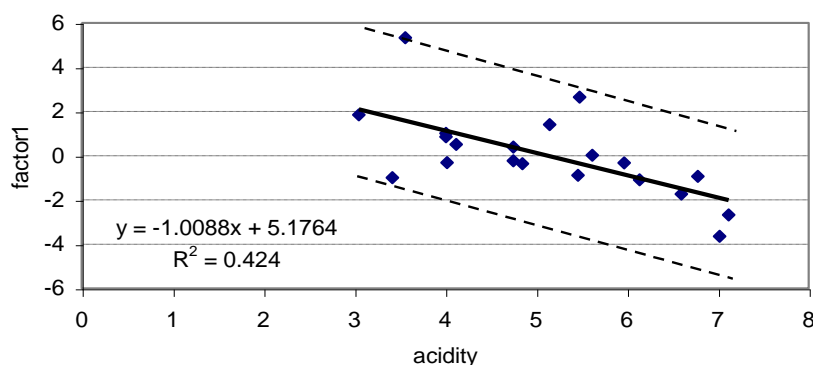
Dar viena miško medžių rūšis, kuri svarbi tiek ekonominiu, tiek ekologiniu požiūriu visos Europos mastu, yra **paprastoji eglė** (*Picea abies* (L.) Karst.). Lietuvoje eglėnai užima apie 22,8% miškais padengtos šalies teritorijos. Yra atlikti gana išsamūs šios rūšies morfologiniai, eko-klimatiniai, izofermentų ir kariotipiniai tyrimai (Gabrilavičius & Danusevičius, 2003). Deja, eglės populiacijų DNR polimorfizmo tyrimų iki šiol nebuvo. Todėl mūsų uždavinys buvo nustatyti Lietuvos paprastosios eglės populiacijų genetinės įvairovės ir diferenciacijos lygį naudojant DNR žymenis (RAPD) bei palyginti gautus rezultatus su kaimyninių šalių eglės populiacijų tyrimais (Areškevičienė et al., 2005). Šiame darbe ištyrėme aštuonias eglės populiacijas: Plungės, Telšių, Rokiškio, Ignalinos, Jurbarko, Kazlų rūdos, Alytaus ir Dubravos. Šių populiacijų 152-jų individų RAPD-PGR analizė parodė, kad šiai eglės rūšiai būdingas labai didelis DNR polimorfizmas – 93,2%. DNR polimorfizmo vidurkis populiacijose buvo 75,5%, kuris panašus į anksčiau nustatytą (74%) naudojant izofermentų tyrimo metodą (Gabrilavičius & Danusevičius, 2003). Mūsų nustatytas paprastosios eglės populiacijų genetinės diferenciacijos koeficientas ($G_{ST} = 0,097$) buvo panašus į užsienio autorių gautus rezultatus. Pavyzdžiui, Prancūzijos paprastosios eglės populiacijų diferenciacija kai kurių autorių duomenimis sudaro 4,2%, Lenkijos – 6,4% (Collignon & Farve, 2000; Kraj, 2002). Aložimų polimorfizmo tyrimai taip pat rodė apie 4 – 7% diferenciaciją (Giannini et al., 1991; Kannenberg & Gross, 1999). Savo darbe nenustatėme populiacijai savitų RAPD lokusų, todėl, tvarkant šios rūšies genetinius išteklius, reikėtų atsižvelgti į morfologinius ir ekologinius populiacijų savitumus.

1.2.2. *Paprastosios avietės Rubus idaeus L. RAPD polimorfizmo priklausomybė nuo radimvietės edafinių savybių*

Adaptivumo prigimtimi mokslininkai susidomėjo jau nuo gamtinės atrankos teorijos paskelbimo. Tačiau adaptacijų genetika pasirodė esanti daug sudėtingesnė negu pradžioje buvo manoma. Nėra tvirtai nustatyta, ar prisitaikymą lemia vienas/keli genai, kurių poveikis labai didelis, ar priešingai – veikia daug genų, kurių pavieniai efektai nėra dideli, tačiau sumuojasi veikiant gamtinei atrankai tam tikra kryptimi. Pavyzdžiui, Fisher'io laipsniškumo teorija teigia, kad įvairi adaptacija atsiranda kaupiantis daugybei smulkių genetinių pokyčių, kurių kiekvieno efektas labai mažas (Fisher, 1958). Toks požiūris būdingas vadinamosios biometrijos mokyklos atstovams. Kita vertus, Mendelinės genetikos mokyklos atstovai (Bateson, 1913; Morgan, 1932) akcentuoja didelių mutacijų tam tikruose genuose svarbą. Pavyzdžiui, Orr ir Coyne teigia, kad adaptaciją lemia keletas pradinių, turinčių didelį poveikį, mutacijų, po kurių gali sekti ir

mažiau reikšmingos (Orr & Coyne, 1992; Orr, 2003). Tačiau taip pat yra nemažai duomenų, tarp jų ir eksperimentinių, kurie rodo, jog nemažą dalį adaptacijų kontroliuoja pavieniai genai. Pastarieji rezultatai dažniausiai gauti tiriant kultūrinių augalų veisles (Lynch & Walsh, 1998). Vis dėlto dar trūksta eksperimentinių duomenų genetinei adaptyvumo teorijai sukurti. Nepakankamai ištirta adaptacijų prigimtis ir gamtinėse populiacijose. Šiuo metu ją bandoma išaiškinti naudojant morfologinius ir DNR žymenis. Kadangi morfologinių žymenų paveldimumo koeficientas dažnai mažas ir jie labai priklauso nuo aplinkos sąlygų, didelis dėmesys buvo sutelktas į DNR žymenų panaudojimą adaptyvumo klausimams gamtinėse populiacijose tirti. Deja, susiduriama su naujais sunkumais. Teigiama, kad dauguma molekulinė žymenų yra neutralūs fenotipo atžvilgiu. Dėl to sunku tikėtis, kad tokį DNR polimorfizmą veiktų atranka, ir kad jis turėtų adaptacinę reikšmę (Volis et al., 2001; McRay & Latta, 2002). Nemažai kitų autorių laikosi priešingos nuomonės (Fahima et al., 1999; Semagn et al., 2000; Graham et al., 2003).

Tyrėme dvidešimties paprastosios avietės (*R. idaeus*) genotipų RAPD žymenų pasiskirstymo priklausomybę nuo šių augalų radimvietės dirvožemio savybių (rūgštingumo, humuso, azoto, fosforo ir kalio kiekio) (Žvingila et al., 2004). Atlikome išsamią šių individų genomo analizę su 36-iais pradmenimis ir nustatėme 230 polimorfinių RAPD lokusų. Faktorinės analizės principinių komponentų metodu ištyrėme šių lokusų pasiskirstymą individų RAPD fenotipuose priklausomai nuo dirvožemio savybių. Nustatėme patikimą koreliaciją (esant 1% reikšmingumo lygmeniui) tarp RAPD lokusų pasiskirstymo faktorinės analizės rezultatų ir tirtų augalų radimvietės dirvožemio rūgštingumo ($r = -0,65$) (16 pav.; 6 lentelė).



16 pav. Regresijos kreivė, apibūdinanti paprastosios avietės (*Rubus idaeus* L.) pavyzdžių RAPD fenotipų faktorinės analizės rezultatų priklausomybę nuo radimvietės dirvos rūgštingumo

6 lentelė. Pearson'o koreliacijos koeficientai (r) tarp 230-ies polimorfinių RAPD lokusų pasiskirstymo faktorinės analizės rezultatų ir radimvietės savybių (N, K, P, humuso kiekio ir dirvos rūgštingumo)

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

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

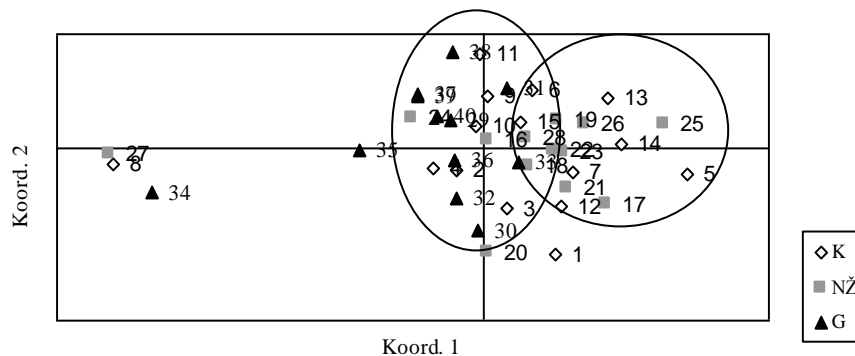
Gauti rezultatai rodo, kad kai kuriuos RAPD lokusus galbūt veikia gamtinė atranka, ir jie yra svarbūs individų prisitaikymui prie augimvietės sąlygų. Šių žymenų neutralumas fenotipo atžvilgiu, matyt, yra pernelyg drąsus apibendrinimas. Todėl nežiūrint anksčiau minėto nuomonių skirtumo akivaizdu, kad DNR polimorfizmas yra būtina sąlyga adaptacijoms atsirasti gamtinės atrankos poveikyje. Kuo didesnė genetinė įvairovė rūšies viduje, tuo didesnė tikimybė populiacijai ar rūšiai išlikti keičiantis aplinkos sąlygoms. Tirdami šį reiškinį populiacijose, galime tikėtis suprasti bent kai kuriuos adaptacijų atsiradimo mechanizmus. Dėl šios priežasties mes tyrėme geografinių ir klimatinių veiksnių įtaką *Rubus idaeus* L. populiacijų genetinei įvairovei (Patamsytė et al., 2005). Kad šie veiksniai (aukštis virš jūros lygio, augimvietės edafinės savybės, kritulių kiekis ir kt.) gali turėti įtakos populiacijų genetinei įvairovei, rodo įvairių autorių tyrimų duomenys, gauti naudojant RAPD ir kitus molekulinis žymenis (Fahima et al., 1999; Semagn et al., 2000; Graham et al., 2003; Reish et al., 2005). Mūsų atlikti preliminarūs septynių avietės populiacijų tyrimai parodė, kad vidutinis metinis kritulių kiekis gali turėti įtakos tirtų populiacijų genetinei įvairovei ($r = -0,78$; $p = 0,04$). Kiti dešimt ekogeografinių veiksnių neturėjo įtakos DNR polimorfizmo pasiskirstymui populiacijose. Ištyrus daug didesnę populiacijų skaičių (devyniolika), šie rezultatai iš esmės pasitvirtino. Nustatyta populiacijų genetinė diferenciacija sudarė 26%. Genetinės įvairovės rodiklių priklausomybės nuo konkrečių klimatinių ir geografinių veiksnių nenustatėme, išskyrus tai, kad buvo teigiama koreliacija tarp skirtingų RAPD fenotipų dalies populiacijoje ir kritulių kiekio žiemą ($r = 0,63$; $p = 0,004$), ir metinio kritulių kiekio ($r = 0,58$; $p = 0,01$).

1.2.3. DNR žymenų panaudojimas pupų chlorofilinių morfozių tyrimams

Molekulinių žymenų metodai yra naudojami pažaidų, atsiradusių genome dėl mutageninių veiksnių poveikio, tyrimams. Daug eksperimentinių duomenų rodo, kad RAPD metodas irgi gali būti sėkmingai naudojamas panašaus pobūdžio tyrimams (Atienzar et al., 2002). Vienas iš reiškinų, kuriuo nuo seno domisi Botanikos ir

genetikos katedra, yra individualus augalų polimorfizmas, kuris išryškėja po **pupų** (*Vicia faba* L., Fabaceae) sėklų poveikio kobalto (Co^{2+}) pertekliumi ir pasireiškia įvairaus laipsnio chlorofilinėmis morfozėmis (Rančelis, 1978). Tirdami šio reiškinio galimas priežastis, mes naudojome ir RAPD metodą, kaip būdą skirtingą pažeidimo laipsnį rodančių augalų savitumui ir genetiniams pokyčiams nustatyti (Rančelis et al., 2006). Tiriant augalus, pasižyminčius skirtinga reakcija į Co, tikėtasi nustatyti skirtumus tarp Co tolerantiškų ir Co jautrių augalų DNR, ir atsakyti į klausimus: 1) ar po poveikio Co įvyksta pokyčiai augalų DNR, 2) ar yra ryšys tarp DNR polimorfizmo ir augalų individualaus polimorfizmo pagal atsaką į Co perteklių?

Tyrimo rezultatai parodė didelį individualų pupų augalų DNR polimorfizmą. Fenotipinių grupių išdėstymas dvimatėje erdvėje taikant principinių koordinačių analizę (17 pav.) rodė tam tikrą G (geltonų) ir NŽ (nepakitusių žalių) augalų grupavimąsi po Co poveikio. Individualus augalų polimorfizmas labai apsunkina RAPD metodu gaunamų duomenų statistinį įvertinimą. Autorių atliktuose bandymuose DNR elektroforezės duomenys buvo išreikšti priešingo fenotipo juostų skaičiumi, palyginus su pagrindiniu (vyraujančiu) fenotipu (juostos buvimas laikomas vienetu – 1, o nebuvimas – 0). Skirtumas tarp Co veikėtų NŽ ir G augalų buvo labai nedidelis (7 lentelė).



17 pav. Pupų *Vicia faba* L. augalų iš skirtingų fenotipinių grupių principinių koordinačių analizė

7 lentelė. RAPD juostų pokyčiai skirtingai Co pažeistuose pupų augaluose

Fenotipinės grupės	Augalų skaičius	Informatyvios juostos		
		bendras skaičius	priešingos pagrindiniam tipui skaičius	fenotipinės juostos %
K-žali	15	1759	694	39,5 ± 1,2
Co-žali	13	1483	618	41,8 ± 1,3
Co-geltoni	12	1292	564	43,7 ± 1,4 ^a

^a – P = 0,02, palyginti su K

Didelį individualų *Vicia faba* DNR polimorfizmą patvirtino ir gauti RAPD analizės rezultatai, bet pupų DNR polimorfizmas matyt nėra susijęs su polimorfiniu augalų atsaku į kobalto perteklių. Galima situacija, kai genotoksinis veiksnys indukuoja pokyčius kaip atsaką tik specifiniame lokuse. Norint jį aptikti, reikalinga ir sėkmė parenkant tinkamus pradmenis, todėl šiuo atveju reikėtų ieškoti tam tikram fenotipui savitų RAPD juostų.

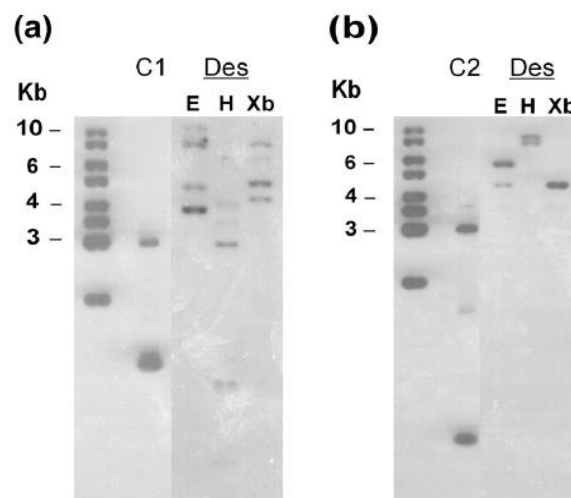
2. DNR žymenų panaudojimas augalų genomui tirti

2.1. DNR žymenų panaudojimas atsako į stresą genų klonavimui

DNR žymenys buvo ir yra labai svarbi priemonė tiriant augalų genomą. Jie naudojami genomų sekoskaitai, kuriant genolapius, lyginamajai geno analizei, klonuojant genus (Weising et al., 2005). Mes panaudojome cDNR žymenis (jie dažnai vadinami EST) klonuoti genams, dalyvaujantiems bulvių (*Solanum tuberosum* L.) reakcijoje į biotinį ir abiotinį stresą (Sos-Hegeđus et al., 2004). Pirminis šio darbo tikslas buvo nustatyti genus, kurie pradeda veikti esant bakterijos *Erwinia carotovora* sukeltai infekcijai. Ši bakterija sukelia daugelio augalų, tarp jų ir bulvių, šlapiąjį puvinį (Pérombelon and Kelman, 1980). Iki šiol nėra sukurta atsparių šiam patogeni veislių, kadangi jis neturi avirulentiškumo genų. Svarbiausi bakterijos patogeniškumo veiksniai yra fermentai (pektinazės ir celiulazės), kurie ardo augalo ląstelių sienelės. Šie fermentai taip pat sukelia ir augalo atsaką į patogeno poveikį (Vidal et al., 1998; Norman et al., 1999). Modelinis augalas baltažiedis vairėnis (*Arabidopsis thaliana* L.) turi du apsaugos nuo erviniųjų mechanizmus. Vienas jų priklauso nuo jazminų rūgšties, kurią slopina salicilo rūgštis ir etilenas, o kitas mechanizmas pagrįstas sinergistiniu jazminų rūgšties ir etileno veikimu, kurį dar sustiprina salicilo rūgštis (Norman-Setterblad et al., 2000).

Norėdami nustatyti genus, kurių raišką sukelia *E. caratovora* infekcija, bulvių lapus infiltravome fiziologiniame tirpale suspenduota bakterijos naktine kultūra. Po to buvo išskiriami trys suminės RNR pavyzdžiai (0 val., po 2 val., po 4 val.). Diferencijuotai veikiančių genų mRNR nustatėme naudodami Display Systems Biotech inkaruotų ir atsitiktinės sekos pradmenų rinkinį (Vista, CA, USA) bei Differential Display metodą (Liang & Pardee, 1992). Buvo išskirta 69-ių, diferencijuotai besireiškiančių, genų cDNR. Iš jų 43-jų genų cDNR buvo klonuotos į pBluescript SK vektorių (Stratagene). Atlikus šių klonų sekoskaitą, homologiškų sekų paiešką EMBL ir GenBank duomenų bazėse, buvo nustatyta, kad kai kurie klonuoti EST žymenys buvo homologiški atsparumą nulemiančių genų (SAR 8.21, peroksidazių) mRNR (Žvingila et al., 1999). Patikrinus klonuotų cDNR genų raišką northern hibridizacija, nustatytos cDNR, kurių raišką sukėlė

E. caratovora. Dvi pilno dydžio cDNR buvo klonuotos iš cDNR bibliotekos, gautos naudojant šia bakterija paveiktus bulvių lapus. Klonuotos sekos pavadintos atitinkamai *Steil* ir *Stei2* (angl. *Solanum tuberosum* – *Erwinia* – *induced* 1, 2). Atlikus šių klonų sekoskaitą, nustatyta, kad *Steil* (Acc. No. AY187625) sudarytas iš 1266 bp ir koduoja 354 aminorūgštis (ASR nuo 61 iki 1125 nt). *Stei2* (Acc. No. AY187626) dydis yra 735 bp, jo ASR prasideda 59-tu nt ir pasibaigia 453-čiu nt. *Steil* ir *Stei2* turi atitinkamai 47% ir 76% identiškų aminorūgščių su baltažiedžio vairo nežinomos funkcijos baltymais NP5654006 ir NP197221. Panaudojus hibridizaciją pagal Southern'ą, buvo nustatyta, kad *S. tuberosa* genome šie genai turi nedaug kopijų (18 pav.).



18 pav. *Steil* ir *Stei2* genų nustatymas bulvių *Solanum tuberosum* veislės Désirée genome (Sós-Hegedűs et al., 2004). Genominė DNR buvo suskaldyta restrikcijos endonukleazėmis EcoRI (E), HindIII (H) ir XbaI (Xb), o po to hibridizuota su *Steil* (a) ir *Stei2* (b) zondais. C1 žymi *Steil* cDNR suskaldytą EcoRI ir XhoI. C2 – *Stei2* cDNR suskaldytą EcoRI ir XhoI. Zondų gavimui buvo naudoti koduojantys genų rajonai

Ištirus šių genų raišką, buvo nustatyta, kad *Steil* ir ypač *Stei2* savo savybėmis yra panašūs į genus, kuriuos indukuoja biotinis ir abiotinis stresas. *Stei2* raišką sukeldavo NaCl, dehidratacija, audinių sužalojimas ir absizinė rūgštis. Yra žinoma, kad kai kuriuos patogenų indukuojamus *PR* (angl., *pathogenesis related*) genus gali aktyvinti biotinis ir abiotinis stresas, pavyzdžiui, vairo ERD15 (Timmusk & Wagner, 1999) ir liucernos *PPRG2* genus (Borsics & Lados, 2002). Be to, yra žinomi genai, kuriuos indukuoja ir patogenas, ir audinių sužalojimas (Norman et al., 1999; Sturm & Chrispeels, 1990). Mūsų rezultatai patvirtina, kad augaluose egzistuoja tam tikri bendri biotinio ir abiotinio atsako į stresus komponentai.

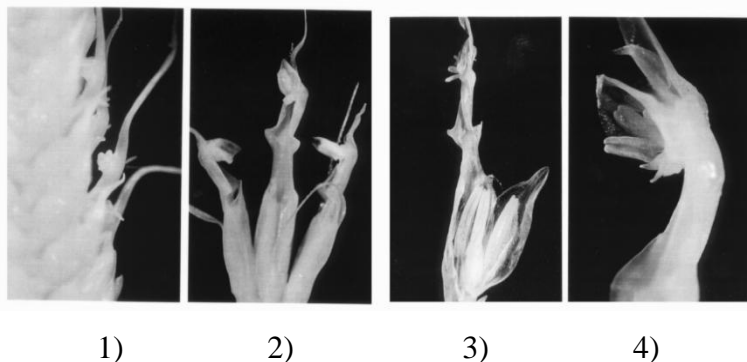
2.2. Javų genominiai tyrimai

Ilgą laiką molekuliniai žymenys buvo bene vienintelis būdas tirti sudėtingus ir didelius javų genomus ($0,4 \times 10^9 - 1,8 \times 10^{10}$ bp), palyginti juos tarpusavyje bei nustatyti juose vykstančius pokyčius. Siekdami įvertinti DNR polimorfizmo lygį įvairių javų rūšių ir veislių genominėje DNR, atlikome RAPD analizę su 34-iais pradmenimis. Rūšiai saviti DNR fragmentai buvo nustatyti rugių, kviečių ir miežių pavyzdžių genominės DNR RAPD fenotipuose (Žvingila & Pependikytė, 1994). Nustatėme gana aukštą vidurūšinio DNR polimorfizmo lygį 18-oje tirtų **rugių** veislių ir genetinių linijų. Taip pat buvo tiriamas genominės DNR skaldymo restrikcijos endonukleazėmis poveikis polimorfinių RAPD juostų susidarymui. Daug mažesnę DNR polimorfizmo lygį nustatėme **miežių** veislių pavyzdžiuose. Tai, matyt, priklauso nuo šios rūšies dauginimosi būdo. Rugiai yra kryžmadulkiai augalai, o miežiai – obligatiniai savidulkiai. Dėl šios priežasties vykstanti homozigotizacija sąlygoja mažesnę vidurūšinę DNR polimorfizmą miežiuose. Nustatėme, kad rugių ir miežių genominės DNR skaldymas restrikcijos endonukleazėmis padidina tiriamo DNR polimorfizmo lygį. Vėlesniuose tyrimuose palyginome dviejų metodų informatyvumą polimorfiniams lokusams miežių genome nustatyti. Pasirinkę 43 įvairios kilmės miežių veisles ir genetines linijas, jose tyrėme RAPD ir RAMP polimorfizmą (Žvingila et al., 1999). Gauti rezultatai parodė, kad daugiau polimorfinių lokusų galima nustatyti naudojant RAMP metodą, kuris išryškina ne tik RAPD, bet ir mikrosatelitinių lokusų polimorfizmą. Vėliau analizavome RAMP žymenų paveldėjimo palikuonių kartose dėsningumus (Žvingila et al., 2001). Ištyrėme dvidešimt penkių RAMP žymenų paveldėjimą F_1 ir F_2 hibriduose. Parodyta, kad 80% šių žymenų yra paveldimi pagal Mendelio dėsnius, dėl to jie gali būti panaudoti genų kartografavimui ir selekciniam darbui.

2.3. Miežių *HVKNOX3* geno polimorfizmo tyrimas

Literatūros duomenimis, *HVKNOX3* gene (naujesnėje literatūroje vadinamas *BKn3*) įvykusios mutacijos (305 bp duplikacija IV introne) sukelia homeozinę žiedo dalių transformaciją. Dėl to buvo susidomėta šiuo genu. Vadinamiesiems *Hooded* mutantams vietoje akuoto arba ant akuoto susidaro papildomas žiedas (Müller et al., 1995). Vėliau buvo nustatyta ir daugiau pokyčių šio geno struktūrinėje ir reguliacinėje dalyje. *HVKNOX3* geną tyrėme miežių veislėje ‘**Auksiniai II**’ (kontrolė – normalus fenotipas) ir trijuose miežių mutantuose: *Collcess*, *tweaky spike (tw)*, *tweaky spike 2 (tw₂)* (Rančelis et al., 2001). Norėjome nustatyti, ar miežių mutantinis fenotipas yra susijęs su

pokyčiais šiame gene. Prof. Rančelis ir kt. parodė, kad miežių mutantai *tw* ir *tw₂* yra homeoziniai (Rančelis, 2001; Bieliūnienė et al., 2003). Mutantas *Collcess* yra gautas iš N.I. Vavilovo vardo Rusijos Augininkystės mokslinio tyrimo instituto (VIR, Sankt–Peterburgas). Prieš tirdami šio mutanto *HVKNOX3* geną, pirmiausia atlikome išsamią žiedyno raidos analizę ir nustatėme, kad tiek savo morfologija, tiek vystymusi jis tikrai atitinka *Hooded* tipo mutantus (19 pav.).



19 pav. Mutanto *Collcess* žiedyno raidos etapai: 1) ant akuoto besiformuojantis papildomas žiedas; 2) visos trys vienažiedės varputės turi po papildomą žiedą ant akuoto; 3) centrinės varputės sandara; 4) padidintas papildomo žiedo vaizdas (60 ×), kuriame matomos visos normaliam žiedui būdingos dalys

Mes tyrėme miežių ‘Auksiniai II’ (veislė, iš kurios gauti mutantai *tw* ir *tw₂*), *tw*, *tw₂*, *Collcess* genotipų *HVKNOX3* geno dalį be promotoriaus (nuo 2785 bp iki 10815 bp). Pradinę pokyčių paiešką atlikome PGR būdu pagausinant genomine DNR nuo pasirinktų pradmenų poros. Po elektroforezės agarozės gelyje aptikome skirtumus tarp įvairių genotipų miežių pagausintos DNR fragmentų dydžio, kuris rodė pakitimus tiriamų objektų *HVKNOX3* lokuse. Buvo atlikta išsamesnė polimorfinių lokusų analizė, DNR fragmentų klonavimas ir nukleotidų sekų nustatymas. Didžiausi pakitimai, palyginus su duomenų bazės duomenimis, kaip ir buvo tikėtasi, nustatyti mutanto *Collcess* nukleotidų sekoje (8 lentelė). Šio mutanto *HVKNOX3* geno ketvirtajame introne įvykusi 33 bp delecija ir 305 bp duplikacija, palyginus su laukinio tipo aleliu (*k*). Taip pat jame aptikta 18 bp insercija. Be šių mutacijų, mutanto *HVKNOX3* geno tame pačiame introne aptikta ir keletas VNP-o atvejų. Tačiau jau minėtos trys pagrindinės mutacijos leidžia iširtą mutanto *Collcess* (*Hooded*) geną laikyti *HVKNOX3* geno aleliu *K*, kuris aprašytas Müller’io ir kt. (1995) mutante *Hooded*. Remiantis literatūros duomenimis, šį alelį pagal kilmę galime priskirti *IIIc* alelių tipui (Badr et al., 2000). Vis dėlto, šių dviejų mutantų tirtoje geno *HVKNOX3* dalyje nustatyti trys VNP-o atvejai, kurie galėjo atsirasti ilgą laiką mutantus saugant geografiškai nutolusiuose genų bankuose.

8 lentelė. Vieno nukleotido polimorfizmas (VNP) ir kito pobūdžio pokyčiai miežių mutantų *Collcess (Hooded)* ir *tw2 HVKNOX3* geno fragmente

DNR kilmė	Polimorfiniai lokusai miežių <i>HVKNOX3</i> gene												
	414	427 ^H	459	460	497	586	710	859	921	1081 ^C	1082	1140 ^D	E
<i>Hooded (K)</i> pagal Badr et al. (2000)	A	-	T	C	T	T	G	T	T	-	T	+	+
<i>Collcess</i> iš VIR	A	- ^B	G	C	T	C	G	T	T	-	C	+	+
<i>tw2</i>	G	+	T	G	C	T	A	G	C	+	T	-	-
'Auksiniai II' (<i>wt</i>)	A	+	T	G	T	T	A	G	C	-	T	-	-

* - seka pagal Badr et al., 2000

■ – polimorfiniai saitai; ■^B - *K* iš VIR ir Badr et al.(2000) skirtumai ■ - *tw* ir veislės 'Auksiniai II' skirtumai;

H – žymi 33 bp buvimą (+) ar nebuvimą (-) 427-459 padėtyje;

B – 33 bp insercija nustatyta 425-457 padėtyje;

C – žymi (TC) delecijos buvimą (+) ar nebuvimą (-)1081-1082 padėtyje;

D – žymi 305 bp intarpo buvimą (+) ar nebuvimą (-)1140-1444 padėtyje;

E – žymi 18 bp intarpo IV introne buvimą (Muller et al., 1995)(GenBank. Accession number X83518).

Kito mūsų tirtu originalaus mutanto *tw2 HVKNOX3* geno sekoje nustatyta keletas VNP žymenų (palyginus su *HVKNOX3* seka iš genų banko): G vietoje A (5046 padėtis), C vietoje T (5129 padėtis), dviejų nukleotidų (TC) delecija (5713 – 5714). Norint nustatyti, ar šie pokyčiai galėjo nulemti mutantinį „apipešiotos varpos” fenotipą, reikalingi išsamesni tyrimai.

Šiuo metu yra analizuojama mutanto *tw2* promotoriaus sritis, o taip pat įdomus šio tipo mutantų požymis – genetinis nestabilumas (Rančelis, 2001). Tarp šio mutanto palikuonių retkarčiais būna ir normalių augalų, kurie vertinami kaip revertantai. Genetinis *tw* mutantų nestabilumas pasireiškė ne tik pagal grįžtamas mutacijas, bet ir pagal chromosomų aberacijų bei seserinių chromatidžių mainų dažnį. Sukaupta unikali šių mutantų revertantų kolekcija (Vaitkūnienė et al., 2006). Atlikti šių mutantų ir revertantų tyrimai RAPD metodu parodė, kad kai kurių revertantų RAPD haplotipai visiškai nesiskyrė nuo *tw2* mutantų (Žvingila et al., in press). Norėdami išaiškinti fenotipo skirtumų tarp šio tipo *tw* mutantų ir revertantų, o taip pat genetinio nestabilumo, stebėto kai kuriose mutantų linijose, priežastis, planuojame naudoti DNR žymenis, galinčius atskleisti mikrosatelitų bei retrotranspozonų lokusų polimorfizmą. Galima manyti, kad mutageno sukeltas stresas galėjo indukuoti judriųjų genomo elementų transpoziciją. Jeigu ši prielaida būtų teisinga, tada būtų galima tikėtis retrotranspozonų polimorfizmo miežių revertantų linijose, gautose iš genetiškai nestabilių miežių *tw* mutantų.

Išvados

1. RAPD ir RAMP žymenys yra tinkami augalų genetinių kolekcijų ir rinktinių medžių archyvų pavyzdžių genotipavimui ir genetinės įvairovės įvertinimui. Vertinant kolekcijų genetinę įvairovę DNR žymenys turėtų būti naudojami kartu su morfologiniais žymenimis.
2. Reliktinės rūšies pelkinės uolaskėlės (*Saxifraga hirculus* L.) populiacijose nustatytas gana didelis DNR polimorfizmas ($P = 71\%$) patvirtina anksčiau kitų autorių pastebėtą reiškinį, kad ne visose nykstančiose rūšyse genetinės įvairovės lygis yra stipriai sumažėjęs. Jis taip pat rodo, kad lytinis dauginimasis turėtų būti svarbus šios rūšies populiacijų atsinaujinimui.
3. Tarp kai kurių paprastojo uosio (*Fraxinus excelsior* L.) populiacijų stebimi dideli genetinės įvairovės skirtumai. Nustatyta DNR polimorfizmo ir Shannon'o indekso priklausomybė nuo populiacijos augimvietės kontinentalumo ir ilgumos. Didesnis genetinės įvairovės lygis stebimas Vakarų Lietuvos uosio populiacijose.
4. Populiacijų genetinės įvairovės tyrimai RAPD metodu parodė nevienodą skirtingų rūšių augalų populiacijų genetinės diferenciacijos laipsnį. Mažiausia genetinė diferenciacija nustatyta medžių rūšių (uosio, eglės) populiacijose, didžiausia – pelkinės uolaskėlės (*Saxifraga hirculus* L.) ir paprastosios avietės (*Rubus idaeus* L.) rūšių populiacijose.
5. Panaudojus EST žymenis klonuoti du *Solanum tuberosum* genai (*Ste1* ir *Ste2*), dalyvaujantys augalo atsake į patogeninės bakterijos *Erwinia carotovora* infekciją. Nustatytas nedidelis šių genų kopijų skaičius bulvių genome. Savo savybėmis šie genai panašūs į genus, kurių raišką indukuoja ne tik biotinis, bet ir abiotinis stresas.
6. Ištyrus dviejų miežių mutantų (*Collcess* ir *tw₂*) *HVKNOX3* geno koduojančią dalį, nustatyti įvairūs DNR pokyčiai palyginti su duomenų bazėje (GenBank) esančia šio geno seka. Taip pat nustatyti nedideli skirtumai tarp veislės 'Auksiniai II' ir iš jo gauto mutanto *tw₂* *HVKNOX3* geno sekų.

Perspektyvos

Siekdami genetinės įvairovės tyrimų praktinio pritaikymo toliau tirsime miežius, kaip vieną iš svarbiausių javų rūšių pasaulyje ir Lietuvoje. Numatome darbus, kurie leistų nustatyti DNR žymenis, susijusius su atsparumo biotiniam (patogeninio grybo infekcijai) ir abiotiniam (rūgščioms dirvoms) stresui lokusais. Kaip vieną iš būdų šiam tikslui pasiekti naudosisime informaciją, esančią miežių EST duomenų bazėse bei molekulinį žymenų genolapius. Planuojame, kad pradinė genetinė medžiaga šiems tyrimams bus miežių mutantų kolekcijos pavyzdžiai, kuriems būdingi įvairūs imuniteto sutrikimai. Šiuose darbuose planuojame panaudoti ir tarptautinius miežių veislių bei mutantų genetinius išteklius. Numatome modifikuoti augalų jautrumą biotiniam ir abiotiniam stresui naudodami ląstelių kultūrų metodus, tirsime atsparumo mechanizmų genetinę ir epigenetinę prigimtį, vykdysime atsparių ląstelių linijų atranką ir regeneraciją.

Kadangi augalų genomų sekoskaitos projektai niekada neapims visos augalų karalystės, tai šiuose darbuose, tiriant genetinį kintamumą, molekulinės genetinės įvairovės ir adaptyvumo santykį, labai svarbu nustatyti molekulinį žymenų ryšį su fenotipu. Lietuvoje kol kas yra mažai darbų, kuriuose būtų tiriama vietinių augalų populiacijų genetinė įvairovė, todėl, norėdami užpildyti šią spragą, toliau tirsime šias populiacijas, jose vykstančius genetinius procesus, jų priklausomybę nuo ekologinių ir antropogeninių veiksnių. Vykdamas augalų populiacijų tyrimus labai svarbu stiprinti bendradarbiavimą su įvairių institucijų augalų genetikais, botanikais ir ekologais.

Tęsimas darbus, kuriuos esame pradėję su VU Botanikos ir genetikos katedros botanikais, tiriant nykstančių augalų rūšių genetinę įvairovę. Taip pat numatome atlikti vaisinių augalų ir dumblių molekulinės taksonomijos tyrimus bendradarbiaudami su VU Botanikos sodo pomologais bei VU Botanikos ir genetikos katedros algologais.

Habilitacijos procedūrai teikiamų mokslinių straipsnių sąrašas

STRAIPSNIAI

leidiniuose, įtrauktuose į Mokslinės informacijos instituto (ISI) duomenų bazes

1. Kuisys T., Naugžemys D., Skridaila A., Žilinskaitė S., Žvingila D. Random amplified polymorphic DNA analysis of genetic diversity of *Taxus baccata* L. in provenances Baltic Sea countries. *Baltic Forestry*. 2007, 2: 184-189. (ISI Master Journal List; ISI WOS) <http://scientific.thomsonreuters.com/cgi-bin/jrnlst/jlresults.cgi>
2. Rancelis V., Cesniene T., Zvingila D., Balciuniene L., Dapkuniene S. Polymorphism of response to cobalt excess in individual *Vicia faba* plants. *Environmental and Experimental Botany*. 2006, 55(3): 221-234. (ISI Master Journal List; IF: 1.81)
3. Areškevičienė R., Žvingila D., Gabrilavičius R., Kuusienė S. The estimation of genetic diversity within and between Lithuanian populations of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) using RAPD. *Baltic Forestry*. 2005, 11(2): 2-8. (ISI Master Journal List; ISI WOS)
4. Sos-Hegedus A., Žvingila D., Banfali Z., Dallman G. *Erwinia carotovora* infection enhances the expression of two novel abiotic stress-inducible genes in potato. *European Journal of Plant Pathology*. 2004, 110(4): 435-439. (ISI Master Journal List; IF: 1.482)
5. Patamsytė J., Žvingila D., Labokas J., Baliuckas V., Kleizaitė V., Balčiūnienė L., Rančelis V. Assessment of diversity of wild raspberries (*Rubus idaeus* L.) in Lithuania. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*. 2004, 12: 195-205. (CAB Abstracts (<http://www.cabi.org/>), ISI Master Journal List www.isinet.com/cgi-bin/jrnlst/jloptions.cgi?PC=master)
6. Žvingila D., Pependikytė V. The genetic diversity of barley cultivars from the Baltic States and Belarus, as determined by RAMPs. *Cellular & Molecular Biology Letters*. 2002, 7(2A): 477-481. (ISI Master Journal List; IF: 1.238)

STRAIPSNIAI

leidiniuose, įtrauktuose į kitas tarptautines duomenų bazes,
patvirtintas Lietuvos mokslo tarybos

1. Patamsytė J., Žvingila D., Labokas J., Baliuckas V., Balčiūnienė L., Kleizaitė V., Rančelis V. Study of genetic diversity in wild raspberry (*Rubus idaeus* L.) germplasm collection using morphological characters and RAPD markers. *Biologija*. 2008, 2: 66-74. (ISI Master Journal List) <http://scientific.thomsonreuters.com/cgi-bin/jrnlst/jloptions.cgi?PC=master>
2. Naugžemys D., Žilinskaitė S., Denkovskij J., Patamsytė J., Lickerskis J., Žvingila D. RAPD based study of genetic variation and relationships among *Lonicera* germplasm accessions. *Biologija*. 2007, 3: 34-39. (ISI Master Journal List)
3. Naugžemys D., Žvingila D., Meškauskaitė E., Naujalis J. Analysis of DNA polymorphism in Lithuanian populations of *Saxifraga hirculus* L. *Biologija*, 2007, 1: 81-86. (ISI Master Journal List)

4. Naugžemys D., Žvingila D., Aučina A., Rančelis V. Comparison of DNA polymorphism in seedlings of *Pinus sylvestris* L. from different populations by RAPD markers. *Biologija*. 2006, 1: 30-35. (ISI Master Journal List)
5. Patamsytė J., Žvingila D., Mažonytė I., Kleizaitė V., Baliuckas V., Balčiūnienė L., Rančelis V. Assessment of ecological impact on genetic diversity among populations of *Rubus idaeus* L. *Biologija*. 2005, 4: 24-28. (ISI Master Journal List)
6. Žvingila D., Verbylaitė R., Baliuckas V., Pliūra A., Kuusienė S. Genetic diversity (RAPD) in natural Lithuanian populations of common ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Biologija*. 2005, 3: 46-53. (ISI Master Journal List)
7. Žvingila D., Patamsytė J., Kleizaitė V., Labokas J., Baliuckas V., Balčiūnienė L., Rančelis V. The study of genetic variability and adaptation in wild *Rubus idaeus* L. using molecular markers. *Biologija*. 2004, 3: 21-26. (ISI Master Journal List)
8. Staniulytė R., Žvingila D.; Kuusienė S. Paprastosis eglės (*Picea abies* (L.) Karst.) pliusinių medžių klonų genetinės įvairovės ir tapatumo įvertinimas APPD metodu. *Miškininkystė: mokslo darbai*. 2004, 2(56): 5-12. (Forestry Abstracts, CABI Publishing, Forest Science Database)
9. Žvingila D., Verbylaitė R., Abraitis R., Kuusienė S., Ozolinčius R.. An assessment of genetic diversity in plus tree clones of *Pinus sylvestris* L. using RAPD markers. *Baltic Forestry*. 2002, 8(2): 2-7.
10. Žvingila D., Popendikytė V. Genetic diversity of *Hordeum vulgare* L. cultivars from Lithuania and contiguous states as revealed by random amplified microsatellite polymorphisms (RAMP). *Proceedings of Latvian academy of Science*. 2001, 55(5/6): 212-215.
11. Rančelis V., Balčiūnienė L., Bieliūnienė A., Kleizaitė V., Popendikytė V., Pozdniakovaitė N., Vaišnienė V., Vaitkūnienė V., Žvingila D. Barley genetical resources in Lithuania. I. The barley genetical collection of Vilnius University. *Biologija*. 2001, 4 (priedas): 32-37.
12. Žvingila D., Kleizaitė V., Vaitkūnienė V., Popendikytė V. Inheritance of molecular markers (RAMP and SOD) in F1 and F2 hybrids of barley. *Biologija*. 2001, 1: 76-77.
13. Balčiūnienė L., Bieliūnienė A., Kazlauskaitė D., Vaitkūnienė V., Žvingila D., Popendikytė V., Rančelis V. Quantitative characters of induced barley mutants. 3. Differences in DNA polymorphism and ear structure gradient. *Biologija*. 2000, 4: 16-21.
14. Žvingila D., Popendikytė V. The use of random amplified microsatellite polymorphic DNA for determining genetic diversity and genetic relationships in Lithuanian barley cultivars. *Biologija*. 2000, 2: 8-11.
15. Žvingila D., Kleizaitė V., Popendikytė V. Investigation of molecular polymorphism in barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars, genetical lines and mutants. *Biologija*. 1999, 3: 111 - 113.
16. Žvingila D., Sos-Hegedus A., Kiraly L., Dallmann G. Cloning fragments of mRNA induced after infection of *Solanum tuberosum* L. by *Erwinia carotovora*. *Biologija*. 1999, 4: 3-6.
17. Žvingila D., Popendikytė V. Use of polymerase chain reaction for the identification and analysis of cereal genomes. *Biologija*. 1994, 4: 24-27.

Literatūros sąrašas

- Adams M.D., Kelley J.M., Gocayne J.D., Dubrick M. et al. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science*, 1991, 252, 1651-1656.
- Ahloowalia B.S., Maluszynski M., Nichterlein K. Global impact of mutation-derived varieties. *Euphytica*, 2004, 135(2), 187-204.
- Areškevičienė R., Žvingila D., Gabrilavičius R., Kuusienė S. The estimation of genetic diversity within and between Lithuanian populations of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) using RAPD. *Baltic Forestry*, 2005, 11(2), 2-8.
- Asins M.J., Carbonell E.A. Distribution of genetic variability in a durum wheat world collection. *Theor Appl Genet*, 1989, 77, 287-294.
- Atienzar FA, Vanier P, Jha AN, Depledge MH. Evaluation of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for the detection of DNA damage and mutations. *Mutat Res*, 2002, 521, 151-163.
- Aučina A., Danusevičius J., Danusevičius D., et al. Response of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings to different climatic conditions and their adaptation peculiarities. *Biologija*, 2005, 2, 27-33.
- Badjakov I., Todorovska E., Kondakova V. et al. Assessment the genetic diversity of Bulgarian raspberry germplasm collection by microsatellite and RAPD markers. *J Fruit Ornament Plant Res*, 2006, 14, 61-76.
- Badr A., Müller K., Schaffer-Pregl R., El Rabey H. et al. On the origin and domestication history of barley (*Hordeum vulgare*). *Mol Biol Evol*, 2000, 17, 499-510.
- Balčiūnienė L., Bieliūnienė A., Kazlauskaitė D., Vaitkūnienė V., Žvingila D et al. Quantitative characters of induced barley mutants. 3. Differences in DNA polymorphism and ear structure gradient. *Biologija*. 2000, 4, 16-21.
- Balčiūnienė L., Labokas J., Radaitienė D. Primary evaluation of field collection of wild *Rubus idaeus*. *Botanica Lithuanica*, 2005, 11(1), 3-15.
- Baliuckas V., Danusevičius J. The sexual asymmetry of Scots pine clones. Scots pine breeding and genetics. *Proc IUFRO S.2. 02.18. Symp.*, 1994, 117-121.
- Baliuckas V., Danusevičius J., Gabrilavičius R., Kanapickaitė A. ir kt. 1997. Mokslinės programos „Kultūrinių augalų resursai“ temos „Miško medžių genetiniai ištekliai“ 1994–1997 metų baigiamoji ataskaita.
- Barrett S.C.H., Kohn, J.R. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. In: Falk D.A. and Holsinger K.E. (eds), *Genetics and Conservation of Rare Plants*. Oxford University Press, 1991, pp. 3-30.
- Bateson W. *Mendel's principles of heredity*. Cambridge University Press, Cambridge, 1913.
- Baum B.R., Nevo E., Johnson D.A., Beiles A. Genetic diversity in wild barley (*Hordeum spontaneum* C. Koch) in the Near East: a molecular analysis using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Genet Resour Crop Evol*, 1997, 44, 147-157.
- Bieliūnienė A., Švėgždienė D., Rančelis V. A peculiar structure of the flower in the homeotic barley mutant tweeky spike. *Biologija*, 2003, 1, 25-28.
- Borsics T., Lados M. Dodder infection induces the expression of a pathogenesis-related gene of the family *PR-10* in alfalfa. *J Exp Bot*, 2002, 53, 1831-1832.
- Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*, 1980, 32, 314-331.
- Chaovanalikit A., Thompson M.M., Wrolstad R.E. Characterization and quantification of anthocyanins and polyphenolics in blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.). *Agriculture and Food Chemistry*, 2004, 52, 848-852.
- Collignon A.M., Favre J.M. Contribution to the postglacial history at the western margin of *Picea abies* natural area using RAPD markers. *Annals of Botany*, 2000, 85, 713-722.
- Danusevičius J. 2000. Pušies selekcija. – Monografija. Lututė, Kaunas.
- Dávila J.A., Sánchez de la Hoz M.P., Loarce Y., Ferrer E. The use of random amplified microsatellite polymorphic DNA and coefficients of parentage to determine genetic relationships in barley. *Genome*, 41, 477-486.
- Dvorak W.S., Hamrick J.L., Furman B.J. et al. In: *Proceedings of the 27th Southern Forest Tree Improvement Conference*. Oklahoma State University 2003.

Fahima T, Sun GL, Reharav A, Krugman T et al. RAPD polymorphism of wild emmer wheat populations, *Triticum dicoccoides* in Israel. *Theor Appl Genet*, 1999, 98: 434-447.

Fisher R.A. The genetical theory of natural selection. 2d rev. ed. Dover, New York, 1958.

Forrest I., Burg K., Klumpp R. Genetic markers: tools for identifying and characterising scots pine populations. *Invest Agr.: Sist Recur For*, 2000, 1, 67-87.

Frankham R., Ballou J.D., Briscoe D.A. A Primer of Conservation Genetics. Cambridge, 2004, 32-52.

Gabrilavičius R. Genetic structure of Scots pine clone. *Biologija*, 1995, 3/4, 105-107.

Gabrilavičius R., Danusevičius J. Genetic resources of conifers and their conservation in Lithuania. *Baltic Forestry*, 1996, 2, 15-21.

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

Giannini R., Morgante M., Vendramin G.G. Allozyme variation in Italian populations of *Picea abies* (L.) Karst. *Silvae Genetica*, 1991, 40, 160-166.

Gitzendanner M.A., Soltis P.S. Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *Am J Bot*, 2000, 87, 783-792;

Graham J, Marshall B, Squire GR Genetic differentiation over a spatial environmental gradient in wild *Rubus idaeus* populations. *New Phytologist*, 2003, 157, 667-675.

Graham J., McNicol R.J. An examination of the ability of RAPD markers to determine the relationships within and between *Rubus* species. *Theor Appl Genet*, 1995, 90, 1128-1132.

Hamrick J.L., Godt M.J.W. Allozyme diversity in plant species. In *Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources*, edited by A.H.D. Brown, M.T. Clegg, A.L. Kahler & B.S. Weir. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, 1989, 43-63.

Harlan J.R. Crops and man. 2nd Ed. American Society of Agronomy, Inc., Madison, 1992.

Helentjaris T., Slocum M., Wright S., Schaefer A., Nienhuis J. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. *Theor Appl Genet*, 1986, 61, 650-658.

Heuertz M. Population genetic structure in common ash: a focus on southeastern European genetic resources. PhD diss., Free University of Brussels, Belgium, and Public Research Centre - Gabriel Lippmann, Luxembourg, 2003.

Jaccoud D., Peng K., Feinstein D., Kilian A. Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29, e25.

Jordan S.A., Humphries P. Single nucleotide polymorphism in exon 2 of the BCP gene on 7q31-q35. *Hum Mol Genet*, 1994, 3, 1915.

Kannenbergh N., Gross K. Aozymic variation in some Norway spruce populations of the international IUFRO provenance-testing programme of 1964/1968. *Silvae Genetica*, 1999, 48 (5), 209-217.

Korzun V. Use of molecular markers in cereal breeding. *Cell Mol Biol Lett*, 2002, 7, 811-820.

Kraj W. The estimation of genetic variation within and between Polish provenances of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) on basis of RAPD polymorphism. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Forestry*, 2002, 5 (2), 1-13.

Kuisys T., Naugžemys D., Skridaila A., Žilinskaitė S., Žvingila D. Random amplified polymorphic DNA analysis of genetic diversity of *Taxus baccata* L. in provenances Baltic Sea countries. *Baltic Forestry*, 2007, 13(2), 184-189.

Ladizinsky G. Founder effect in crop-plant evolution. *Econ Bot*, 1985, 39, 191-199.

Leibenguth F., Shoghi F. Analysis of random amplified polymorphic DNA markers in three conifer species. *Silvae Genetica*, 1998, 47, 120-126.

Liang P., Pardee A.B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 1992, 257, 967-971

Lietuvos TSR flora. Vilnius, 1959, I t., 87-89.

Lutz E., Schneller J., Holderegger R. Understanding population history for conservation purposes: Population genetics of *Saxifraga aizoides* (Saxifragaceae) in the lowlands and lower mountains north of the Alps. *Am J Bot*, 2000, 87, 583-590.

Lynch M., Walsh B. Genetics and analysis of quantitative traits. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, 1998.

Markert C.L., Moller F. Multiple forms of enzymes: Tissue, ontogenetic and species specific patterns. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1959, 45, 753-763.

McRay J.K., Latta R.G. Adaptive population divergence markers, QTL and traits. *Trends Ecol Evol*, 2002, 17: 285-291.

- Mengoni A., Gori A., Bazziclupo M. Use of RAPD and microsatellite (SSR) variation to assess genetic relationships among populations of tetraploid alfalfa, *Medicago sativa*. *Plant Breeding*, 2000, 119, 311-317.
- Meškauskaitė E., Naujalis J. Structure and dynamics of *Saxifraga hirculus* populations. *Ekologija*, 2006, 1, 53-60.
- Meškauskaitė E., Naugžemys D., Žvingila D., Naujalis J. Morphological and genetic differentiation of *Saxifraga hirculus* L. (Saxifragaceae) populations in Lithuania. *Acta Biologica Universitatis Daugavpiliensis*, 2009 (in press).
- Mitton J.B., Schuster W.S.F., Cothran E.G. et al. The correlation between the individual heterozygosity of parents and their offspring. *Heredity*, 1993, 71, 59-63.
- Morgan T.H. The scientific basis of evolution. Norton, New York, 1932.
- Müller K.J., Romano N., Gerstner O., Garcia-Marotot F. et al. The barley Hooded mutation caused by a duplication in a homeobox gene intron. *Nature*, 1995, 347, 727-730.
- Naugžemys D., Žilinskaitė S., Denkovskij J. et al. RAPD based study of genetic variation and relationships among *Lonicera* germplasm accessions. *Biologija*, 2007, 34-39.
- Naugžemys D., Žvingila D., Aučina A., Rančelis V. Comparison of DNA polymorphism in seedlings of *Pinus sylvestris* L. from different populations by RAPD markers. *Biologija*, 2006, 1, 30-35.
- Navys E. English Yew (*Taxus baccata* L.) in forests of Baltic States and the main reasons for its distinction from Lithuania. *Baltic Forestry*, 2000, 6 (2), 41-46.
- Nei M., Li W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1979, 76, 5269-5273.
- Norman C., Vidal S., Palva E.T. Oligogalacturonidemediated induction of a gene involved in jasmonic acid synthesis in response to the cell wall-degrading enzymes of the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *Molecular Plant–Microbe Interaction*, 1999, 12, 640-644.
- Norman-Setterblad C., Vidal S., Palva E.T. Interacting signal pathways control defense gene expression in *Arabidopsis* in response to cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora*. *Molecular Plant–Microbe Interaction*, 2000, 13, 430-438.
- Nybom H., Bartish J.V. 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*, 2000, 3/2, 93-114.
- Orr H.A. The distribution of fitness effects among beneficial mutations. *Genetics*, 2003, 163, 1519-1526.
- Orr H.A., Coyne J.A. The genetics of adaptation: a reassessment. *The American Naturalist*, 1992, 140 (5), 725-742.
- Ozolinčius R., Stakėnas V. Lietuvos miškų monitoringas: vizualiai identifikuojami medžių pažeidimai ir jų dinamika. *Miškininkystė*, 1998, 1 (41), 59-71.
- Patamsytė J., Žvingila D., Labokas J., Baliuckas V., Kleizaitė V., Balčiūnienė L., Rančelis V. Assessment of diversity of wild raspberries (*Rubus idaeus* L.) in Lithuania. *J Fruit Ornament Plant Res*, 2004, 12, 195-205.
- Patamsytė J., Žvingila D., Mažonytė I., Kleizaitė V., Baliuckas V., Balčiūnienė L., Rančelis V. Assessment of ecological impact on genetic diversity among populations of *Rubus idaeus* L. *Biologija*, 2005, 4, 24-28.
- Patamsytė J., Žvingila D., Labokas J., Baliuckas V., Balčiūnienė L., Kleizaitė V., Rančelis V. Study of genetic diversity in wild raspberry (*Rubus idaeus* L.) germplasm collection using morphological characters and RAPD markers. *Biologija*, 2008, 2, 66-74.
- Pérombelon M.C.M., Kelman A. Ecology of soft rot erwinias. *Annual Review of Phytopathology*, 1980, 18, 361-387.
- plant defense response. *Molecular Plant–Microbe Interaction*, 1998, 1, 23-32.
- Plekhanova M.N. Blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.) – new commercial berry crop for temperate climate: genetic resources and breeding. *Acta Horticulture*, 2000, 538, 159-164.
- Pliūra A. In: Report of the Third Meeting, Noble Hardwoods Network, edited by J. Turok, J. Jensen, C. Palmberg-Lerche. European long-term gene conservation strategies: Ash (*Fraxinus* ssp). International Plant Genetic Resources Institute. Rome, 1999, 8-20.
- Pliūra A., Gabrilavičius R. Ecological plasticity of Lithuanian Scots pine populations. – Scots pine breeding and genetics Proceedings of the IUFRO S.02.18 Symposium. Lithuania 1994. Kaunas/Girionys: 54-62.

- Ramanauskas V. Lietuvos ir Kaliningrado sr. pušynų selekcinė vertė. Trumpi pranešimai: XVIII-sios LŽŪA dėst. moksl. konf. pranešimų tezės. Kaunas, 1972, 276-279.
- Rancelis V. Regulation of sensitivity of the higher plants to mutagenic factors (in Russian). Vilnius: Mokslas; 1978.
- Rančelis V.P. The problems of mutagenesis and genetic instability. *Biologija*, 1993, 4, 19-26.
- Rančelis V.P., Vaitkūnienė V. Quantitative characters of revertants from genetically unstable barley mutants *tw1* and *tw2*. *Biologija*, 1998, 4, 10-15.
- Rančelis V.P. Miežių *tweaky spike* mutantų ypatybės. Mokslas Gamtos mokslų fakultete. Fakulteto antrosios mokslinės konferencijos, įvykusios 2001 m. Spalio 10d., pranešimai. P. 43-53.
- Rančelis V., Balčiūnienė L., A. Bieliūnienė, Kleizaitė V., Pependikytė V., Pozdniakovaitė N., Vaišnienė V., Vaitkūnienė V., Žvingila D. Barley genetical resources in Lithuania. I. The barley genetical collection of Vilnius University. *Biologija*, 2001, 4 (priedas), 32-37.
- Rancelis V., Cesniene T., Zvingila D., Balciuniene L., Dapkuniene S. Polymorphism of response to cobalt excess in individual *Vicia faba* plants. *Environ Exp Bot*, 2006, 55(3), 221-234.
- Ranker T.A. Evolution of genetic diversity in the rare Hawaiian fern *Adenophorus periens* and implications for conservation management. *Biological Conservation*, 1994, 70, 19-24.
- Reisch Ch., Anke A., Röhl M. Molecular variation within and between ten populations of *Primula farinosa* (Primulaceae) along an altitudinal gradient in the northern Alps. *Basic and Applied Ecology*, 2005, 6, 35-45.
- Sax K. The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics*, 1923, 8, 552-560.
- Schulman A.H. Molecular markers to assess genetic diversity. *Euphytica*, 158, 313-321.
- Semgan K., Bjornstad A., Stedje B., Bekele E. Comparison of multivariate methods for the analysis of genetic resources and adaptation in *Phytolacca dodecandra* using RAPD. *Theor Appl Genet*, 2000, 101, 1145-1154.
- Semgan K., Bjornstad A., Ndindjop M.N. An overview of molecular marker methods for plant. *Afr J Biotechnol*, 2006, 25, 2540-2569.
- Skuodienė L., Grybauskas K., Palionis V., Maslinskas R. Uosynų būklė ir galimos jų žuvimo priežastys. *Miškininkystė*, 2003, 2 (54), 86-96.
- Slavov G.T., DiFazio S.P., Strauss S.H. In: Gene Flow Workshop, edited by A. Snow, C. Mallory-Smith, N. Ellstrand, J. Holt, H. Quemada. Gene flow in forest trees: from empirical estimates to transgenic risk assessment. The Ohio State University, 2002, 113-126.
- Sós-Hegedűs A., Žvingila D., Bánfalvi Z., Dallmann G. *Erwinia carotovora* infection enhances the expression of two novel abiotic stress-inducible genes in potato. *European Journal of Plant pathology*, 2004, 110, 435-439.
- Staniulytė R., Žvingila D., Kuusienė S. Paprastosis eglės (*Picea abies* (L.) Karst.) plusinių medžių klonų genetinės įvairovės ir tapatumo įvertinimas APPD metodu. *Miškininkystė*, 2004, 2(56), 5-12.
- Stebbins G.L. Rarity of plant species: a synthetic viewpoint. *Rhodora*, 1980, 82, 77-86.
- Sturm A., Chrispeels M.J. cDNA cloning of parrot extracellular fructosidase and its expression in response to wounding and bacterial infection. *Plant Cell*, 1990, 2, 1107-1119.
- Suoniemi A., Narvanto A., Schulman A. The *BARE-1* retrotransposon is transcribed in barley from an LTR promoter active in transient assays. *Plant Mol Biol*, 1996, 31, 295-306.
- Tammisola J., Lapinjoki S., Akerman S., Regina M. Et al. Polymorphic DNA markers in clonal identification and pedigree conformation of white birch (*Betula pendula* Roth.). *Plant Genome I conf.*, 1992, P. 178.
- Tautz D., Trick M., Dover G. A. Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. *Nature*, 1986, 322, 652-656.
- Tanksley S.D. Molecular markers in plant breeding. *Plant Mol Biol Rep*, 1983, 1, 3-8.
- Timmusk S., Wagner E.G.H. The plant-growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: Possible connection between biotic and abiotic stress responses. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 1999, 12, 951-959.
- Torres E., Iriando J.M., Perez C. Genetic structure of an endangered plant *Antirrhinum microphyllum* (Scrophulariaceae) allozyme and RAPD analysis. *Am J Bot*, 2003, 90, 85-92.
- Vaitkūnienė V., Varnaitė A., Rančelis V. Interaction of barley mutants *Hooded* and *tweaky spike* in F₁ hybrids. *Biologija*, 2004, 3, 13-20.

- Vaitkūnienė V., Varnaitė A., Balčiūnienė L., Rančelis V. et al. Two types of revertants from the same homeotic barley mutants *tweaky spike*. *Biologija*, 2006, 2, 18-23.
- Volis S., Yakubov B., Shulgina I., Ward D. et al. Tests for adaptive RAPD variation in population genetic structure of wild barley, *Hordeum spontaneum* Koch. *Biol J Linn Soc*, 2001, 74(3), 289-303.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23, 4407-4414.
- Weber J., Olsen O., Wegener C., Wettstein von D. Digalacturonates from pectin degradation induce tissue responses against potato soft rot. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1996, 48, 389-401.
- Weising K., Nybom H., Wolff K., Kahl G. *DNA fingerprinting in Plants: Principles, Methods and Applications*. Taylor & Fransis Group, 2005.
- Westman A. L., Kresovich S. Use of molecular marker techniques for description of plant genetic variation. In: Callow J.A., Ford-Lloyd, J.A. and Newbury, H.J (eds) *Biotechnology and Plant Genetic Resources: Conservation and Use*. CAB International, Oxford, UK, 1997, 9-48.
- Wilkes G. Current status of crop plant germplasm. *CRC Critical reviews in Plant Science*, 1983, 1, 133-181.
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18, 6231-6235.
- Ziętkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. *Genome*, 1994, 20, 176-183.
- Žilinskaitė S., Naugžemys D., Radaitienė D., Žvingila D. Investigation of blue-berried honeysuckle lines and cultivars in Vilnius University Botanical garden collection. *Sodininkystė ir daržininkystė*, 2007, 26(3), 47-56.
- Žvingila D., Popendikytė V. Use of polymerase chain reaction for the identification and analysis of cereal genomes. *Biologija*. 1994, 4, 24-27.
- Žvingila D., Kleizaitė V., Popendikytė V. Investigation of molecular polymorphism in barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars, genetical lines and mutants. *Biologija*. 1999, 3, 111-113.
- Žvingila D., Sos-Hegedus A., Kiraly L., Dallmann G. Cloning fragments of mRNA induced after infection of *Solanum tuberosum* L. by *Erwinia carotovora*. *Biologija*, 1999. 4: 3-6.
- Žvingila D., Popendikytė V. The use of random amplified microsatellite polymorphic DNA for determining genetic diversity and genetic relationships in Lithuanian barley cultivars. *Biologija*, 2000, 2, 8-11.
- Žvingila D., V. Kleizaitė, V. Vaitkūnienė, V. Popendikytė. Inheritance of molecular markers (RAMP and SOD) in F1 and F2 hybrids of barley. *Biologija*, 2001, 1,76-77.
- Žvingila D., Popendikytė V. Barley genetical resources in Lithuania. II. Genetic diversity of barley cultivars raised in Baltic states and Belarus. *Biologija*, 2001, 4 (priedas), 38-41.
- Žvingila D., Popendikytė V. The genetic diversity of barley cultivars from the Baltic States and Belarus, as determined by ramps. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 2002, 7(2A), 477-481
- Žvingila D., Verbylaitė R., Abraitis R., Kuusienė S., Ozolinčius R. Assessment of genetic diversity in plus tree clones of *Pinus sylvestris* L. using RAPD markers. *Baltic forestry*, 2002, 8(2), 2-7.
- Žvingila D., Patamsytė J., Kleizaitė V., Labokas J., Balčiūnienė L., Rančelis V. Molekulinių žymenų taikymas paprastosios avietės (*Rubus idaeus* L.) tyrimuose. *Mokslas Gamtos mokslų fakultete. Fakulteto trečiosios mokslinės konferencijos, vykusios 2004 balandžio 22-23 d., pranešimai*. Vilniaus universiteto leidykla, 2004, 182-189.
- Žvingila D., Patamsytė J., Kleizaitė V., Labokas J., Baliuckas V., Balčiūnienė L., Rančelis V. The study of gentic variability and adaptation in wild *Rubus idaeus* L. using molecular markers. *Biologija*, 2004, 3, 21-26.
- Žvingila D., Verbylaitė R., Baliuckas V., Pliūra A., Kuusienė S. Genetic diversity (RAPD) in natural Lithuanian populations of common ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Biologija*. 2005, 3, 46-53.
- АНДРЮШКЕВИЧЕНЕ И. С., РАМАНАУСКАС В. И. Частичная изоляция природных популяций сосны обыкновенной в южной Прибалтике. В сб.: *Селекция древесных пород в Литовской ССР*. Москва, 1978, 13-17.