

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras



Molekulinės biologijos magistro studijų programos magistrantė

IEVA IGNATAVIČIENĖ

MAGISTRO DARBAS

***Lemna minor* informatyvių genetinių žymenų paieška bei panaudojimas laukinės populiacijos bei eksperimentinių klonų genetinės įvairovės tyrimuose**

Darbo vadovas:

Dr. (HP) Dalius Butkauskas

Vilnius, 2020

***Lemna minor* informatyvių genetinių žymenų paieška bei panaudojimas laukinės populiacijos bei eksperimentinių klonų genetinės įvairovės tyrimuose**

Darbas atliktas Gamtos tyrimų centre Molekulinės ekologijos laboratorijoje

Magistrantė

Ieva Ignatavičienė

/parašas/

Darbo vadovas:

Leisti / neleisti gintis:

Dr. (HP) Dalius Butkauskas

*Įrašo data*

/parašas/

## TURINYS

Santrumpos .....	4
ĮVADAS .....	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	8
1.1. <i>L. minor</i> kaip tyrimų objektas .....	8
1.2. Mikrosatelitiniai žymenys.....	10
1.3. <i>L. minor</i> genetiniai žymenys.....	12
1.3.1. Glutationo peroksidazė .....	14
1.3.2. Katalazė .....	16
1.3.3. Askorbato peroksidazė.....	18
1.4. Elektromagnetinio lauko poveikis augalams .....	21
2. MEDŽIAGOS IR METODAI .....	23
2.1. Tyrimų objektas .....	23
2.2. Įranga ir medžiagos.....	23
2.3. Metodai .....	24
2.3.1. DNR išskyrimas iš augalo.....	24
2.3.2. DNR švarumo ir koncentracijos nustatymas .....	25
2.3.3. <i>L. minor</i> auginimas paveikus elektromagnetiniu lauku .....	25
2.3.4. Pradmenų kūrimas .....	26
2.3.5. Polimerazės grandininė reakcija .....	27
2.3.6. DNR elektroforezė agarozės gelyje .....	29
2.3.7. DNR išskyrimas iš elektroforezės gelio.....	29
2.3.8. PGR produkto fermentinis valymas.....	30
2.3.9. Statistinė duomenų analizė .....	30
3. TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS .....	31
3.1. Mikrosatelitų žymenų įvertinimas .....	31
3.2. Genetiniai žymenys.....	37
3.2.1. Glutationo peroksidazės žymenų įvertinimas .....	37
3.2.2. Katalazės žymenų įvertinimas .....	42
3.2.3. Askorbato peroksidazės žymenų įvertinimas .....	48
3.3. Genetinių žymenų analizė su EML paveiktais <i>L. minor</i> klonais .....	51
3.4. Rezultatų aptarimas.....	55
IŠVADOS .....	60
SUMMARY .....	61
LITERATŪRA .....	62

## Santrumpos

A – adeninas

Ala – alaninas

AMOVA – molekulinės genetinės įvairovės analizė (angl. Analysis of molecular variance)

APx – askorbato peroksidazė

bp – bazių pora

C – citozinas

cAPx – citozolio askorbato peroksidazė

Cat – katalazė

chlAPx – chloroplastų askorbato peroksidazė

Cys – cisteinas

DNR – deoksiribonukleorūgštis

dNTP – deoksiribonukleotidas

EML – elektromagnetinis laukas

G – guaninas

Gly – glicinas

Gln – glutaminas

GPx – glutationo peroksidazė

GSH – redukuotas glutationas

H<sub>2</sub>O – vanduo

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – vandenilio peroksidas

iRNR – informacinė ribonukleino rūgštis

Lys – lizinas

mAPx – peroksisomų askorbato peroksidazė

mitAPx – mitochondrijos askorbato peroksidazė

NaCl – natrio chloridas

NADPH – nikotinamido adenino dinukleotido fosfato redukuota forma

$\text{NH}_4^+$  – amonio jonas

NJ – kaimynų jungties metodas (angl. Neighbour-joining)

$\text{O}_2$  – deguonis

$\text{O}_2^-$  – superoksidai

PGR – polimerazės grandininė reakcija

Pro – prolinas

ROS – reaktyviosios deguonies formos (angl. Reactive oxygen species)

sAPx – stromų askorbato peroksidazė

SSR – paprastos kartotinės sekos (angl. Simple sequence repeats)

T – timinas

tAPx – tilakoidų askorbato peroksidazė

Trx – tioredoksinas

UV – ultravioletinė spinduliuotė

## ĮVADAS

Mažoji plūdena (*L. minor*) yra viena labiausiai paplitusių augalų rūšių Lietuvoje ir visame pasaulyje. Šis augalas yra nedidelis, laisvai plūduriuoja vandens paviršiuje, paprastos genetinės struktūros ir sugeba prisitaikyti prie įvairių aplinkos sąlygų (An et al., 2018). Dėl šių savybių *L. minor* dažnai pasirenkamas įvairiuose tyrimuose, tokiuose kaip aplinkos poveikis organizmui. Įvairūs tyrimai parodė, kad *L. minor* genomo dydis nėra stabilus dėl santykinai didelio kiekio pasikartojančių sekų, todėl aptinkama didelė genetinė įvairovė tarp populiacijų (Hoeck et al., 2015). Lietuvos *L. minor* laukinė populiacija dar nebuvo tirta, todėl genetinės įvairovės tyrimams galėtų būti panaudojami tiek chloroplasto nekoduojančių sekų fragmentai su mikrosatelitiniais pasikartojimais, tiek baltymus koduojantys genetiniai žymenys (Wani et al., 2014).

Kadangi šis augalas yra vienas iš labiausiai prisitaikančių prie besikeičiančių aplinkos sąlygų, galima būtų spėti, kad tai užtikrina atitinkami reguliacijos mechanizmai, tačiau iki šiol neišku kaip evoliuciškai konservatyvūs genai pakinta priklausomai nuo kintančių aplinkos sąlygų. Nemažai tyrimų atlikta su antioksidantinių savybių turinčiais fermentais, tokiais kaip glutationo peroksidazė (GPx), katalazė (Cat) ir askorbato peroksidazė (APx), nustatyta, kad jų fermentinis aktyvumas dažniausiai padidėja sukėlus augalui oksidacinį stresą (Atamanalp et al., 2019, Varga et al., 2013, Tlidjen et al., 2012), bet iki šiol nėra sukurta metodikų, kurios būtų paremtos šių fermentų genų, kaip genetinių žymenų, panaudojimu vykdant populiacinius ar oksidacinio streso poveikio tyrimus. GPx, Cat ir APx genų sekų kintamumo tyrimai, naudojant iš natūralių buveinių paimtų ir eksperimentinių *L. minor* klonų išskirtą DNR, galėtų būti naudingi ne tik nagrinėjant natūraliai egzistuojančias šių genų alelines formas, bet ir analizuojant variabilias pozicijas genų sekose, kurios išryškėja paveikus testuojamus klonus įvairias stresą sukeliančiais veiksniais, pavyzdžiui, veikiant padidinta elektromagnetine spinduliuote. Identifikuojant sekų pokyčius, tikėtina, kad tai sietina su prisitaikymu prie nepalankių aplinkos sąlygų molekuliniais mechanizmais. Tokių genetinių reiškinių laukinėje populiacijoje bei eksperimentiniuose klonuose, auginamuose jiems nepalankiomis sąlygomis, tyrimai vykdomi siekiant atrinkti jautresius įvairiems išorės veiksniams *L. minor* klonus, tinkamus kuriant unikalią bio-testavimo sistemą.

**Darbo tikslas** – naudojant skirtingus genetinius žymenis įvertinti *L. minor* klonų genetinę įvairovę, būdingą laukinei populiacijai bei nustatyti eksperimentiškai atrinkto klonu, veikiamo padidinta elektromagnetine spinduliuote, genetinį kintamumą vykdant GPx, Cat ir APx genų sekoskaitą.

### **Darbo uždaviniai**

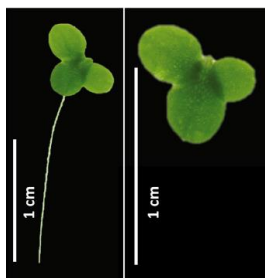
1. Įvertinti chloroplasto nekoduojančių sekų mikrosatelitinių žymenų variabilumą Lietuvos *L. minor* laukinėje populiacijoje.
2. Sukurti pradmenis *L. minor* genų, koduojančių skirtingus GPx, Cat ir APx fragmentus, sekoskaitai bei nustatyti genetinius žymenis, tinkamiausius vidurūšinės genetinės įvairovės tyrimams.
3. Įvertinti elektromagnetinio lauko poveikį genetiniam kintamumui *L. minor* klonuose, panaudojant atrinktus genetinius žymenis.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. *L. minor* kaip tyrimų objektas

Mažoji plūdena (*Lemna minor*) yra vandeninis augalas, kurio visos augalo dalys plūduriuoja vandenyje. Šis augalas priklauso *Lemnaceae* šeimai, kurią sudaro penkios gentys: *Landoltia*, *Lemna*, *Spirodela*, *Wolffia* ir *Wolffiella*. Šiuo metu jau yra identifikuotos 37 rūšys, kurios priklauso šiai šeimai (Les et al., 2002). *Lemna* augalai yra mažesni palyginus su *Spirodela* ir *Landoltia*, bet didžiausia gentis iš *Lemnaceae* šeimos (Wolverton ir McDonald, 1980). Iš šių identifikuotų 37 rūšių daugiausiai tyrimams yra naudojamos *Lemna gibba*, *Lemna minor* ir *Spirodela polyrhiza* (Borisjuk et al., 2015).

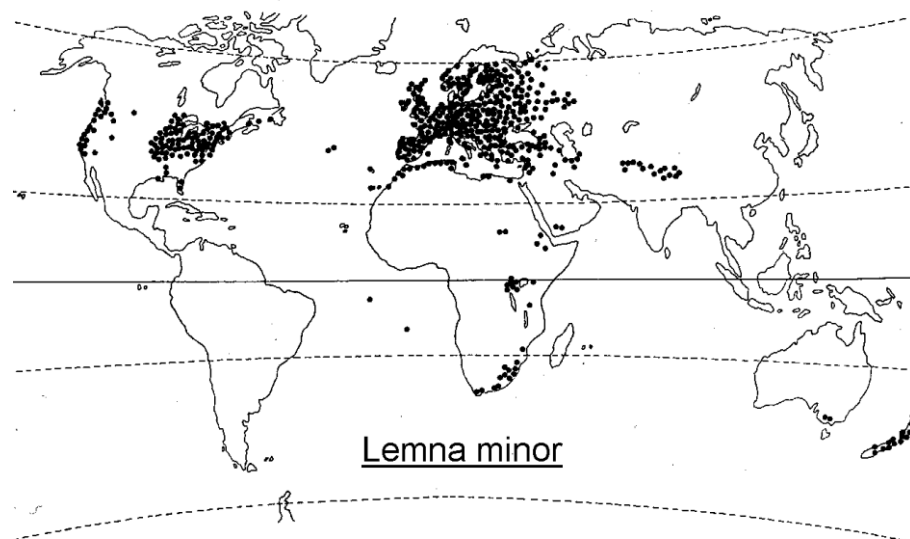
Mažoji plūdena turi nuo vieno iki keturių lapų, prisikabinančių prie šaknies, kuri plūduriuoja vandenyje (1 pav.). Jų šaknys yra 1-2 cm ilgio, o lapai, plūduriuojantys vandens paviršiuje, yra ovalios formos, kurių ilgis 1-8 mm, o plotis 0,6-5 mm (Wolverton ir McDonald, 1980).



**1 Pav.** Mažoji plūdena (*L. minor*)

*L. minor* sugeba prisitaikyti prie įvairių aplinkos sąlygų (Landolt, 1986) ir auga nedideliuose tvenkiniuose, pelkėse ar upėse, kuriuose gausu maistinių medžiagų. Taip pat gali augti tokiuose vandenyse, kuriuose yra didelė N, P ir K koncentracija (Chakrabarti et al., 2018). Mažosios plūdenos turi svarbią ekologinę reikšmę, nes jų produktyvumas yra aukštas, biomasė padvigubėja per 1-2 dienas ir yra gausus baltymų šaltinis šiais augalais mintantiems įvairiems vandens paukščiams, žuvims ar bestuburiams. Taip pat *L. minor* dėka yra sukuriama buveinė mažiems organizmams (Lemon et al., 2001). Šie augalai yra paplitę visame pasaulyje (2 pav.), o jų geografinis pasiskirstymas stipriai koreliuoja su vidurūšine genetinė variacija, net ir esant kloniniam dauginimuisi (Hamrick ir Godt, 1990).





**2 pav.** *L. minor* paplitimas visame pasaulyje (Landolt, 1986).

Nors šie augalai turi žiedus ir gali daugintis lytiniu būdu, bet iki šiol nėra išsamios informacijos apie tokį jų dauginimosi būdą. Žinoma, kad dažniausiai jie dauginasi vegetatyviškai pumpuravimosi būdu, todėl genetiškai yra formuojami klonai, kurie sumažina genetinio variabilumo tikimybę, įvykstančią dėl mejozės (Cheng et al., 2009).

*L. minor* genetinė struktūra yra santykinai paprasta, bei genomui būdingos kartotinės sekos. Dėl šių savybių *L. minor* klonai gali prarasti tam tikrus genus ar įgyti naujų savybių, todėl tiriami įvairiausi klonai ir jų pritaikymas gana platus, pvz. agrokultūroje, laboratoriniuose tyrimuose ar kt. (Hoeck et al., 2015). Patį genomą iš viso sudaro 40 chromosomų ( $2n = 40$ ), kuriuose yra 22 382 baltymus koduojantys genai. Genomas gali varijuoti nuo 323 Mbp iki 760 Mbp dėl santykinai didelio kiekio pasikartojančių sekų. Pavyzdžiui, *L. minor* 5500 klonų genomai yra sudaryti iš 481 Mbp, kuriame 61,5 % - tai pasikartojančios sekos. Šios sekos suskirstytos į retrotranspozonus (31,20 %), DNR transpozonus (5,08 %), tandeminius pasikartojimus (3,91 %) ir kitos jokiai kategorijai nepriskirtos pasikartojančios sekos (21,27 %) (Hoeck et al., 2015).

An su kolegomis atliko *L. minor* genomo struktūrinę analizę ir paaiškėjo, kad vidutiniškai geno ilgis yra 2 738 bp, iš kurių 1 332 bp yra koduojančios sekos. Vidutiniškai gene yra 4,8 egzonų. Įvairios genų funkcijos dažniausiai susijusios su adaptacija prie kintančios aplinkos, biomasės produkcija ar atsaku į abiotinį stresą ir yra labiau išreikštos negu kitas funkcijas atliekantys genai. Pavyzdžiui, minėto *L. minor* klonų 5500 fermentai - tai 422 baltymai, dalyvaujantys kataboliniuose procesuose, bei 2739 kiti baltymai, pasižymintys hidrolaziniu aktyvumu. Biosintezės procesuose, tokiose kaip pirminiuose metaboliniuose procesuose dalyvauja 258 baltymai, DNR metaboliniuose procesuose – 350, angliavandenių metaboliniuose procesuose – 776 baltymai. *L. minor* taip pat pasižymi nemažu

kiekiu baltymų, kurie reaguoja į įvairius stimulus. Pavyzdžiui, į stresą reaguoja 529 baltymai, į abiotinius veiksnius – 86, į ekstraląstelinius stimulus – 19, į endogeninius stimulus – 55. Šių baltymų dėka augalas gali pašalinti tam tikras medžiagas iš nešvaraus vandens ir prisitaikyti prie įvairių klimato sąlygų. Kitas pavyzdys yra *L. minor* 8627 klonas, kurio genomus sudarytas iš 800 Mbp (beveik dvigubai didesnis už *L. minor* 5500), pasižymi galimybe pašalinti azotą ir fosforą iš vandens (An et al., 2018) bei augti esant aukštai  $\text{NH}_4^+$  koncentracijai aplinkoje. Pastebėta, kad tokioje aplinkoje auginamo šio *L. minor* klono antioksidantinių genų ekspresija yra padidėjusi. Pavyzdžiui, suaktyvėjus peroksidazės ar superoksido dismutazės genų veiklai, sumažėja aktyviųjų deguonies formų koncentracija ląstelėje (Wang W et al., 2016).

Dėl išvardintų savybių ir plataus paplitimo *L. minor* dažnai panaudojamos kaip modelinis organizmas įvairiems tyrimams (Hoeck et al., 2015). Pavyzdžiui, dėl sugebėjimo įsisavinti sunkiuosius metalus iš vandens ir prisitaikyti prie skirtingų aplinkos sąlygų, *L. minor* yra puikus organizmas tiriant vandens užterštumo lygį (An et al., 2018).

## 1.2. Mikrosatelitiniai žymenys

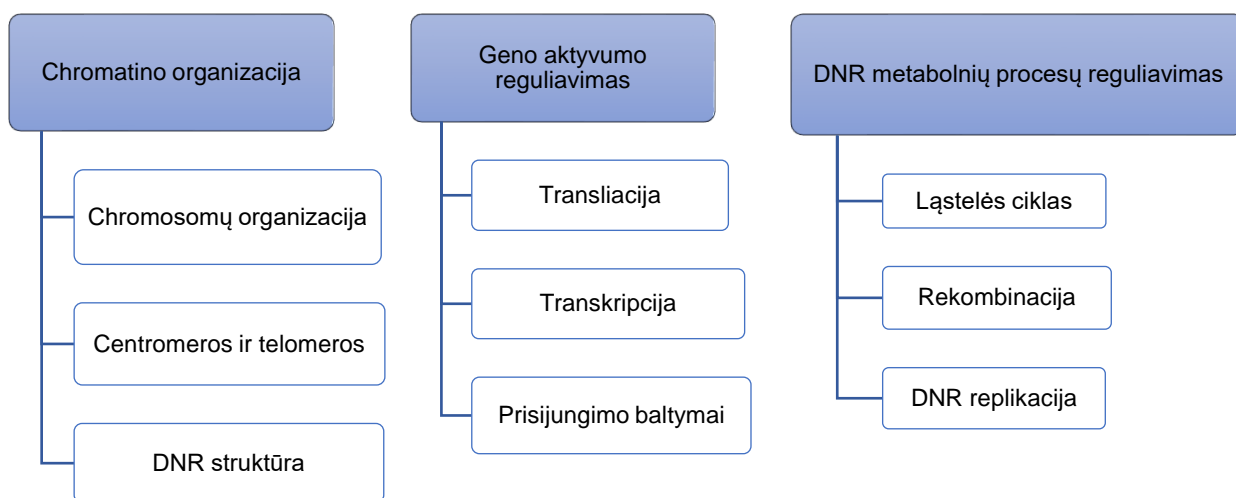
Vykdam tarprūšinės bei vidurūšinės genetinės įvairovės, filogenijos ar populiacinės genetinės struktūros tyrimus, naudojami įvairūs molekuliniai žymenys. Viena iš dažniausiai naudojamų žymenų sričių yra mikrosatelitai, dar kitaip žinomi kaip paprastos pasikartojančios sekos (SSR angl., simple sequence repeats), kurioms būdingi 1-6 nukleotidų pasikartojimai. Šių žymenų privalumas yra tai, kad jie gausūs ir randami visame genome: koduojančiose ir nekoduojančiose srityse. Tokie žymenys identifikuojami išskiriant mikrosatelitiniais pasikartojimais pasižyminčias sekas, apribotas keliais ar keliomis dešimtimis nesikartojančių nukleotidų (Herraez et al., 2005).

Mikrosatelitai gali būti klasifikuojami įvairiais būdais, atsižvelgiant į jų savybes: dydį, pasikartojimų vienetų skaičių arba jų vietą genome. Pagal nukleotidų kiekį pasikartojančiame vienetė, SSR yra klasifikuojami į mono-, di-, tri-, tetra-, penta- ar hekso-nukleotidų pasikartojimus, bet 48 - 67 % mikrosatelitų yra dinukleotidai daugelyje rūšių. Taip pat juos galima skirstyti ir pagal jų lokalizaciją genome: branduolio, mitochondrijos ar chloroplasto mikrosatelitus (Mieh et al., 2013). Šių žymenų motyvų variacija reikšmingai skiriasi tarp organizmų. Dažniausiai pasitaikantis mikrosatelitinis motyvas augaluose yra  $(\text{AT})_n$ , tuo tarpu  $(\text{AC})_n$  daugiausiai aprinkamas žmogaus motyve (Toth et al., 2000). Tam tikram pakartojimų skaičiui tetranukleotido lokusas yra ilgesnis nei dinukleotido. Gyvūnuose dažniausiai pasitaikantis tripleto motyvas yra AGC (40,9 % - 60,9 %), o augaluose yra AAG tripleto motyvas (28,3 % - 42,1 %, *A. thaliana*). Augaluose dažniausiai

pasikartojantis kodonas koduojantis Lys (*Arabidopsis*) ir Arg (cukranendrėse) (Li et al., 2004). Tai yra svarbu, nes pastebėta, kad aminorūgščių pakartojimai skirtinguose baltymuose ar ląstelės lokalizacijose atviro skaitymo rėmeliuose yra neatsitiktinis (Richard ir Dujon, 1997). Pavyzdžiui, CGG, CCG, CAG ir GAA pakartojimų koduojančių (Ala)<sub>n</sub>, (Gly)<sub>n</sub>, (Pro)<sub>n</sub>, (Gln)<sub>n</sub>, (Lys)<sub>n</sub> yra ypač gausu primatų genuose (Borstnik ir Pumpernik, 2002).

Daugybę tyrimų buvo atlikta ir pastebėta, kad mikrosatelitų pasiskirstymas genome taip pat yra neatsitiktinis. Didžiąją jų dalis yra aptinkama nekoduojančiose regionuose ir labai retai – koduojančiuose. Koduojančiuose regionuose yra atitinkamų nukleotidų kompozicija: A/T pasikartojimai yra dažnesni (11,8 % iš 45,425 koduojančių sekų), o G/C pakartojimai aptinkami 0,7 % žmonių koduojančių genų (Olivero et al., 2003), o *Arabidopsis thaliana* egzonuose yra didesnis dažnis GA/CT negu AT pasikartojimų. AC/GT pakartojimai gyvūnuose yra retesni negu augalų genuose (Morgante et al., 2002). Šis žymuo, spėjama, yra labiau susijęs su augaluose dažniau pasitaikančiomis atitinkamomis aminorūgštimis palyginus su gyvūnais (Toth et al., 2000).

Nors mikrosatelitai yra laikomi kaip neutraliais DNR žymenimis, bet pastebėta, kad jų pokyčiai gali paveikti įvairias ląstelės funkcijas (3 pav.). Pavyzdžiui, SSR sumažėjimo ar padidėjimo metu pakinta kai kurių genų aktyvumas, tiesiogiai paveikiamas atsakas į geno produktą ar net sukelia įvairius fenotipinius pokyčius (Li et al., 2004). Taip pat manoma, kad lokusai su ilgesniais pasikartojimų kiekiais pasižymi didesniu prisitaikymo plastiškumu, ypač tuose genomo regionuose, kuriuose yra aukštas rekombinacijos santykis (Samadi et al., 1998).



**3 pav.** Tiriamos mikrosatelitų funkcijos organizme (Li et al., 2004).

SSR mutacijų dažnis yra  $10^{-2} - 10^{-4}$  per generaciją (Mieh et al., 2013). Palyginus su kitomis sritimis, mikrosatelitų mutacijų dažnis yra aukštas dėl įvairių priežasčių, tokių kaip viengrandės DNR praslydimo, dvigrandės DNR rekombinacijos, dvigubos grandies nutraukimo atstatymo ar retrotranspozono. Taip pat DNR polimerazės slinkimas gali sukelti trumpalaikį šablono ir atsirandančios grandinės disociaciją per mikrosatelitų replikaciją (Dong et al., 2013).

SSR su keliais aleliais yra labiausiai tinkami populiacijų genetiniams tyrimams, o variabilesni lokusai dažniausiai naudojami genomo žemėlapių sudarymui. Šie žymenys taip pat naudingi siekiant išryškinti geografiškai izoliuotas populiacijas ar nagrinėjant populiacijos diferenciaciją ir identifikaciją (Abdul – Munner, 2014). Toks platus mikrosatelitų panaudojimas neatsitiktinis: jie yra specifiski priklausomai nuo lokacijos ar rūšies, turi aukštą variabilumą ir juos lengva amplifikuoti naudojant PGR palyginus su kitais žymenimis (Dong et al., 2013).

Nors *L. minor* yra plačiai paplitęs visame pasaulyje ir dažnai naudojamas įvairiems tyrimams, bet iki šiol nėra daug sukurta genetinių žymenų, kurie padėtų tyrinėti jų genetinę įvairovę ar atlikti filogenetinę analizę (Hu et al., 2017). Wani su kolegomis sukonstravo devynis polimorfinius ir 24 monomorfinius naujus *L. minor* chloroplasto mikrosatelitinius žymenis. Polimorfinių žymenų pasikartojimo motyvai buvo (A)<sub>10</sub> arba (T)<sub>10</sub>, o dydžiai svyravo nuo 200 iki 300 bp. Jie buvo patikrinti su 43 laukinės populiacijos *L. minor* mėginiais, surinktais (26) Kašmyre ir (17) Kvebeko srityse, Kanadoje. Mokslininkai Kvebeko srityje aptiko vieną haplotipą ir 11 haplotipų nustatė Kašmyro populiacijoje (Wani et al., 2014).

El-Kholy kartu su kolegomis tyrė *Lemna gibba* ir *L. minor* populiacijų genetinę įvairovę, mėginiai buvo surinkti skirtingose Nilo deltos srityse (Egiptas). Buvo tirta genetinis ryšys tarp nagrinėjamų populiacijų, panaudojant kartotinių paprastų sekų intarpų, kurių pradmenys parodė 100 % polimorfizmą šiame tyrime tirtoms populiacijoms. Gauti rezultatai atskleidė aukštą genetinės įvairovės lygį tarp rūšių ir rūšies viduje, o jų geografinis pasiskirstymas turėjo įtakos tirtų populiacijų genetinei įvairovei (El-Kholy et al., 2015). Tie patys pradmenys buvo panaudoti ir kitame tyrime, kuriame taip pat parodė 100 % polimorfizmą visoms 16 *Lemna* populiacijų, kurias atstovaujantys mėginiai surinkti skirtinguose Vietnamo ir Vakarų Kinijos regionuose (Xue et al., 2012).

### **1.3. *L. minor* genetiniai žymenys**

Nors *L. minor* yra puikus modelinis organizmas, bet trūkstant informacijos apie gentinius žymenis įvairūs tyrimai tampa labai komplikuoti ir riboti. Paskutinius du dešimtmečius DNR sekvenavimui dažniausiai pasirenkamas chloroplasto genomas, nes daugiausiai surinkta apie jį informacijos ir

atlikta viso chloroplasto genomo sekoskaita. Nagrinėjant chloroplasto genomą, buvo pasiūlyti keturi baltymus koduojantys genai (rpoB, rpoCl, rbcL ir matK) ir trys nekoduojančios sritys (atpF-atpH, psbK-psbI ir trnH-psbA) kaip optimalios sritys augalų genotipų analizei. Tačiau tik koduojančios sritys išlaikė amplifikuoto produkto ilgį stabilų. O nekoduojančių sričių amplifikuoti produktai parodė 579-622 bp (atpF-atpH), 185-576 bp (psbK-psbI) ir 286-504 bp (trnH-psbA) ilgio variaciją, kuri dažnai naudojama *Lemna* rūšies identifikavimui (Hollingsworth et al., 2009).

Tik prieš kelis metus buvo atlikta viso *L. minor* branduolio genomo sekoskaita. Iki šiol branduolio DNR pritaikymas yra ribotas, dėl sudėtingo tinkamų fragmentų suradimo. Genomo regionai, kurie būtų panaudoti kaip genetiniai žymenys turi būti variabilūs, bet tuo pačiu turi turėti ir konservatyvius regionus. Konservatyvūs regionai pasitarnauja konstruojant specifinius pradmenis. Ypatingas dėmesys skiriamas intronams, kurių sekų variabilumas suteikia galimybę panaudoti jas įvairiems tyrimams (Appenroth et al., 2013).

1996 metais mokslininkai Cole ir Voskuil tyrė *L. minor* vidurūšinę genetinę įvairovę. Iš viso buvo ištirta 285 augalai, surinkti 11 skirtingų Minesotos vietų. Tyrimams buvo parinkti 16 lokusų iš branduolio genomo sričių. Nors rezultatai parodė, kad šio augalo genotipinė įvairovė panaši į kitų vegetatyviškai besidauginančių augalų, tačiau iš 16 tirtų lokusų 10 buvo polimorfiniai, alelių skaičius vidutiniškai buvo 2,2. Mokslininkai nustatė žemą genų srauto lygį, net ir sugebant šiam augalui laisvai plūduriuoti vandens paviršiuje (Cole ir Voskuil, 1996).

Viena iš branduolio genetinių žymenų grupių, kurios tyrimams skiriama nepakankamai dėmesio yra antioksidantinei sistemai priklausantys fermentų genai. Šių fermentų aktyvumo pokyčiai tiriami dažnai, tiriant organizmo atsaką į nepalankias aplinkos sąlygas. Dažniausiai atitinkamų fermentų aktyvumai padidėja streso sąlygomis, tačiau iki šiol nėra sukurta pradmenų, įgalinančių panaudoti šiuos genus kaip genetinius žymenis. Tokie žymenys galėtų būti panaudojami tokiems tyrimams, kurių metu būtų galima išsiaiškinti ar antioksidantinių fermentų aktyvumo pakitimas yra reguliuojamas genetiniu lygmeniu, pavyzdžiui jungiantis transkripcijos faktoriams prie geno promotoriaus srities.

Streso metu ląstelėse padidėja reaktyviųjų deguonies formų (ROS) koncentracija, į kurią reaguoja organizmo antioksidantinė sistema. ROS susiformuoja ne tik streso sąlygomis, bet ir esant normalioms aplinkos sąlygoms. Pavyzdžiui, superoksidas ( $O_2^-$ ), vandenilio peroksidas ( $H_2O_2$ ) ar alkoholio radikalas susidaro dėl elektronų išmetimo per mitochondrijos kvėpavimo grandinę arba per tam tikras fermentines reakcijas, tokias kaip NADPH oksidacija, monoamino oksido fiziologinės

reakcijos metu (Ren et al., 2017). Tačiau biotinis ir abiotinis stresas stipriai padidina ROS koncentraciją ląstelėse, tokių kaip superoksidų radikalai, hidroksilo radikalai ar vandenilio peroksidai, kurios gali būti toksiškos ląstelėi. Šiuo atveju aerobiniai organizmai turi kelias fermentines ir nefermentines sistemas, kurios neutralizuoja šiuos junginius (Margis et al., 2008). Tokie antioksidantai veikia dviem mechanizmais: suteikdami elektroną laisviesiems radikalams ar pašalindami ROS, reaktyvius azoto junginius. Pavyzdžiui, antioksidantų fermentai tokie, kaip glutationo peroksidazė ar katalazė katalizuoja vandenilio peroksido skilimą dideliu efektyvumu streso sąlygomis. Kai šių fermentų reguliavimo mechanizmai yra sutrikdomi, jie nebeatlieka savo funkcijos ir ląstelėje padidėja ROS produkcijos ekspresija, kuri sukelia oksidacinį stresą ląstelėje (Kivrak et al., 2017).

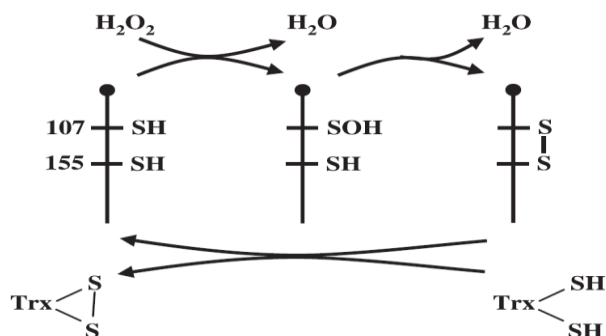
### 1.3.1. Glutationo peroksidazė

Glutaciono peroksidazė (GPx) (EC 1.11.1.9 ir EC 1.11.1.12) yra bendras fermentų šeimos pavadinimas, kurie katalizuoja vandenilio peroksidą ar vykdo organinių hidroperoksidų redukciją iki vandens ar atitinkamų alkoholių. Jos gali būti selenocisteiną ar cisteiną (Cys) turinčios izoformos ir kaip redukuojantį agentą panaudoja glutationą ar tioredoksina (Trx) (Herbette et al., 2007). Iš viso yra žinomos aštuonios GPx izoformos, iš kurių penkios selenocisteiną (GPx1-4 ir GPx6) turinčios izoformos ir trys cisteiną turinčios izoformos (Lei et al., 2016).

Selenocisteino glutaciono peroksidazės izoformos dažniausiai aptinkamos gyvūnuose ar kai kuriuose dumbliuose (Selles et al., 2012). Žinduoliuose yra mažiausiai penkios GPx izoformos, kurios skiriasi savo struktūra, substrato specifiškumu ar audinio pasiskirstymu (Milla et al., 2003). Šios GPx izoformos kaip redukuojantį agentą naudoja glutationą. Glutationas (GSH) yra endogeninis antioksidantas ir svarbi ląstelės apsauga prieš oksidacinį poveikį. GSH reaguoja su laisvaisiais radikalais ląstelėje, sumažindamas ląstelėse esantį vandenilio peroksido kiekį bei aktyvuoja glutaciono peroksidazę (GPx), glutaciono reduktazę ir glutaciono – S – transferazę (Herbette et al., 2007).

Tuo tarpu cisteino peroksidazės izoformos randamos kituose organizmuose, tokiuose kaip bakterijose, grybuose ar augaluose. Augalų GPx klasifikuojama kaip penktoji peroksiredoksinų grupė, nes jie gali redukuoti peroksidą su didesniu efektyvumu, panaudojant tioredoksino sistemą negu glutationą kaip redukuojantį agentą. Trx yra ubikvitininis mažas (12 kDa) fermentas su –CGPC-motyvu aktyviajame centre. Molekuliniu lygmeniu augalų GPx genai yra artimai susiję su gyvūnų fosfolipidine vandenilio peroksido glutaciono peroksidaze, kuri naudoja cisteiną vietoj selenocisteino kataliziniame motyve. Taip pat ištirta, kad tik du Cys (Cys<sup>107</sup> ir Cys<sup>155</sup>) vietoj trijų, sudaro disulfidinį

tiltelį katalitiniame cikle ir su Trx susijusia regeneracija. Šios reakcijos metu vyksta substrato nukleofilinis atakavimas N-gale esančio cisteino ir susijęs su sulfeno rūgšties formavimu šioje liekanoje, išskirdamas vandenį ar alkoholio molekulę kaip šalutinį produktą, priklausomai nuo substrato prigimties (4 pav.). GPx aktyviosios formos perdirbimas dažniausiai vyksta dėl ditolio/disulfido mainų panaudojant Trx (Selles at al., 2012).



**4 pav.** GPx redukcijos supaprastintas mechanizmas vandenilio peroksido redukcija ir GPx regeneracija thioedoksino dėka (Herbette et al., 2007).

Augalų kaip ir gyvūnų GPx šeimos yra pasiskirsčiusios skirtingose lokalizacijose (Margis et al, 2008), tokiose kaip chloroplaste ar mitochondrijoje, bet kai ROS koncentracija ląstelėje padidėjusi, šios peroksidazės buvo randamos ir kitose srityse, tokiose kaip peroksisomose, mitochondrijose, glikosomose, endoplazminiame tinkle (Milla et al, 2003). Atliekant tyrimus, pastebėta, kad GPx iRNR lygio padidėjimas yra priklausomas nuo streso rūšies. Pavyzdžiui, stipriai padidėja patogeno infekcijos (Criqui et al., 1992), mechaninės stimuliacijos (Depege et al., 1998), aukštos druskų ar metalo koncentracijos metu (Sugimoto ir Sakamoto, 1997). Taigi, padidėjusi augalo GPx koncentracija apsaugo ląsteles nuo streso sukkelto oksidacinio poveikio (Milla et al., 2003).

Zhou su kolegomis nagrinėjo augalų GPx genų šeimą ir jų atsaką į stresą. Kaip modelinis organizmas buvo pasirinktas agurkas (*Cucumis sativus*), kuriame identifikavo šešis GPx genus, keturiose iš septynių chromosomų agurko genome. Remiantis *Arabidopsis*, *Oryza* ir *Sativa* organizmų GPx genų filogenetine analize, visus GPx genus suskirstė į penkias grupes. O genų struktūros analizė atskleidė konservatyvų šių genų egzono ir introno struktūros modelį. Visi tirti GPx genai turėjo penkis intronus, išskyrus vieną GPx geną, kuris turėjo tik keturis intronus. O visų GPx egzonų ilgiai buvo panašūs tarp visų tirtų genų. Tame pačiame tyrime buvo nagrinėjama GPx genų transkripcinis reguliavimas ir promotorių srityse nemažai atrasta cis veikiančių reguliavimo elementų, kuriuos suskirstė į tris grupes. Kiekvienas GPx genas turėjo bent vieną cis elementą, o į stresą reaguojantys buvo atrasti šeši skirtingi cis elementai (Zhou et al., 2018).

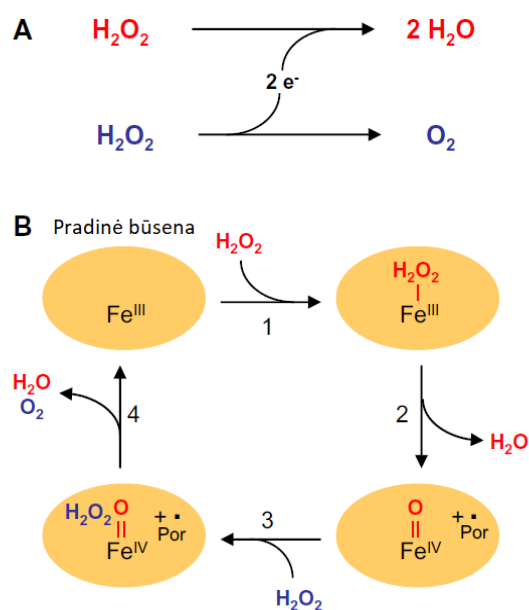
Nors *L. minor* GPx genai iki šiol nėra ištirti, bet atlikta nemažai tyrimų, susijusių su stresu ir GPx fermentų aktyvumo pokyčiais. Pavyzdžiui, Tjidjen su kolegomis tyrė oksidacinio streso poveikį *L. minor* ir kaip biomolekulinį žymenį naudojo GPx fermentą. Tyrimo metu *L. minor* buvo paveikta herbicidu diklofopo metilu, skirtingomis koncentracijomis 17,5 µg/L, 35 µg/L, 70 µg/L. Po 21 dienos, gauti rezultatai parodė, kad GPx aktyvumas yra tiesiogiai priklausomas nuo auginimo su herbicidu trukmės ir jo koncentracijos (Tjidjen et al., 2012). Kita mokslininkų grupė augino *L. minor* 21 dieną, paveiktus biopesticidais skirtingomis koncentracijomis (4 µL/L, 80 µL/L, 120 µL/L). Lyginant su kontrole, GPx aktyvumas taip pat reikšmingai didėjo didėjant biopesticidų koncentracijai ir auginimo trukmei (Atamanalp et al., 2019).

Apie augalų GPx geno polimorfizmą taip pat nėra informacijos, bet nemažai tyrimų buvo atlikta su žmonių ląstelinių GPx1. Tokio tipo tyrimuose dažniausiai stebima pacientų su tam tikra liga genų polimorfizmo pokytis lyginant su sveikais žmonėmis. Pavyzdžiui, tiriant žmonių GPx1 geną, kuris lokalizuojasi žmogaus 3p21 chromosomoje, buvo pastebėta heterozigotiškumo praradimas ir aptinkamas tik vienas iš dviejų alelinis variantas pacientams, sergantiems plaučių, krūties, galvos, kaklo ar storosios žarnos vėžiu. Praradus heterozigotiškumą, reikšmingai sumažėja GPx1 fermento aktyvumas. Taip pat yra gerai ištirtas to paties geno Pro198Leu polimorfizmas. Nustatyta, kad krūties vėžio ląstelėse dažniausiai randamas Leu (CTC) alelis, kuris yra mažiau jautrus selenui negu Pro (CCC) alelis. Kadangi žmonių GPx1 yra nuo selenocisteino priklausantis, todėl sumažėjus seleno jautrumui, sumažėja GPx1 fermento aktyvumas (Lubos et al., 2011).

### 1.3.2. Katalazė

Katalazė (E.C.1.11.1.6; vandenilio peroksido oksireduktazė; Cat) yra vienas iš labiausiai paplitusių antioksidantinių fermentų, apsaugančių organizmą nuo oksidacinės žalos, katalizuodama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> skilimą į H<sub>2</sub>O ir O<sub>2</sub>. Šis fermentas yra tetrameras, sudarytas iš keturių polipeptidinių grandinių ir turintis hemo grupę (Sun et al., 2018). Nors nėra tiksliai aprašyta reakcijos mechanizmo, bet įvairūs tyrimo rezultatai parodė, kad O<sub>2</sub> gaunama iš vienos H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> molekulės (Kato et al., 2004), o kita H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> molekulė yra redukuojama iki dviejų vandens molekulių (5A pav.). Spėjama, kad vyksta keturių etapų redokso reakcija (5B pav.), dalyvaujant Fe<sup>III</sup> geležies jonams, kurie yra fermento hemo grupės aktyviajame centre. Kai vandenilio peroksidas patenka į aktyvųjį centrą, jis sąveikauja su Asn148 ir His75 aminorūgštimis, kurios sukelia protono perkėlimą tarp deguonies atomų, suformuodamos Fe<sup>IV</sup>=O junginį ir atlaisvinama naujai susiformavusi vandens molekulė. Fe<sup>IV</sup>=O reaguoja su antrąja vandenilio peroksido molekule, kurios metu atstatoma Fe<sup>III</sup> ir išskiriama viena vandens ir deguonies molekulė (Mhamdi et al., 2010).





**5 pav.** Supaprastintas katalazės veikimo mechanizmas. A – vandenilio peroksido vartimo į vandenį ir deguonį reakcija. B – Keturių etapų redokso reakcija. Romėniški skaičiai indikuoja hemo geležies oksidacinę būseną,  $\text{Por}^{\cdot+}$  indikuoja porfirino katijono radikalą. Skirtingomis spalvomis pažymėtos iš kurio vandenilio peroksido susidaro vanduo ir iš kurio susidaro deguonis (Mhamdi et al., 2010).

Įvairūs tyrimai parodė, kad Cat dažniausiai aptinkama peroksisomose, glikosomose, citoplazmoje ir tik nedidelis kiekis randamas mitochondrijoje (Song X H, 2007). Dažniausiai gyvūnuose, įskaitant žinduolius, Cat genas yra tik vienas, o augalai įprastai turi tris šios šeimos genus. Pavyzdžiui, *Arabidopsis thaliana* turi tris Cat genus, iš kurių du yra pirmoje chromosomoje (CAT1, CAT3), o trečiasis Cat genas yra ketvirtoje chromosomoje (CAT2) (Frugoli et al., 1996), tačiau visi transliacijos produktai sudaryti iš 492 aminorūgščių su dideliu panašumu tarp sekų (Mhamdi et al., 2010).

Šių genų nomenklatūra skiriasi tarp augalų rūšių, todėl jos buvo suklasifikuotos į tris klases (1 Lentelė). Pirmai klasei priklausančios Cat yra dažniausiai ekspresuojamos fotosintetiniuose audiniuose, o antros klasės Cat yra susijusios su vakuolės audiniais ir trečiajai klasei priklausančios Cat dažniausiai aptinkamos sėklose bei reproduktiviniuose audiniuose. Nors šios klasės išskirstymas nėra tikslus tarp rūšių, bet jų funkcija yra labai konservatyvi (Mhamdi et al., 2010).

**1 Lentelė.** Katalazių klasifikacija skirtingose rūšyse (Willekens et al., 1995).

	1 Klasė	2 Klasė	3 Klasė
<i>Tobacco</i>	Cat1	Cat2	Cat3
<i>Arabidopsis</i>	CAT2	CAT3	CAT1
<i>Maize</i>	Cat2	Cat3	Cat1
<i>Pumpkin</i>	cat2	cat3	cat1
<i>Rice</i>	CatC	CatA	CatB

Cat geno ekspresijos lygis yra priklausomas nuo biotinio ir abiotinio streso. Dažniausiai streso metu Cat aktyvumas padidėja, bet kartais dėl atitinkamų priešasčių gali ir sumažėti. Tada labiau suaktyvėja kitų antioksidantinių fermentų aktyvumas, tokių kaip GPx ar tioredoksino peroksidazės. Tai parodo, kad antioksidantinių fermentų aktyvumas yra priklausomas ne tik nuo ROS koncentracijos ląstelėse, bet ir nuo kitų fermentų aktyvumo. Taip ląstelė turi kelis apsaugos mechanizmus nuo ROS (Sun et al., 2018).

Nemažai yra atlikta tyrimų su Cat, panaudojant *L. minor* kaip modelinį organizmą. Deja dar nėra sukurta pradmenų, galinančių panaudoti šį geną kaip genetinį žymenį, todėl visi tyrimai susiję tik su Cat fermento aktyvumo pokyčiais streso sąlygomis. Pavyzdžiui, vieno tyrimo metu mažoji plūdena buvo paveikta gyvsidabriu, kadmiu ir chromu, kurių koncentracijos kilo nuo 0,02 iki 20 mg/L. Gauti rezultatai parodė, kad Cat aktyvumas reikšmingai pradėjo didėti gyvsidabrio, kadmio ir chromo atveju, kai jų koncentracija pasiekė 0,2 mg/L (Varga et al., 2013). Kitame tyrime sukėlus augalui stresą, Cat aktyvumas ne visada padidėjo. Pavyzdžiui, Wang su kolegomis auginio *L. minor* NH<sub>4</sub><sup>+</sup> terpėje vietoje azoto, kurio koncentracija buvo 84 mg/L ir 840 mg/L. Mokslininkai nustatė, kad Cat aktyvumas reikšmingai mažėja didėjant NH<sub>4</sub><sup>+</sup> koncentracijai, lyginant su kontrole (Wang et al., 2016).

Iki šiol vykdant Cat genų tyrimus, susijusius su oksidaciniu stresu, dažniausiai tiriama žmonių Cat geno raiška. Pavyzdžiui, nagrinėjant -262T>C polimorfizmą žmogaus Cat gene, buvo iširta 216 Rusijos 1 tipo diabeto pacientai. Nustatyta, kad -262TT Cat genotipas lėmė didesnę geno aktyvumą, kuris reikšmingai skyrėsi nuo -262CC genotipo, būdingo kontrolinei grupei (Chistiakov et al., 2006). O promotoriaus srityje netoli transliacijos iniciacijos vietos, esantis polimorfizmas Cat -21A/T, neturi įtakos katalazės aktyvumui, o Hiragi su kolegomis nustatė reikšmingus šios srities pokyčius tarp pasirinktų trijų Brazilijos populiacijos grupių (Hiragi et al., 2011).

### 1.3.3. Askorbato peroksidazė

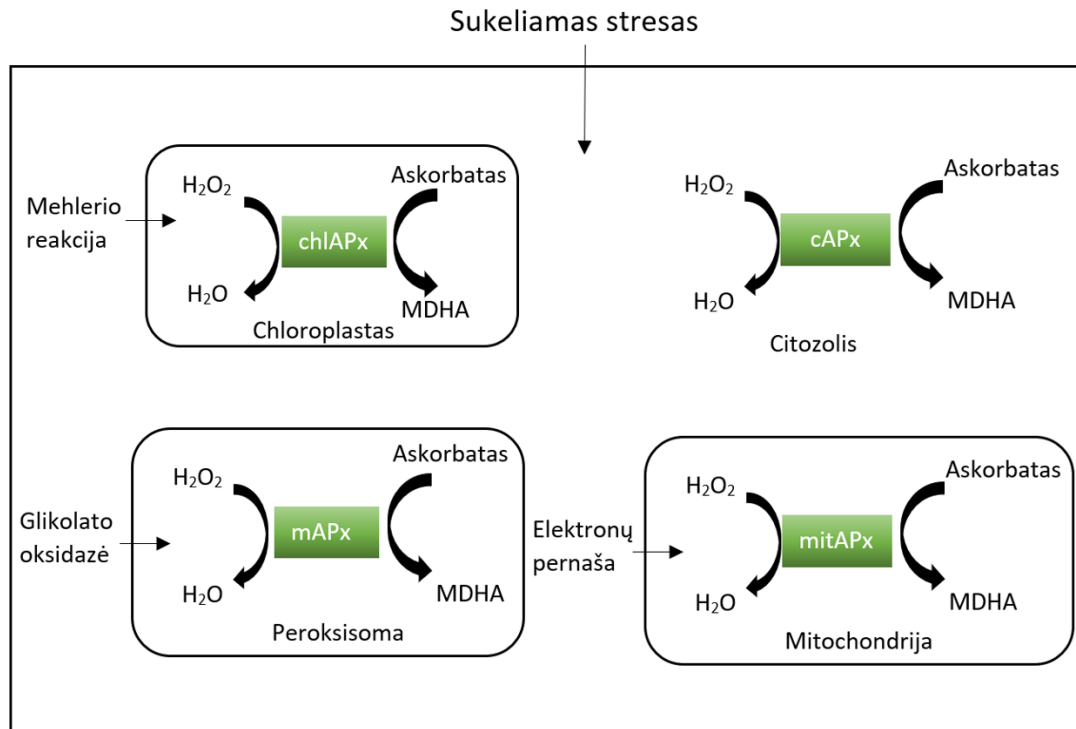
Askorbato peroksidazė (APx, EC 1.11.1.11) yra viena iš pagrindinių fermentų, kuri detoksikuoja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> augaluose. Šis APx genas priklauso multigenų ir peroksidazių šeimai, turinčiai

hemo grupę ir galinčiai katalizuoti nuo  $H_2O_2$  priklausančią įvairių organinių molekulių oksidaciją (Lazzarotto et al., 2011).

Įvairūs genominiai tyrimai atskleidė didelę APx įvairovę augalų karalystėje, kuri svarbi ne tik  $H_2O_2$  mažinimui ląstelėse, bet taip pat ir augimo reguliacijai. Skirtingos APx izoformos yra klasifikuojamos pagal jų lokalizaciją ląstelėse. Pavyzdžiui, APx aptinkamos citozolyje (cAPx), mitochondrijose (mitAPx), chloroplastuose (chlAPx), chloroplastų stromoje (sAPx), tilakoiduose (tAPx), peroksisomose (mAPx) (Teixeira et al., 2006). Šių izofermentų skaičius yra skirtingas įvairiuose augalų rūšyse. Pavyzdžiui, *Arabidopsis thaliana* turi devynias APx izoformas, kurios yra pasiskirstę skirtingose ląstelės lokalizacijose, tokiose kaip citozolis, mitochondrijos ar chloroplastai (Narenda et al., 2006). Kitame augalo modeliniame organizme, tokiaime kaip *Oryza sativa*, APx genų šeima sudaryta iš aštuonių narių, kurie yra randami citozolyje, peroksisomoje, chloroplastų stromoje ar tilakoiduose (Teixeira et al., 2006).

APx izoformos skiriasi viena nuo kitos ne tik dėl lokalizacijos, bet ir dėl struktūrinių ar kinetinių savybių, tokių kaip molekulinis svoris, optimalus pH, stabilumas, katalitinis santykis ar substrato afiniškumas. APx katalitinis aktyvumas yra priklausomas nuo geležies, esančios hemo grupėje ir jos trūkumas sumažina šio fermento aktyvumą. Panašus poveikis pasireiškia, ypač cAPx, sumažėjus askorbato koncentracijai. Esant pakankamam askorbato kiekiui, APx efektyviai apsaugo augalus nuo oksidacinės žalos (Shigeoka et al., 2002), o esant mažesnei nei 20  $\mu M$  askorbato koncentracijai APx pasidaro nebeaktyvus. Taip atsitinka todėl, kad APx dalyvauja askorbato – glutationo cikle ir askorbatą panaudoja kaip elektronų donorą katalizuojant  $H_2O_2$  į  $H_2O$  (Correa-Aragunde et al., 2013).

ROS lygio reguliavimas pagal APx yra priklausomas nuo izofermento lokalizacijos ląstelėse (Caverzan et al., 2012). Dažniausiai visų APx izoformų, kaip ir Cat ar GPx, aktyvumas padidėja sukėlus organizmui biotinį (patogeno atakavimas, fizinė žala) ar abiotinį (UV radiacija, oksidacinis stresas) stresą (6 pav.). Priklausomai nuo APx lokalizacijos, augalo ir streso rūšies, skirtingai reaguojama į stresą. Pavyzdžiui, *Arabidopsis thaliana* cAPx transkripcijos lygis padidėja keturis kartus sukėlus sausrą augalui, o atsigaunant nuo sausros sukulto streso cAPx aktyvumas gali padidėti net ir 15 kartų. Sunkieji metalai taip pat sukelia stresą augalui, bet buvo pastebėta, kad paveikus *Pisum sativum L.* kadmiu fermentinė ir nefermentinė antioksidacinė apsaugos sistema suaktyvėjo, o APx aktyvumas ir jo transkripcija reikšmingai nepasikeitė (Romero-Puertas et al., 2007). Taip pat pastebėta, kad daugelyje augalų rūšių chlAPx ir mAPx efektyviai detoksikuoja  $H_2O_2$  normaliomis ir streso sąlygomis, o cAPx dažniausiai mažina  $H_2O_2$  koncentraciją tik streso metu (Mittler ir Zilinskas, 1994).



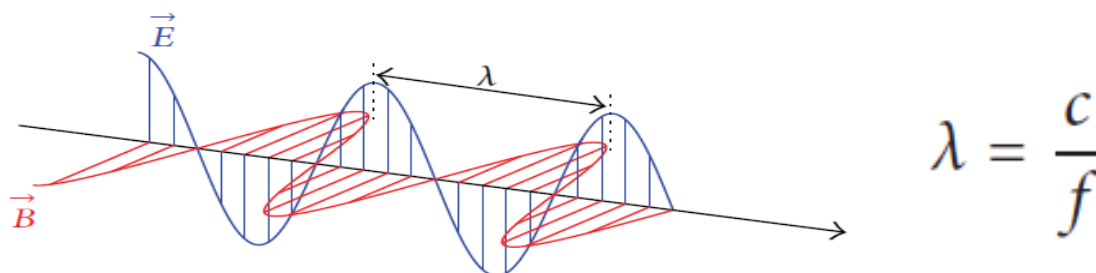
**6 pav.** APx izoformos ir ROS pertekliaus eliminavimas skirtinguose ląstelės kompartmentuose. MDHA – monodehidroaskorbatas. – gal taip pat reikia autoriaus (Caverzan et al., 2012).

Nors nėra atliktų tyrimų, susijusių APx genu *L. minor* organizme, bet mokslininkai tyrinėjo APx fermento aktyvumo pokyčius, sukėlus augalui atitinkamą stresą. Pavyzdžiui, 2010 metais buvo atliktas tyrimas su *L. minor*, sukėlus osmotinio slėgio stresą. Lyginant pokytį tarp kontrolių ir 15 dienų paveiktų osmotiniais agentais augalų, APx aktyvumas reikšmingai pasikeitė: NaCl (50 mM) ir manitolio (100 mM) atveju padidėjo 45 %, manitolio (50 mM) padidėjo 32 %, o polietilen glikolio (50 mM) atveju pakilo net 106 % (Radic ir Pevalek-Kozlina, 2010). Taip pat Tlidjen su kolegomis augino mažąją plūdeną streso sąlygomis, kai į vandenį įdėjo diklofopo metilo įvairiomis koncentracijomis: 0 (kontrolė), 17,5 µg/L, 35 µg/L, 70 µg/L. Po 7 dienų buvo pastebėtas ryškus APx fermento suaktyvėjimas, palyginus su kontrole. Kuo ilgiau *L. minor* buvo laikoma streso sąlygomis ir kuo didesnė diklofopo metilo koncentracija, tuo labiau didėjo APx aktyvumas (Tlidjen et al., 2012). Wang su kolegomis taip pat nustatinėjo antioksidantinių fermentų aktyvumo pokyčius streso sąlygomis. Į *L. minor* auginimo terpę vietoj azoto įdėjo NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, kurio koncentracija buvo 84 mg/L ir 840 mg/L. Mokslininkai pastebėjo, kad APx aktyvumas buvo didžiausias esant didžiausiai 840 mg/L koncentracijai, o žemiausias aktyvumas, lyginant ir su kontrole, buvo kai NH<sub>4</sub><sup>+</sup> koncentracija siekė 84 mg/L (Wang et al., 2016).

## 1.4. Elektromagnetinio lauko poveikis augalams

Oksidacinį stresą organizmui gali sukelti ir elektromagnetinis laukas (EML), kurio foninis lygis natūralioje aplinkoje žemas, o poveikis – beveik nepastebimas. Įvairaus dažnio EML atsiranda dėl žmonių veiklos ir kasmet didėja dėl naudojamų bevielio ryšio technologijų, įskaitant mobiliuosius telefonus, Wi-Fi ir kitus susijusius įrenginius. Kadangi gyvenamojoje aplinkoje nejonizuojančią spinduliuotę sklaidžiančių prietaisų ženkliai daugėja, o įvairūs organizmai nėra tobuli dialektrikai, todėl vis daugiau dėmesio skiriama jų poveikiui, priklausomai nuo EML amplitudės, dažnio, bangų ilgio, audinio tankio ar kitų parametru (Vian et al., 2016).

Elektromagnetinė spinduliuotė charakterizuojama elektrinio lauko stipriu  $E$  (V/m), magnetinio lauko stipriu  $H$  (A/m), elektromagnetinių bangų galios srautu ( $W/m^2$ ), dažniu (Hz) bei bangos ilgiu (m), o šios savybės išreiškiamos per lygtį (7 pav.). Klasikinė EML teorija paremta Maksvelo lygtimis. Šios lygtys aprašo bangų sklidimą įvairiose terpėse, tačiau jas išspręsti biologinių objektų atvejais yra labai sudėtinga (Vian et al., 2016).



**7 pav.** Elektromagnetinis laukas. Kairėje – elektromagnetinio lauko bangų schema, kai  $E$  – elektrinis laukas,  $B$  – magnetinis laukas,  $\lambda$  – atstumas tarp bangos viršūnių (bangos ilgis, m); Dešinėje – lygtis,  $f$  – bangos dažnis (Hz arba 1/s),  $c$  – bangos sklidimo greitis (m/s) (Vian et al, 2016).

Sąveika tarp gyvosios materijos ir elektromagnetinės spinduliuotės gali padidinti audinio temperatūrą, taip sukeldamas tam tikrus metabolinius atsakus. Siekiant išsiaiškinti kokį poveikį turi EML žmogaus sveikatai, didžioji tyrimų dalis atliekama su gyvūnais ir augalais. Tam tikrais atvejais augalai turi ir pranašumą prieš gyvūnus. Pavyzdžiui, augalų stabili vieta suteikia galimybę nuolatos veikti EML, dauginasi vegetatyviškai, bei lengviau aptikti organizmo pokyčius, kurie padėtų suprasti koks yra EML poveikis organizmui (Kvirak et al, 2017).

2005 metais buvo atliktas tyrimas, kurio metu tyrė EML poveikį gyviesiems organizmams. Kaip modelinis organizmas buvo pasirinktas *L. minor* ir paveiktas skirtingo dažnio EML (400, 900, 1900 MHz). Gauti rezultatai parodė, kad augalų, paveiktų 2 val. 23 V/m 900 MHz EML, augimas stipriai sumažėjo, o 400 MHz neturėjo jokie poveikio augalams. Paveikus augalus ilgiau (14 val.)

silpnesnio stiprumo (10 V/m) taip pat neigiamai paveikė mažųjų plūdenų augimą. Tirtos peroksidazės aktyvumas lyginant su kontrole padidėjo 41 %, veikiant 2 val. 41 V/m 900 MHz EML (Tkalec et al., 2005).

Nors žinoma, kad aukšto dažnio EML poveikis augalams yra įvairus, pradedant nuo DNR žalos ir su jais susijusiais mechanizmais iki metabolinių procesų pokyčiu ląstelėse. Tokie pokyčiai ląstelėse turi neigiamos įtakos organizmui (Vian et al., 2016). Taip pat neigiamą įtaką gali turėti ir veikiant augalus žemesnio dažnio EML ilgąjį laikotarpį, tačiau iki šiol apie tokius tyrimus nėra duomenų. Turint atitinkamus genetinius žymenis, būtų galima nustatyti ar kasdieniniai įrenginiai, spinduliuojantys EML turi poveikį organizmams.

## 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1. Tyrimų objektas

Tyrimai buvo atliekami Gamtos tyrimų centre Molekulinės ekologijos laboratorijoje. Šiame darbe buvo panaudota 12 mažųjų plūdenų (*L. minor*) laukinės populiacijos mėginių, surinktų iš natūralių populiacijų Neries ir Nemuno upių Molekulinės ekologijos laboratorijos darbuotojų (2017 m.). Atstumas tarp rinktų populiacijų yra 95,3 km. Gauti klonai įvardinti:

- Neries upė, Vilnius 54° 45' 48.25", 25° 21' 14.53" - S1, S2, S3, S4, S7, S9, S10, S11, S12;
- Nemuno upė, Kaunas 54° 53' 39.65", 23° 53' 4.52" – A, B, C, D.

Analizuojant mikrosatelitinius žymenis, laukinės populiacijos *L. minor* mėginiai taip pat buvo panaudoti iš Nemuno ir Neries upių, surinktų Molekulinės ekologijos laboratorijos darbuotojų (2016 m.). Gauti klonai įvardinti:

- Neries upė, Vilnius 54° 45' 48.25", 25° 21' 14.53" - 22, 23, 24, 25;
- Nemuno upė, Kaunas 54° 53' 39.65", 23° 53' 4.52" – 15, 16, 17, 18.

Augalai iš gniužulo buvo sterilinti ir įvesti į *in vitro* kultūrą. Klonai auginami skystoje Steinbergo terpėje (ISO 20079), persodinami kas 7 – 10 dienų į naują terpę. Auginimas vyksta kontroliuojamose sąlygose prie 25-26°C temperatūros, 16/8 val. šviesos ir tamsos periodu, apšvietimas OSRAM L 36/77 Fluora lempomis, šviesos intensyvumas 90-100  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

### 2.2. Įranga ir medžiagos

#### Laboratorinė įranga ir priemonės:

- Vienkartinės latekso pirštinės,
- Sterilūs mėgintuvėliai (0,2 ml, 0,5 ml),
- Automatinės pipetės „Eppendorf Research“ (0,5-10  $\mu\text{l}$ , 2-20  $\mu\text{l}$ , 20-200  $\mu\text{l}$ ),
- Sterilūs vienkartiniai antgaliai (10  $\mu\text{l}$ , 20  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$ , 1000  $\mu\text{l}$ ),
- Matavimo cilindras 100 ml,
- Analitinės svarstyklės,
- Distiliuotas vanduo,
- 70 % etanolis,
- Purtyklė „Vortex-T Genie 2“ (Scientific Industries, JAV),
- Spektrofotometras „NanoDrop® ND-1000“ (Thermo Scientific, JAV),
- Termocikleris „Eppendorf Mastercycler“ (Eppendorf AG, Vokietija),

- Elektroforezės energijos valdymo blokas „GE Healthcare EPS 301“ (GE Healthcare Life Sciences, JAV),
- UV transiluminatorius „BioDocAnalyse“ (Herolab GmbH, Vokietija),
- Centrifuga „Heraeus Multifuge 3L“.

#### **Reagentai:**

- Steinbergo terpė,
- DNR išskyrimo rinkinys „Dneasy Plant Mini Kit“ (QIAGEN, Vokietija),
- DNR išskyrimo iš elektroforezės gelio rinkinys „PureLink Quick Gel Extraction Kit“ (Thermo Fisher Scientific, Lietuva),
- Skystas azotas,
- Oligonukleotidiniai PGR Pradmenys (Thermo Fisher Scientific, Lietuva),
- PGR komponentų mišinys „DreamTaq PCR Master Mix (2x)“ (Thermo Fisher Scientific, Lietuva),
- DNR ilgio standartas „GeneRuler DNA ladder Mix“ (Thermo Fisher Scientific, Lietuva),
- Bromfenolio mėlis „6X DNA loading dye“ (Thermo Fisher Scientific, Lietuva),
- Agarozės milteliai „SeaKem®, LE Agarose“ (Lonza Group Ltd, JAV),
- 1xTAE buferis,
- Etidžio bromidas (10 mg/ml) (Thermo Fisher Scientific, Lietuva),
- Šarminė fosfatazė „FastAp“ (Thermo Fisher Scientific, Lietuva),
- Egzonukleazė I (Thermo Fisher Scientific, Lietuva).

## **2.3. Metodai**

### **2.3.1. DNR išskyrimas iš augalo**

*L. minor* DNR išskyrimui buvo panaudotas rinkinys „Dneasy Plant Mini Kit“.

DNR išskyrimo iš augalo atlikimo tvarka:

1. Mėginys ( $\leq 100$  mg drėgno augalo svorio) suardomas užpilant skystu azotu ir su lazdele sutrinama iki vientisos masės.
2. Į sutrintą mėginį įpilama 400  $\mu$ L AP1 buferio ir 4  $\mu$ L Rnazės A. Sumaišomas ir inkubuojamas 10 min, 65 °C.
3. Įdedama 130  $\mu$ l P3 buferio, sumaišoma ir inkubuojama 5 min lede.
4. Lizatas centrifuguojamas 10 min, 12 800 rpm.



5. Pipete lizatas įpilamas į „QIAshredder“ kolonėlę, įdėtą į 1,5 ml surinkimo mėgintuvėlį. Centrifuguojama 2 min, 12 800 rpm.
6. Pratekėjęs skystis perkeliamas į naują 1,5 mL mėgintuvėlį, nepaimant nuosėdų. Įpilama 1,5 tūrio AW1 buferio ir sumaišoma pipete.
7. Perkeliama 650 μl mišinio į „Dneasy Mini“ kolonėlę, įdėtą į 2 ml surinkimo mėgintuvėlį. Centrifuguojama 1 min, 12 800 rpm. Pratekėjęs skystis išpilamas ir veiksmas pakartojamas su likusiu mėginiu.
8. Kolonėlė patalpinama į naują 2 ml surinkimo mėgintuvėlį. Įpilama 500 μl AW2 buferio ir centrifuguojama 1 min, 12 800 rpm. Išpilamas pratekėjęs skystis.
9. Įpilamas dar 500 μl AW2 buferio ir centrifuguojama 2 min, 12 800 rpm.
10. Kolonėlė perkeliama į naują 1,5 ml mėgintuvėlį.
11. Įdedama 100 μl AE buferio ir inkubuojama 5 min, kambario temperatūroje (15-25 °C). Centrifuguojama 2 min, 12 800 rpm.

### **2.3.2. DNR švarumo ir koncentracijos nustatymas**

Išskirto augalo DNR koncentracija ir švarumas nustatomas „NanoDrop ND-1000“ spektrofotometro pagalba. DNR mėginiai tiriami 260 nm ir 280 nm ilgio bangomis. Optinių tankių A260/A280 santykis rodo DNR mėginių švarumą. Jei jis svyruoja tarp 1,8 – 2,0, mėginyje yra mažai baltymų priemaišų, todėl tinkamas tolimesniems tyrimams.

Matavimo metu imama 1-2 μl DNR. Nustačius kiekvieno DNR mėginio koncentraciją, paruošiamas DNR tirpalas, atskiedžiant distiliuotu vandeniu iki 5 ng/μl DNR koncentracijos. Gauti ir atskiesti DNR mėginiai laikomi -20 °C temperatūroje.

### **2.3.3. *L. minor* auginimas paveikus elektromagnetiniu lauku**

Bandymui *L. minor* S2 viena kolonija (3 gniūžulai) auginama 15 ml Steinbergo terpėje, Petri lėkštelėje. Kas septynias dienas augalai persodinami į naują terpę. Po 2 savaičių trukmės medžiaga fiksuojama, paliekant iš kiekvienos varianto lėkštelės po vieną gniūžulą bandymo tęsiniui, perkeliant į naują terpę. Apšvietimo sąlygos ~70-80 μmol. Temperatūra 25°C±2°C. Kiekvienam bandymo variantui imamos po 3 Petri lėkštelės, kurios talpinamos ant ričių veikiant augalus EML tiesiogiai, mėginiai koduojami EML-T\*, o nuotolinį EML poveikį (augalai auginami Petri lėkštelėse 1,5 m atstumu nuo EML generuojančių ričių) patiriantys klonai koduojami EML-N\*. Siekiant sukurti EML sąlygas *L. minor* auginimui buvo panaudotas generatorius, kurio dažnis buvo 50 Hz (8 pav.).



**8 pav.** *L. minor* auginimas ant įrangos, sukeliančios EML. *L. minor* mėginiai auginami ant ritės (10 cm skersmens ir 10 cm aukščio).

Bandymas truko 18 savaičių, keičiant eksperimento sąlygas. Kiekvieną savaitę augalai persodinami. EML poveikiui *L. minor* klonams parinktos eksperimento sąlygos aprašomos 2 Lentelėje. Duomenys analizuojami po 3, 6, 8, 10, 14 ir 18 savaičių. Po kiekvienos savaitės, sveriamas augalo žalia masė, o gniužulų skaičius ir plotas matuojamas „ImageJ“ programa. DNR analizei medžiaga fiksuojama  $-20^{\circ}\text{C}$  temperatūroje.

**2 Lentelė.** Eksperimento sąlygos

Bandymo trukmė	EML indukcija	Srovės stiprumas
1 – 3 savaitė	1 $\mu\text{T}$	1,2 mA
4 – 11 savaitė	2 $\mu\text{T}$	2,4 mA
12 – 18 savaitė	300 $\mu\text{T}$	0,4 A

### 2.3.4. Pradmenų kūrimas

Siekiant gauti specifinį DNR fragmentą buvo parinkti atitinkami pradmenys. Wani su kolegomis (Wani et al., 2014) sukūrė devynias pradmenų poras, leidžiančias pagausinti bei analizuoti polimorfinius mikrosatelitų lokusus, iš kurių penki buvo panaudoti ir šiame tyrime, o L4 pradmenys buvo sukurti Molekulinės ekologijos laboratorijos darbuotojų (3 Lentelė) (Wani et al., 2014).

**3 Lentelė.** *L. minor* chloroplasto mikrosatelitų pradmenys

Mikrosatelitų pradmenys	Pradmens pav.	Pasikartojantis motyvas	I pradmuo, (5'→3', L)	II pradmuo, (5'→3', R)	Produkto dydis (bp)
	<b>L4</b>	(T) <sub>12</sub>	ACAGACCTCCAACATATAATCG	TCTAGCATTCCCTCACGCTT	291
<b>L7</b>	(A) <sub>11</sub>	CATTTTCCCCACACTTGCT	TGCATCCCAAACAATTTTCA	282	
<b>L14</b>	(A) <sub>10</sub>	TTGTTCTCATGATCGGTCAAA	GCCTTACCATGGCGTACTC	299	
<b>L16</b>	(T) <sub>10</sub> ...(A) <sub>15</sub>	CGCATCAATCGAGGATACAC	TTCCGACAACCTCAGGAGAGA	220	
<b>L19</b>	(A) <sub>10</sub>	TGCTGGAAAATAAGGTGGG	CCTTTTGATTTGAGACCGGA	288	

Sekos baltymus koduojančių genų pagausinimui skirtų pradmenų kūrimui buvo paimtos iš CoGe:Comparative Genomics tinklapio <http://www.genomevolution.org>, o pradmenys parinkti su *Primer3* programa, kuri yra prieinama internete <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0>. Buvo sukurtos 7

poros pradmenų, komplementarių glutationo peroksidazės genui, 9 poros – komplementarių katalazės genui ir 4 poros komplementarių askorbato peroksidazės genui (4 Lentelė).

**4 Lentelė.** GPx, Cat, APx genams pagausinti skirti pradmenys

	Pradmens pav.	I pradmuo, (5'→3', L)	II pradmuo, (5'→3', R)	Produkto dydis (bp)
Glutatio- noro peroksidazė	GPx1	GGAAGCAGCTTCTTGATGTCC	TTCTCAAGTCTAGCGCTGGC	796
	GPx2	ATTGCAAGGGAAAGCAAGAA	TGGCCTTACAACCTCCAAC	906
	GPx3	GATGCAACATTCACGACCAA	CTTTCTGACCGCAGAGGAAC	738
	GPx4	TGAATCCTGCCTCATTTGAA	GCTGTAGGGGCATTCTTGTC	1608
	GPx5	AAGGAGAGAGCTGGCATTCA	AGGTTTGATCGAATCTCGTTG	1405
	GPx6	TGTGCAAACACATAATCCCAAT	TGATCATGACCAATAGATCGTT	902
	GPx7	TCATCCGGAATAGTTCATCA	CCAGACGCCTCTATTCTCCA	744
Katalazė	Cat1	GACCGTCATTTTCGATGCGTG	GAGGGTCTTCTCGTATGCCG	695
	Cat2	TCAAGGCATGGACCATGTCC	CGTTGCTCATCTCACATGCG	780
	Cat3	TAGAGCTTGACGGACGATGC	ACGCAGTCGAGAAGAACGAG	746
	Cat4	CACCCAAGCTTGCTGGAAC	TCTGCCATGGCTGTTTCCTT	792
	Cat4a	TTCACGTAGTGGGCTTTTCC	CTTTGTTTGCCCACAGTGAA	775
	Cat4b	GGAGACTTTCCACCATGAA	ACAATCCTCCAGGAAAAGGA	761
	Cat5	CACACGAGGCGGAATAGGAA	GCCCACTACGTGAAGTTCCA	651
Cat6	TAGAGATTGACGGACGTTGC	ACGCAGTCGAGCAGGACGAG	746	
Cat7	CGCGGTTTGGTTCAATTCGT	TGGACTTGATCAGCGGTGAC	785	
Askorbato peroksidazė	APx1	AAATTTCGAGCCGTCAGATTG	CCGAGATCCGACCTGATAGA	772
	APx2	GGCTGTTGATAAGGCCAAGA	AAAATTTCGGGGAATCAGCTT	740
	APx3	GATCAGTTGGCTGGAGTCGT	GGTGGTCGTTGCCTGATAGT	725
	APx4	CAAAATACTCGCAGGACAAGC	CGGGAATTGAAATTTTGTG	758

Kuriant pradmenis buvo laikomasi pagrindinių pradmenų kūrimo kriterijų – pradmenų ilgis 20 - 22 bp, pradmenų lydymosi temperatūra apie 58 – 60 °C, o bendras guanino ir citozino nukleotidų porų kiekis pasirinktoje sekoje yra 40 – 60 %.

### 2.3.5. Polimerazės grandininė reakcija

Polimerazės grandininė reakcija (PGR) – tai nukleorūgščių sintezės *in vitro* metodas, kurio metu padauginami atskiri DNR fragmentai iki norimo kiekio. PGR metodas yra ciklinis. Vieno ciklo metu keičiant temperatūrą vyksta matricinės DNR denatūracija, pradmenų prisijungimas bei jų pratęsimas. Panaudojus teorines pradmenų prijungimo temperatūras, PGR sąlygos buvo optimizuotos kiekvienai pradmenų porai (5 Lentelė).

**5 Lentelė.** Gpx, Cat ir Apx genų fragmentų gausinimo PGR metodu sąlygos.

<b>Ciklas</b>	<b>Temperatūra,</b>	<b>Trukmė</b>	<b>Ciklų skaičius</b>
Pradinė denatūracija	<b>95 °C</b>	5 min	1
Denatūracija	<b>94 °C</b>	45 s	35
Pradmens prisijungimas	<b>48 °C</b> (GPx4) <b>49 °C</b> (GPx2, GPx5, GPx6) <b>50 °C</b> (Cat2) <b>51 °C</b> (Cat4a, Cat4b, Gpx3) <b>53 °C</b> (GPx1, GPx7) <b>55 °C</b> (Cat1, Cat4, Cat5, Cat6, Cat7) <b>56 °C</b> (Cat4a, Cat4b, APx1) <b>57 °C</b> (APx2, Cat3) <b>59 °C</b> (APx3, APx4)	30 s	
Sintezė	<b>72 °C</b>	1 min	
Inkubacija	<b>72 °C</b>	10 min	

Mikrosatelitų fragmentams, PGR sąlygos buvo parinktos ir optimizuotos remiantis Wani ir kolegų pateikta informacija (6 Lentelė) (Wani et al., 2014).

**6 Lentelė.** Mikrosatelitų fragmentų gausinimo PGR metodu sąlygos.

<b>Ciklas</b>	<b>Temperatūra,</b>	<b>Trukmė</b>	<b>Ciklų skaičius</b>
Pradinė denatūracija	<b>94 °C</b>	3 min	1
Denatūracija	<b>94 °C</b>	45 s	35
Pradmens prisijungimas	<b>51 °C</b> (L4, L7, L14, L16, L19)	45 s	
Sintezė	<b>72 °C</b>	45 s	
Inkubacija	<b>72 °C</b>	6 min	1

PGR metodo atlikimo tvarka:

1. Darbas atliekamas traukos spintoje, kuri sterilizuojama UV pagalba. Traukos spintos paviršius dezinfekuojamas 70 % etanoliu.
2. Reakcijos reagentai į sterilų 0,2 ml talpos mėgintuvėlį supilstoma tokiais kiekiais:
  - a. PGR mišinys „DreamTaq PCR Master Mix (2x)“ – 5 µl;
  - b. ddH<sub>2</sub>O – 1 µl;
  - c. Tiesioginis pradmuo (F) – 1 µl;
  - d. Atvirkštinis pradmuo (R) – 1 µl;
3. Į paruoštus 0,2 ml mėgintuvėlius su reakcijos mišiniu įpilama po 2 µl genominės DNR mėginio tirpalo (tirpalo koncentracija yra 5 ng/µl). Taip pat, vienas 0,2 ml mėgintuvėlis paliekamas kaip neigiama kontrolė – reikalinga patikrinti reagentų užterštumą.
4. Mėgintuvėliai dedami į termociklerį ir paleidžiama PGR programa.

### 2.3.6. DNR elektroforezė agarozės gelyje

PGR metu pagausinti DNR fragmentai buvo patikrinti elektroforezės metodu agarozės gelyje. Šis būdas leidžia vizualizuoti PGR reakcijos mišinyje esančius specifinius ir (arba) nespecifinius DNR fragmentus, kokybiškai įvertina jų kiekį, švarumą. Šio tyrimo metu, norint nustatyti PGR produkto buvimą, ilgį, specifiškumą bei reagentų ir reakcijos mišinio užterštumą buvo naudojama horizontali elektroforezė 1,5 % agarozės gelyje.

Metodo atlikimo eiga:

1. Paruošiamas 1,5 % agarozės tirpalas 40 ml 1xTAE buferyje. Agarozė ištirpinama kaitinant. Vėliau tirpalas atvėsinaamas iki 50 °C temperatūros.
2. Į atvėsintą agarozės tirpalą įlašinami 6 µl etidžio bromido tirpalo (10 mg/ml).
3. Agarozės tirpalas supilamas į paruoštą formą su „šukutėmis“ ir paliekama polimerizuotis kambario temperatūroje 30 min.
4. Atsargiai ištraukiamos šukutės.
5. Gelis perkeliamas į elektroforezės aparatą, kurio kamera užpildoma 1xTAE buferiu.
6. 5 µl PGR produkto sumaišoma su 2 µl bromfenolio mėlio dažais ir įnešami į agarozės gelio šulinėlius. Į pirmąjį gelio šulinėlį, norint nustatyti PGR produkto ilgį, įleidžiama 5 µl DNR ilgio standarto.
7. Uždengus elektroforezės vonelės dangtį, aparatas įjungiamas į srovės šaltinį. Elektroforezė vykdoma 20 minučių 120 V įtampoje.
8. Pasibaigus elektroforezei, gelis fotografuojamas ultravioletinėje šviesoje. Gautas rezultatas interpretuojamas naudojant kompiuterinę vizualizacijos programą „BioDocAnalyze“.

### 2.3.7. DNR išskyrimas iš elektroforezės gelio

DNR išskyrimui iš elektroforezės gelio naudojamas rinkinys „PureLink Quick Gel Extraction Kit“.

Metodo atlikimo eiga:

1. Iškerpamas DNR fragmentas iš elektroforezės gelio ir įdedamas į 0,5 ml mėgintuvėlį.
2. Į mėgintuvėlį su DNR fragmentu įpilama L3 buferio, santykiu 1:3. Pavyzdžiui, 100 mg gelio ir 300 µl L3 buferio.
3. Mėgintuvėlis su geliu ir buferiu inkubuojamas 50 °C temperatūroje, 15 min.
4. Į mėgintuvėlį įpilama izopropanolio 1 gelio tūrio.
5. Pipete supilamas skystis į „Quick Gel Extraction“ kolonėlę ir centrifuguojama 1 min, 12 800 rpm.
6. Nucentrifugavus ir išpylus skystį ant kolonėlės membranos užpilamas 500 µl W1 buferio.

7. Centrifuguojama 1 min 12 800 rpm, išpilamas skystis ir centrifuguojama 1 min 12 800 rpm, kad išdžiūtų.
8. Kolonėlės sudedamos į sterilius 0,5 ml mėgintuvėlius ir užpilama 20 µl E5 buferio ir 5 min laikoma kambario temperatūroje.
9. Centrifuguojama 1 min 12 800 rpm.
10. Išgryninta DNR laikoma -20 °C temperatūroje iki panaudojimo.

### **2.3.8. PGR produkto fermentinis valymas**

Prieš atliekant sekoskaitą, į PGR produktus buvo įdėta egzonukleazė ir šarminė fosfatazė. Egzonukleazės PGR mišinyje degradoja likusius viengrandžius DNR fragmentus (pradmenis), o šarminė fosfatazė defosforilina nepanaudotus dNTP.

Metodo atlikimo eiga:

1. Į 5 µl PGR produkto mėgintuvėlį įpilama 0,5 µl egzonukleazės I ir 1 µl šarminės fosfatazės. Mišinys gerai supurtomas ir nucentrifuguojamas.
2. Mėgintuvėliai sudedami į termociklerį 30 min, kurios metu pirmas 15 min laikoma 37 °C, o likusias 15 min laikoma 85 °C temperatūroje.

PGR produktų sekoskaitą atlieka Gamtos tyrimų centro Molekulinės ekologijos laboratorijos darbuotojai, naudojamas 3500 Genetic Analyser prietaisas.

### **2.3.9. Statistinė duomenų analizė**

Gauti sekoskaitos duomenys apdoroti naudojant šias kompiuterines programas: „Chromas“, „Mega-X“, „GenAlEx 6.5“ ir „Network“.

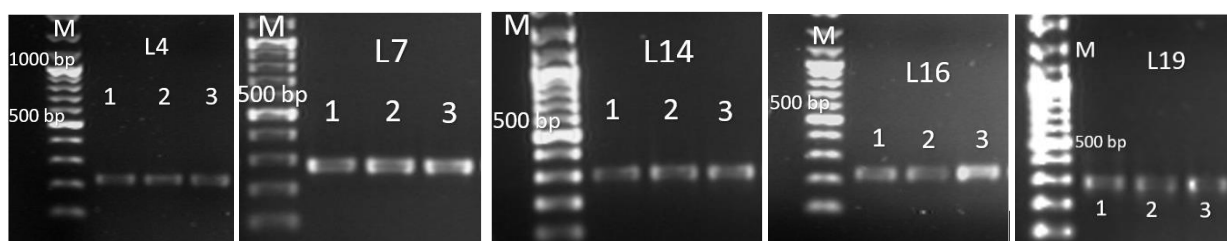
GenAlEx 6.5 (angl. Genetic Analysis in Excel; Peakall, Smouse, 2006) kompiuterine programa atlikta molekulinės genetinės įvairovės analizė AMOVA (angl., Analysis of Molecular Variance). „Mega-X“ programa tarpusavyje lyginamos gautos DNR sekos ir nubraižomi filogenetiniai medžiai, taikant kaimynų jungties (angl. Neighbor-joining (NJ)) metodą, Kimura-2 testą.

### 3. TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Išskyrus DNR iš laukinės populiacijos *L. minor* mėginių, surinktų Nemune ties Kaunu (15, 16, 17, 18 ir A, B, C, D) ir Neryje ties Vilniumi (22, 23, 24,25 ir S1, S2, S3, S4, S7, S9, S10, S11, S12) buvo pagausinti DNR fragmentai bei atlikta DNR sekoskaita siekiant įvertinti *L. minor* chloroplasto mikrosatelitinių žymenų L4, L7, L14, L16, L19 tinkamumą vidurūšinės genetinės įvairovės bei populiacinės genetinės struktūros nustatymui.

#### 3.1. Mikrosatelitų žymenų įvertinimas

Mikrosatelitų sekos yra puikus genetinis žymuo, nagrinėjant populiacijų genetinę įvairovę. *L. minor* populiacijų filogenetinę analizę galima taip pat atlikti panaudojant mikrosatelitų sekoskaitos duomenis. Wani su kolegomis sukūrė septynias poras pradmenų, kurias panaudojo *L. minor* chloroplasto mikrosatelitinių žymenų tyrimuose nustatydami pagausintų fragmentų ilgį bazių poromis. Kadangi kinų mokslininkai nustatė, kad daugelio iš analizuotų lokusų skirtingų alelių dydžiai tesiskyrė vienu nukleotidu (Wani et al., 2014), šio magistrinio darbo metu buvo nuspręsta atlikti pagausintų fragmentų sekoskaitą, siekiant įvertinti ar šie žymenys tinkami genetinės įvairovės bei populiacinės genetinės struktūros tyrimams. Išskleidus pagausintus DNR fragmentus agarozės gelyje nustatyta, kad visų nagrinėjamų mikrosatelitinių žymenų fragmentų dydžiai svyravo 200 – 300 bp intervale. Amplifikuoti PGR produktai agarozės elektroforezės gelyje atitiko teorinį fragmentų dydį bei turėjo tik po vieną frakciją (9 pav.).



**9 pav.** *L. minor* pagausintos DNR fragmentai elektroforezės agarozės gelyje, panaudojus L4, L7, L14, L16, L19 pradmenis. 1 – 22, 2 – 15, 3 – 16, M – DNR dydžio standartas.

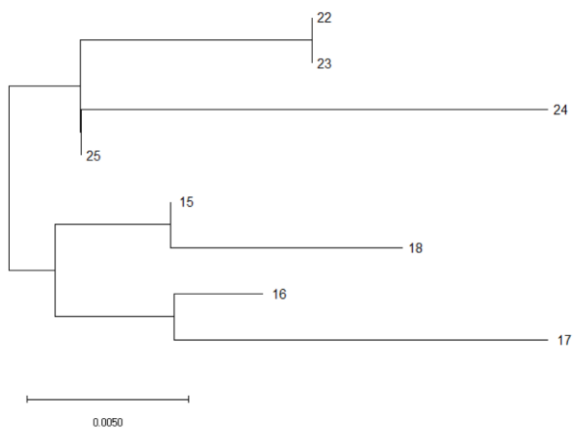
L4 žymuo yra 291 bp dydžio ir sukurtas Molekulinės ekologijos laboratorijos darbuotojų. Patikrinus šį žymenį su tirtais laukinės populiacijos *L. minor* mėginiais, atlikus sekoskaitą bei sulyginus gautas sekas, nustatytos kelios nukleotidų pakaitos, būdingos skirtingiems mėginiams lyginant su referentine seka 22 (7 Lentelė).

**7 Lentelė.** L4 fragmento nukleotidų paklaidos tarp laukinės populiacijos *L. minor* mėginių. Geltona spalva pažymėta Vilniaus Neries upės mėginiai (22, 23, 24, 25), pilka spalva – Kauno Nemuno upės mėginiai (15, 16, 17, 18).

	55	58	143	152	168	181	184	Pasikartojantis motyvas
22	G	T	T	T	G/C	G/A	T/G	(T) <sub>12</sub>
23	.	.	.	.	.	.	.	(T) <sub>12</sub>
24	T	A	.	.	C/G	.	.	(T) <sub>12</sub>
25	.	.	.	.	C/G	.	.	(T) <sub>12</sub>
15	.	.	.	.	C/G	A/G	.	(T) <sub>12</sub>
16	.	.	.	.	C/G	.	G/T	(T) <sub>12</sub>
17	.	.	C	.	C/G	A/G	G/T	(T) <sub>12</sub>
18	.	.	.	A	C/G	A/G	.	(T) <sub>12</sub>

Vilniaus Neries upėje surinkti mėginiai skyrėsi tarpusavyje 55, 58 ir 168 pozicijose. O Kauno Nemuno upės surinkti mėginiai skyrėsi penkiose pozicijose (143, 152, 168, 181, 184). Daugumoje mėginių L4 pradmenys leido pagausinti sekas su dvigubais pikais pozicijose 168 (G/C), 181 (A/G) ir 184 (T/G). Pasikartojantis motyvas visuose tirtuose mėginiuose buvo toks pat - (T)<sub>12</sub>.

Filogenetinių sekų, pagausintų panaudojus L4 pradmenų porą, panašumas įvertintas pritaikius NJ metodą (10 pav.).

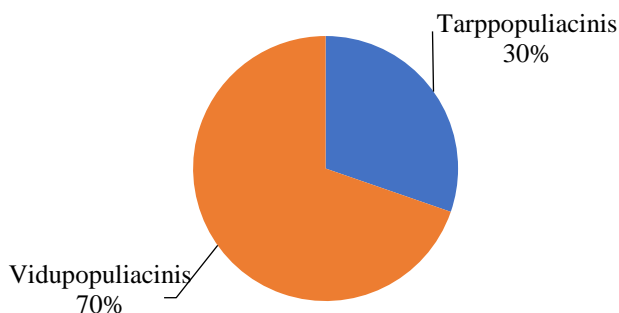


**10 pav.** Laukinės populiacijos *L. minor* mėginių L4 fragmento filogenetinis medis.

Filogenetiniame L4 žymens medyje *L. minor* mėginiai pasiskirsto į du pagrindinius klasterius (10 pav.). Viename klasteryje grupuojasi mėginiai surinkti iš Neries upės ties Vilniumi, o kitame klasteryje – mėginiai surinkti iš Nemuno upės ties Kaunu. Filogenetinių skirtumų tarp Vilniaus Neries upės 22 ir 23 mėginių neaptikta.



Taip pat buvo atlikta L4 fragmento molekulinė variacijų analizė, kurios rezultatai parodė, kad Lietuvoje rinktų *L. minor* vidupopuliacinė genetinė įvairovė yra 70 %, o tarppopuliacinė genetinė įvairovė – 30 % (11 pav.).



**11 pav.** *L. minor* procentinis molekulinės įvairovės pasiskirstymas su L4 pradmeniu.

L7 žymuo yra 282 bp dydžio ir sukurtas Wani su kolegomis (Wani et al., 2014). Pagausus laukinės populiacijos *L. minor* mėginių DNR, atlikus sekoskaitą bei sulyginus gautas sekas, nustatyta viena nukleotidinė pakaita viename iš tiriamųjų mėginių (64 pozicija) (8 Lentelė).

**8 Lentelė.** L7 fragmento nukleotidų pakaitos tarp laukinės populiacijos *L. minor* mėginių. Geltona spalva pažymėta Vilniaus Neries upės mėginiai (22, 23, 24, 25), pilka spalva – Kauno Nemuno upės mėginiai (15, 16, 17, 18).

	64	Pasikartojantis motyvas
22	G	(A) <sub>3</sub> T(A) <sub>2</sub> G/A(A) <sub>4</sub>
23	.	(A) <sub>3</sub> T(A) <sub>2</sub> A/G(A) <sub>4</sub>
24	.	(A) <sub>3</sub> T(A) <sub>2</sub> G/A(A) <sub>4</sub>
25	.	(A) <sub>3</sub> T(A) <sub>2</sub> A/G(A) <sub>4</sub>
15	.	(A) <sub>3</sub> T(A) <sub>2</sub> A/G(A) <sub>4</sub>
16	A	(A) <sub>3</sub> T(A) <sub>2</sub> A/G(A) <sub>4</sub>
17	.	(A) <sub>3</sub> T(A) <sub>2</sub> A/G(A) <sub>4</sub>
18	.	(A) <sub>3</sub> T(A) <sub>2</sub> G/A(A) <sub>4</sub>

Wani su kolegomis L7 fragmento pasikartojantį motyvą pateikė kaip (A)<sub>11</sub>, o Lietuvoje surinktuose *L. minor* mėginiuose pasikartojančiame motyve įsiterpia T nukleotidas bei dvigubas pikas (G/A). Dėl aptiktų minimalių skirtumų molekulinė variacijų analizė nevykdyta bei L7 žymens filogenetinis medis nebuvo konstruojamas.

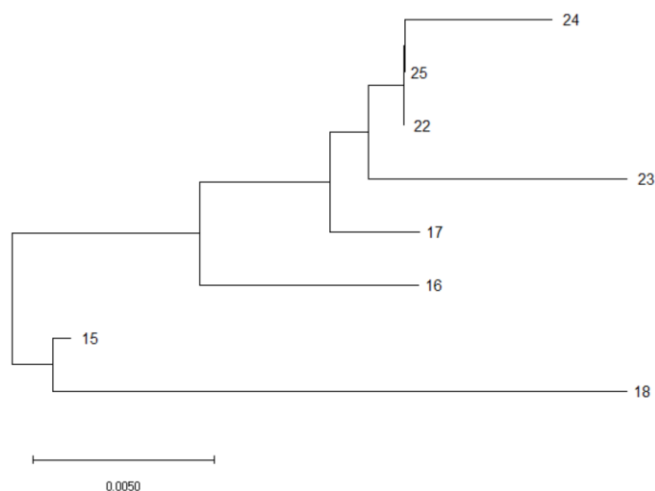
L14 žymuo yra 299 bp dydžio ir sukurtas Wani su kolegomis (Wani et al., 2014). Sulyginus Neries ir Nemuno populiacijas atstovaujančių *L. minor* mėginių sekas nustatytos nukleotidų pakaitos 10-je variabilių pozicijų (9 Lentelė).

**9 Lentelė.** L14 fragmento nukleotidiniai skirtumai tarp laukinės populiacijos *L. minor* mėginių. Geltona spalva pažymėta Vilniaus Neries upės mėginiai (22, 23, 24, 25), pilka spalva – Kauno Nemuno upės mėginiai (15, 16, 17, 18).

	24	26	27	76	230	244	245	250	268	Pasikartojantis motyvas
22	A	T	T	G	G	G	T	A/G	G	(A) <sub>10</sub> A/T(A) <sub>4</sub>
23	.	.	.	A	C	.	.	.	.	(A) <sub>10</sub> A/T(A) <sub>4</sub>
24	.	.	.	.	.	.	G	.	.	(A) <sub>10</sub> A/T(A) <sub>4</sub>
25	.	.	.	.	.	.	.	.	.	(A) <sub>10</sub> A/T(A) <sub>4</sub>
15	.	.	.	.	.	.	.	G/A	C	(A) <sub>10</sub> T/A(A) <sub>4</sub>
16	T	.	.	A	.	.	.	G/A	.	(A) <sub>10</sub> A/T(A) <sub>4</sub>
17	.	.	.	.	.	.	.	.	.	(A) <sub>10</sub> T/A(A) <sub>4</sub>
18	T	C	C	.	.	T	.	G/A	C	(A) <sub>10</sub> T/A(A) <sub>4</sub>

Kauno Nemuno upės mėginiuose nukleotidų pakaitų lyginant su pasirinkta referentine seka (22) aptikta septyniose pozicijose (24, 26, 27, 76, 244, 250, 268), o Vilniaus Neries mėginiuose nukleotidų pakaitų aptikta tik trijose pozicijose (76, 230, 245). Nagrinėjant L14 žymenį aptinkamas dvigubas pikas 250 pozicijoje (A/G) ir dvigubas pikas – pasikartojančiame motyve (A/T). Vilniaus Neries ir Nemuno Kauno tirtuose mėginiuose pasikartojančio motyvo skaičius išlieka stabilus.

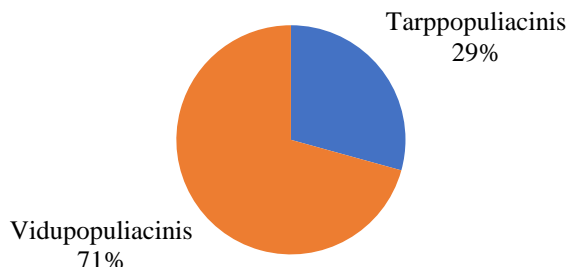
Filogenetinių sekų, pagausintų panaudojus L14 pradmenų porą, panašumas įvertintas pritaikius NJ metodą (12 pav.).



**12 pav.** Laukinės populiacijos *L. minor* mėginių L14 fragmento filogenetinis medis.

Gauti rezultatai parodė, kad *L. minor* mėginiai pasiskirsto į du pagrindinius klasterius (12 pav.). Viename klasteryje grupuojasi du Kauno Nemuno upės mėginiai (15, 18), kitame klasteryje grupuojasi likusių dviejų populiacijų mėginiai. Filogenetinių skirtumų tarp Vilniaus Neries upės 25 ir 22 mėginių neaptikta.

Atlikus L14 fragmento molekulinę variacijų analizę, rezultatai parodė, kad Lietuvoje rinktų *L. minor* vidupopuliacinė genetinė įvairovė – 71 %, o tarppopuliacinė genetinė įvairovė – 29 % (13 pav.).



**13 pav.** *L. minor* procentinis molekulinės įvairovės pasiskirstymas su L14 pradmeniu

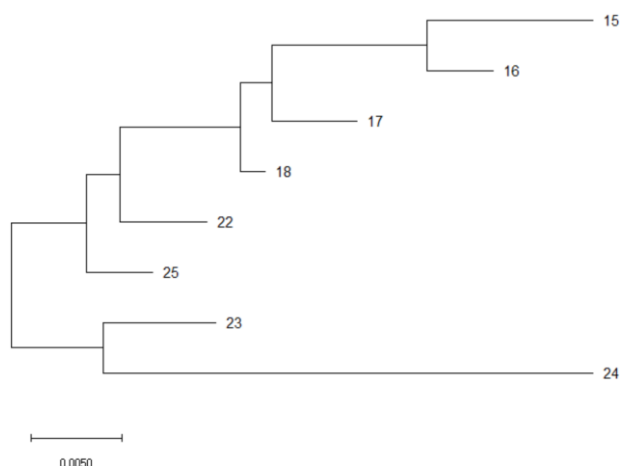
L16 žymuo yra 220 bp dydžio ir taip pat sukurtas Wani su kolegomis (Wani et al., 2014). Patikrinus šį žymenį su visais laukinės populiacijos *L. minor* mėginiais ir atlikus sekoskaitą, gauti rezultatai taip pat atskleidė individualius nukleotidinius skirtumus bei skirtumus tarp Neries ir Nemuno populiacijų (10 Lentelė).

**10 Lentelė.** L16 fragmento nukleotidiniai skirtumai tarp laukinės populiacijos *L. minor* mėginių. Geltona spalva pažymėta Vilniaus Neries upės mėginiai (22, 23, 24, 25), pilka spalva – Kauno Nemuno upės mėginiai (15, 16, 17, 18).

	139	146	148	151	152	154	156	179	181	188	192	Pasikartojantys motyvai
22	T	C	A	A	C	C	G	C	C	G/T	T	(T) <sub>10</sub> ...(A) <sub>18</sub>
23	.	.	.	.	T	T	.	.	.	.	.	(T) <sub>10</sub> ...(A) <sub>18</sub>
24	.	G	.	.	T	T	T	T	T	T/G	.	(T) <sub>10</sub> ...(A) <sub>18</sub>
25	.	.	.	.	.	.	.	T	.	T/G	.	(T) <sub>10</sub> ...(A) <sub>18</sub>
15	C	.	C	C	.	.	.	.	.	T/G	C	(T) <sub>10</sub> ...(A) <sub>18</sub>
16	.	.	C	C	.	.	.	.	.	T/G	.	(T) <sub>10</sub> ...(A) <sub>18</sub>
17	C	.	.	.	.	.	.	.	.	T/G	C	(T) <sub>10</sub> ...(A) <sub>18</sub>
18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T/G	C	(T) <sub>10</sub> ...(A) <sub>18</sub>

Kauno Nemuno upės mėginiuose nukleotidų pakaitų, palyginus su referentine 22 seka, aptikta penkiose pozicijose (139, 148, 151, 188, 192), o Vilniaus Neries mėginiuose pakaitų aptikta septyniose pozicijose (146, 152, 154, 156, 179, 181, 188). L16 žymuo išryškino vieną poziciją su dvigubu piku: 188 (G/T). Šio žymens pasikartojančio motyvo skaičius išlieka stabilus abiejose populiacijose – (T)<sub>10</sub>...(A)<sub>18</sub>.

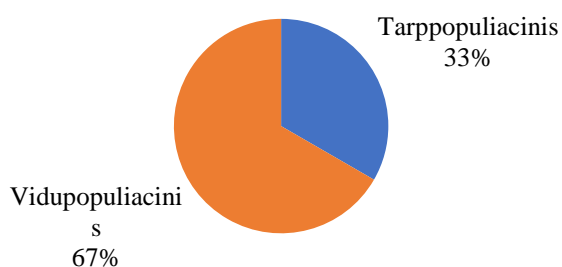
Filogenetinių sekų, pagausintų panaudojus L16 pradmenų porą, panašumas įvertintas pritaikius NJ metodą (14 pav.).



**14 pav.** Laukinės populiacijos *L. minor* mėginių, naudojant L16 žymenį, filogenetinis medis.

Analizuojant filogenetinius atstumus su L16 žymeniu tarp pasirinktų dviejų Lietuvos *L. minor* populiacijų, pastebimas mėginių pasiskirstymas į du pagrindinius klasterius. Viena klasteryje grupuojasi du Vilniaus Neries upės mėginiai (23, 24), kitame klasteryje – likusių abiejų populiacijų mėginiai (14 pav.).

Atlikus L16 fragmento molekulinę variacijų analizę, rezultatai parodė, kad Lietuvoje rinktų *L. minor* vidupopuliacinė genetinė įvairovė apima 67 %, o tarppopuliacinė genetinė įvairovė – 33 % variacijų (15 pav.).



**15 pav.** L16 genetinio žymens procentinis molekulinės įvairovės pasiskirstymas *L. minor* populiacijose Lietuvoje.

L19 žymuo yra 288 bp dydžio ir sukurtas Wani su kolegomis (Wani et al., 2014). Sulyginus visų tirtų laukinės populiacijos *L. minor* mėginių L19 lokuso sekas, nenustatyta variabilių pozicijų, o pasikartojančio motyvo skaičius išlieka stabilus abiejose populiacijose – (A)<sub>10</sub>. Dėl neaptiktų skirtumų tarp *L. minor* mėginių sekų, padaugintų su L19 pradmenų pora, molekulinę variacijų analizę nevykdyta ir filogenetinis medis nebuvo konstruojamas.

## 3.2. Genetiniai žymenys

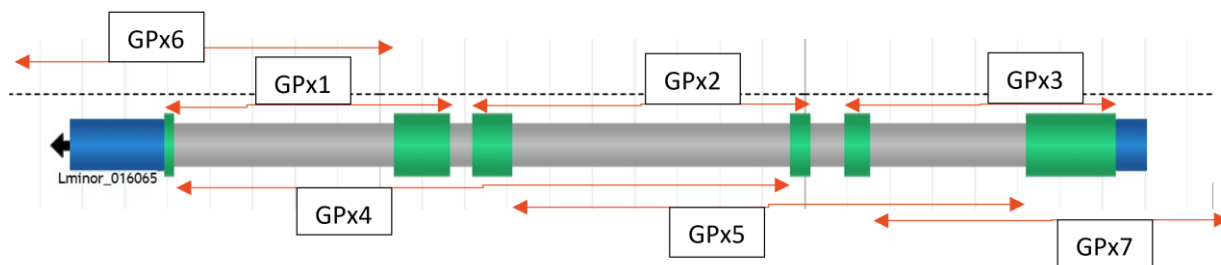
*L. minor* genetinių žymenų sukūrimui buvo pasirinkti genai, kurių produktai reaguoja į organizmo oksidacinį stresą (Atamanalp et al., 2019, Varga et al., 2013, Tlidjen et al., 2012). CoGe (www.genomevolution.org) duomenų bazėje patalpinta informacija apie visą mažosios plūdenos genomą, skelbiamos genų sekos, genų struktūra, nurodoma padėtis genome bei chromosomoje. Atsižvelgiant į reikšmingumą bei į tyrimų rezultatus, aprašytus mokslinėje literatūroje, magistrinio darbo tyrimai buvo vykdomi analizuojant galimus trijų genų (11 Lentelė), priklausančių augalų antioksidantinei apsaugos sistemai, DNR sekos pokyčius veikiant *L. minor* eksperimentinius klonus skirtingu atstumu nuo elektromagnetinio šaltinio.

**11 Lentelė.** Tyrimui pasirinkti genetiniai žymenys (duomenys paimti iš CoGe duomenų bazės).

Genas	Geno pozicija	Identifikacinis kodas	Geno dydis, bp
Glutathiono peroksidazė (GPx)	Chr lminor_contig6221	Lminor_016065	3168
Katalazė (Cat)	Chr lminor_contig5911	Lminor_004362	3788
Askorbato peroksidazė (APx)	Chr lminor_contig2157	Lminor_004871	2085

### 3.2.1. Glutathiono peroksidazės žymenų įvertinimas

*L. minor* glutathiono peroksidazės (GPx) fermentas katalizuoja vandenilio peroksidą ar vykdo organinių hidroperoksidų redukciją iki vandens ar atitinkamų alkoholių (Herbette et al., 2007), o jo geną sudaro šešios egzono ir penkios introno sritys (16 pav.). CoGe duomenų bazėje pateikiama informacija, kad *L. minor* GPx savo genetinė struktūra yra panašus į glutathiono peroksidazės 7 geną (*Arabidopsis thaliana*).



**16 Pav.** Glutathiono peroksidazės genas. Žalia spalva pavaizduota egzono sritys, pilka spalva – introno, mėlyna promotoriaus ir terminatoriaus sritys. Rodyklėmis pažymėtos atitinkamų fragmentų santykinis ilgis, kurių pagausinimui sukurtos pradmenų poros.

Visas geno ilgis yra 3167 bp, todėl norint atlikti GPx geno sekoskaitą, tenka jį išskaidyti į mažesnius fragmentus, kurie persiklotų. Šiuo atveju pagausinami 7 fragmentai: GPx1, GPx2, GPx3,

GPx4, GPx5, GPx6, GPx7 (4 pav.). Visuose sukurtuose fragmentuose yra bent vienas egzonas ir vienas intronas (12 Lentelė).

**12 Lentelė.** GPx geno fragmentų atitinkama pradmenų pora pagausinamų skirtingų sričių ilgiai bazių poromis (bp).

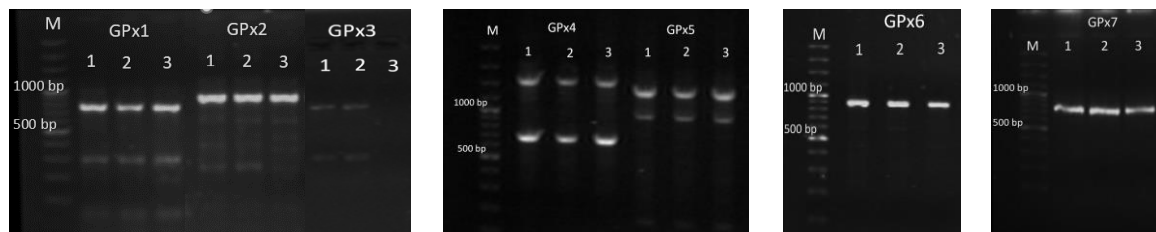
Fragmento pav.	Genų sritys ir jų dydžiai					Iš viso, bp
GPx1		Egzonas 1 21 bp	Intronas 1 646 bp	Egzonas 2 129 bp		796
GPx2		Egzonas 3 66 bp	Intronas 3 816 bp	Egzonas 4 24 bp		906
GPx3		Egzonas 5 69 bp	Intronas 5 458 bp	Egzonas 6 211 bp		738
GPx4	Intronas 1 608 bp	Egzonas 2 167 bp	Intronas 2 65 bp	Egzonas 3 118 bp	Intronas 3 650 bp	1608
GPx5	Intronas 3 711 bp	Egzonas 4 61 bp	Intronas 4 98 bp	Egzonas 5 76 bp	Intronas 5 459 bp	1405
GPx6		Promotorius 236 bp	Egzonas 1 29 bp	Intronas 1 637 bp		902
GPx7		Intronas 5 389 bp	Egzonas 6 266 bp	Terminatorius 89 bp		744

Fragmentų pagausinimas su naujais sukurtais pradmenų poromis buvo vykdomas naudojant „DreamTaq PCR Master Mix (2x)“ mišinį, į kurį įeina Taq DNR polimerazė, buferis, dNTP bei atitinkamos druskos. Siekiant optimizuoti PGR sąlygas, buvo galima keisti tik PGR programos sąlygas. Pradžioje pasirinkus skirtingą ciklų skaičių: 30, 35, 40, pastebėta, kad siekiant pagausinti optimalų kiekį reikiamo PGR produkto užtenka 35 ciklų. Pradmenų prikibimo temperatūra buvo parenkama pagal „ThermoFisher“ programoje (T<sub>m</sub> Calculator) pasiūlytą temperatūrą, priklausomai nuo naudojamos polimerazės ir pradmenų sekų. Kiekviena pradmenų pora buvo patikrinama su trimis skirtingomis pradmenų prikibimo temperatūromis ir pasirenkamas optimaliausias variantas (13 Lentelė).

**13 Lentelė.** Gpx pradmenų prikibimo temperatūros.

Pradmuo	Temperatūra pagal „Thermo Fisher“, °C	Taikyta temperatūra, °C	Optimaliausia temperatūra, °C
GPx1	52	51, 52, 53	53
GPx2	49	48, 49, 50	49
GPx3	50	49, 50, 51	51
GPx4	48	47, 48, 49	48
GPx5	49	48, 49, 50	49
GPx6	48	47, 48, 49	49
GPx7	52	51, 52, 53	53

Amplifikuoti PGR produktai buvo patikrinti atlikus elektroforezę agarozės gelyje (17 pav.). Patikrinus visus geno fragmentus, pagausintus naudojant atitinkamus pradmenis, kiekvienu atveju elektroforezės agarozės gelyje ryškiausios frakcijos dydis atitiko teorinį fragmento dydį.



**17 pav.** GPx1, GPx2, GPx3, GPx4, GPx5, GPx6, GPx7 fragmentų elektroforezė agarozės gelyje. 1 – S2, 2 – S4, 3 – B, M – DNR dydžio standartas.

Panaudojus GPx2 pradmenis pagausintas didžiausias frakcijų skaičius, palyginus su kitomis pradmenų poromis. Panaudojus GPx3 pradmenų porą S2 ir S4 *L. minor* mėginių atveju pagausintos dvi frakcijos, o B mėginio atveju – nei vienos frakcijos. Panaudojus GPx1, GPx4 ir GPx5 pradmenis kiekvieno tirto *L. minor* mėginio atveju pagausinta po dvi frakcijas. Dėl atsiradusių nespecifinių produktų, su kiekvienu pradmeniu (GPx1, GPx2, GPx3, GPx4, GPx5) iš elektroforezės gelio buvo iškirpti fragmentai, kurie atitiko teorinį fragmento dydį, išskirta DNR ir atlikta sekoskaita. Sekoskaitos rezultatai kiekvienu atveju parodė nešvarias sekas, todėl tokios sekos nebuvo tinkamos tolimesnei analizei.

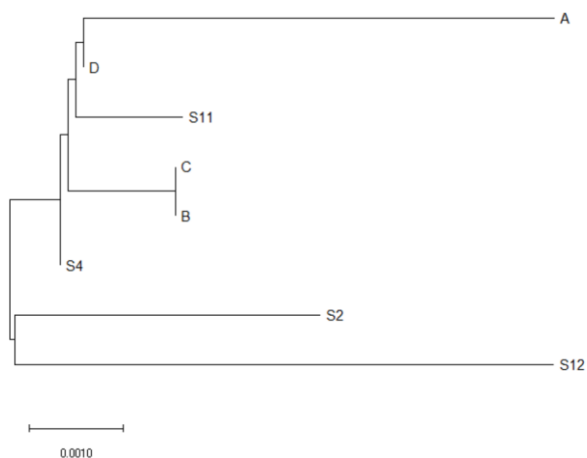
Iš septynių sukurtų GPx pradmenų porų vieną frakciją gaunasi tik su GPx6 ir GPx7 pradmenų poromis. Atlikus šių geno fragmentų sekoskaitą buvo gautos švarios sekos, kurios panaudotos tolimesnei analizei.

Buvo atlikta visų turimų laukinės populiacijos *L. minor* mėginių sekoskaita su GPx6 pradmeniu. Iš kiekvienos populiacijos atrinkta po 4 mėginius, kurie buvo surinkti Nemune ties Kaunu (pažymėti A, B, C, D) ir Neryje ties Vilniumi (pažymėti S2, S4, S11, S12). Sekoskaitos rezultatai buvo palyginti tarpusavyje referentine seka pasirinkus mėginio S2 seką (14 Lentelė).

**14 Lentelė.** GPx6 fragmento variabilios pozicijos ir nukleotidų pakaitos lyginant su referentine seka S2. Mėlyna spalva pažymėta GPx geno promotoriaus sritis, likusi – pirmo introno sritis. Geltona spalva pažymėta Vilniaus Neries upės mėginiai, pilka spalva – Kauno Nemuno upės mėginiai.

	64	65	66	68	69	77	87	125	500	880
S2	T	A	A	T	G	T	G	G	C	G
S4	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.
S11	A	.	.	.	.	.	.	.	G	.
S12	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.
A	.	T	T	G	C	C	.	C	.	.
B	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
D	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T

Sulyginus sekas pastebėta, kad variabiliausia yra promotoriaus sritis, ypač daug nukleotidų pakaitų nustatyta A mėginyje. Pirmo egzono srityje nebuvo nei vieno neatitikimo, o pirmo introno srityje nustatytos dvi variabilios pozicijos (500, 880). Filogenetinių sekų, pagausintų panaudojus GPx6 pradmenų porą, panašumas įvertintas pritaikius NJ metodą (18 pav.).

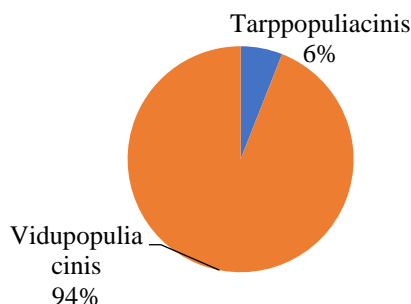


**18 pav.** GPx6 fragmento filogenetinis medis, atspindintis filogenetinius ryšius tarp laukinės populiacijos *L. minor* mėginių.

Analizuojant GPx6 fragmento filogenetinius atstumus tarp pasirinktų dviejų Lietuvos *L. minor* populiacijų, pastebimas mėginių pasiskirstymas į du pagrindinius klasterius. Viename klasteryje grupuojasi du Vilniaus Neries upės mėginiai (S2, S12), kitame klasteryje – likusių abiejų populiacijų mėginiai (18 pav.). Filogenetinių skirtumų tarp Kauno Nemuno upės C ir B mėginių neaptikta.



Taip pat buvo atlikta GPx6 pradmens molekulinų variacijų analizė, kurios rezultatai parodė, kad Lietuvoje rinktų *L. minor* vidupopuliacinė genetinė įvairovė yra 94 %, o tarppopuliacinė genetinė įvairovė – 6 % (19 pav.).



**19 pav.** *L. minor* procentinis molekulinės įvairovės pasiskirstymas su GPx6 pradmeniu

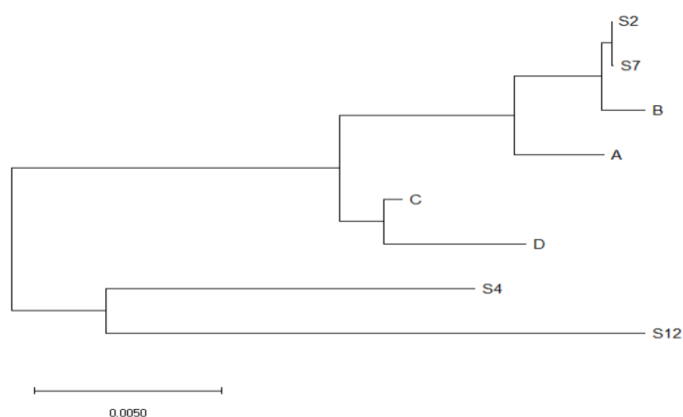
Atlikus visų *L. minor* mėginių sekoskaitą su GPx7 pradmeniu, buvo atrinkta po 4 mėginius, reprezentuojančius Nemuno (A, B, C, D) ir Neris (S2, S4, S7, S12) populiacijas (15 Lentelė).

**15 Lentelė.** GPx7 fragmento variabilios pozicijos ir nukleotidų pakaitos lyginant su referentine seka S2. Žalia spalva pažymėta GPx geno šešto egzono sritis, mėlyna – terminatoriaus sritis, o likusi – penkto introno sritis. Geltona spalva pažymėta Vilniaus Neris upės mėginiai, pilka spalva – Kauno Nemuno upės mėginiai.

	23	26	29	36	47	87	94	97	98	144	149	194	200	213	228	288	298	347	363	374	383	396	446	561	587	678	679	705	706	710	
S2	A	T	A	G	A	A	T	A	A	A	G	G	G	A	G	T	G	A	T	A	A	G	G	G	G	G	G	A	G	A	G
S4	G	A	.	.	C	T	G	C	C	G	A	.	A	G	A	A	.	T	G	C	.	.	A	C	T	.	.	.	.	.	
S7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
S12	.	.	T	T	.	.	G	C	C	G	A	C	A	G	A	A	A	T	.	.	T	A	.	C	.	.	.	.	.	.	
A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	G	.	
B	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.
C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	A	.	A	G	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	G	C	
D	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	A	G	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	G	A	.	C

Daugiausiai nukleotidų pakaitų aptikta introno srityje abiejose populiacijose, bet mažiau Kauno Nemuno upės mėginiuose. Egzono srityje pakaitų, lyginant su referentine S2 seka, aptikta tik tarp Vilniaus Neris upės surinktų mėginių, o terminatoriaus srityje pakaitų aptikta tik tarp Kauno Nemuno upės surinktų mėginių.

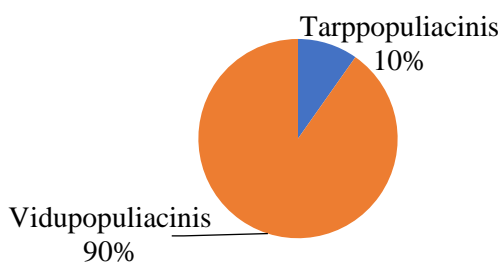
Filogenetinis sekų, pagausintų panaudojus GPx7 pradmenų porą, panašumas įvertintas pritaikius NJ metodą (20 pav.).



**20 pav.** GPx7 fragmento filogenetinis medis, atspindintis filogenetinius ryšius tarp laukinės populiacijos *L. minor* mėginių.

Analizuojant GPx7 fragmento filogenetinius atstumus tarp pasirinktų dviejų Lietuvos *L. minor* populiacijų, pastebimas mėginių pasiskirstymas į du pagrindinius klasterius. Viename klasteryje grupuojasi du Vilniaus Neries upės mėginiai (S4, S12), kitame klasteryje – likusių abiejų populiacijų mėginiai (20 pav.). Filogenetinių skirtumų tarp Vilniaus Neries upės S2 ir S7 mėginių neaptikta.

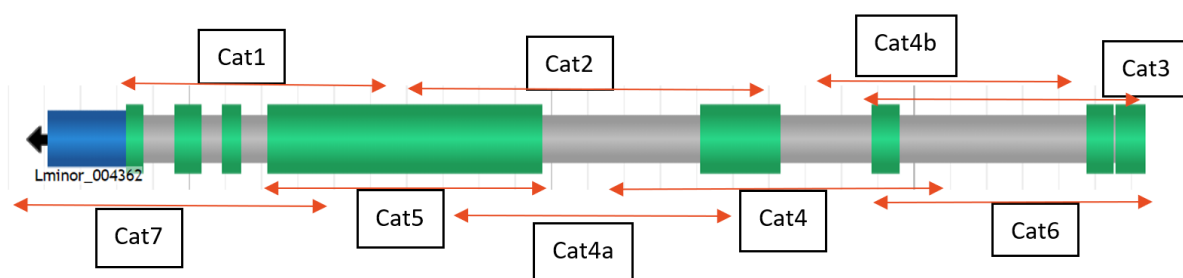
Atliktus GPx7 pradžios molekulinę variacijų analizę, gauti rezultatai parodė, kad Lietuvoje rinktų *L. minor* vidupopuliacinė genetinė įvairovė yra 90 %, o tarppopuliacinė genetinė įvairovė – 10 % (21 pav.).



**21 pav.** Procentinis molekulinės įvairovės pasiskirstymas tirtose *L. minor* populiacijose apskaičiuotas naudojant GPx7 pradmenų poras.

### 3.2.2. Katalazės žymenų įvertinimas

Tyrimui pasirinktas *L. minor* katalazės (Cat) fermentas katalizuoja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> skilimą į H<sub>2</sub>O ir O<sub>2</sub> (Sun et al., 2018), o jo geną sudaro aštuonios egzono ir septynios introno sritys (22 pav.). CoGe duomenų bazėje pateikta informacija, kad savo genetinė struktūra Cat genas yra panašus į katalazės izofermentą B (*Oryza sativa subsp. japonica*).



**22 Pav.** Katalazės genas. Žalia spalva pavaizduota egzono sritis, pilka spalva – introno, mėlyna promotoriaus sritis. Rodyklėmis pažymėtos atitinkamų fragmentų santykinis ilgis, kurių pagausinimui sukurtos pradmenų poros.

Cat geno ilgis yra 3788 bp, todėl norint atlikti viso geno sekoskaitą, tenka jį išskaidyti į mažesnius fragmentus, kurie persiklotų. Šiuo atveju buvo sukurti 9 fragmentai: Cat1, Cat2, Cat3, Cat4, Cat4a, Cat4b, Cat5, Cat6, Cat7 (16 Lentelė).

**16 Lentelė.** Cat geno fragmentų atitinkama pradmenų pora pagausinamų skirtingų sričių ilgiai bazių poromis (bp).

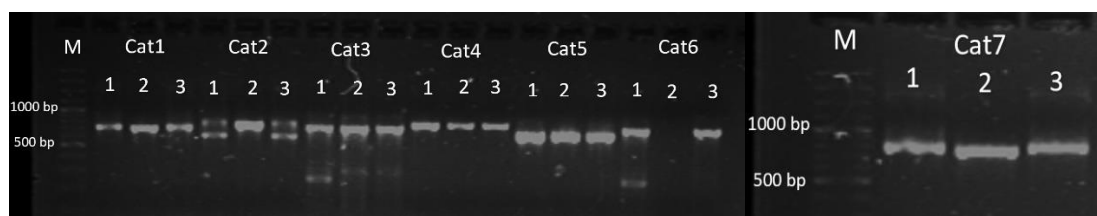
Fragmento pav.	Genų sritys ir jų dydžiai						Iš viso, bp		
Cat1	Intronas 1 52 bp	Egzonas 2 93 bp	Intronas 2 68 bp	Egzonas 3 67 bp	Intronas 3 92 bp	Egzonas 4 323 bp	<b>695</b>		
Cat2		Egzonas 4 83 bp	Intronas 4 545 bp	Egzonas 5 152 bp			<b>780</b>		
Cat3		Egzonas 6 17 bp	Intronas 6 645 bp	Egzonas 7 84 bp			<b>746</b>		
Cat4		Intronas 4 211 bp	Egzonas 5 277 bp	Intronas 5 304 bp			<b>792</b>		
Cat5			Egzonas 4 651 bp				<b>651</b>		
Cat6		Egzonas 6 17 bp	Intronas 6 645 bp	Egzonas 7 84 bp			<b>746</b>		
Cat7	Promotorius 269 bp	Egzonas 1 59 bp	Intronas 1 110 bp	Egzonas 2 93 bp	Intronas 2 68 bp	Egzonas 3 67 bp	Intronas 3 92 bp	Egzonas 4 27 bp	<b>785</b>
Cat4a			Egzonas 4 276 bp	Intronas 4 499 bp				<b>775</b>	
Cat4b			Intronas 5 88 bp	Egzonas 6 96 bp	Intronas 6 577 bp			<b>761</b>	

Optimizavus PGR sąlygas, kiekvienai pradmenų porai pasirinkta 35 ciklai, o pradmenų prikibimo temperatūros pateiktos 17 Lentelėje.

**17 Lentelė.** Cat geno sukurtų pradmenų prikibimo temperatūros.

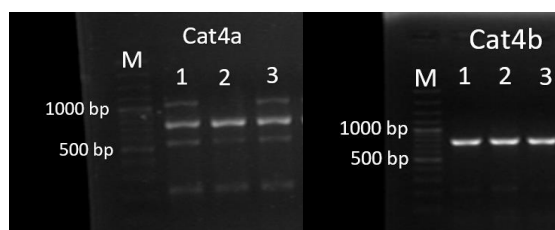
Pradmuo	Temperatūra pagal „Thermo Fisher“, °C	Taikyta temperatūra, °C	Optimaliausia temperatūra, °C
Cat1	54	53, 54, 55	55
Cat2	50	49, 50, 51	50
Cat3	56	55, 56, 57	57
Cat4	54	53, 54, 55	55
Cat4a	55	54, 55, 56	56
Cat4b	55	54, 55, 56	56
Cat5	56	55, 56, 57	56
Cat6	55	54, 55, 56	56
Cat7	56	55, 56, 57	56

Amplifikuoti PGR produktai buvo patikrinti atlikus elektroforezę agarozės gelyje (23 pav.). Patikrinus visus geno fragmentus, pagausintus naudojant atitinkamus pradmenis, kiekvienu atveju elektroforezės agarozės gelyje ryškiausios frakcijos dydis atitiko teorinį fragmento dydį.



**23 pav.** Cat1, Cat2, Cat3, Cat4, Cat5, Cat6, Cat7 fragmentų elektroforezė agarozės gelyje. 1 – S2, 2 – B, 3 – D, M – DNR dydžio standartas.

Švariausios sekos gautos su Cat4 pradmenų pora, todėl papildomai sukuriamos dvi pradmenų poros, kurios persiklotų su Cat4 fragmentu (24 pav.).



**24 pav.** Cat4a, Cat4b fragmentų elektroforezė agarozės gelyje. 1 – S2, 2 – B, 3 – D, M – DNR dydžio standartas.

Panaudojus Cat3 pradmenų porą, pagausintas didžiausias frakcijų skaičius, palyginus su kitomis pradmenų poromis. Panaudojus Cat6 pradmenų porą, gautas skirtingas frakcijų skaičius tirtų *L. minor* mėginių atveju. S2 mėginio atveju pagausintos dvi frakcijos, D mėginio atveju – viena frakcija, o B mėginio atveju – nei vienos frakcijos. Taip pat frakcijų skaičius skyrėsi panaudojus Cat2 pradmenų porą. S2 ir D mėginio atveju pagausinta dvi frakcijos, o B mėginio atveju – viena arba dvi, esančios arti vienas kito elektroforezės agarozės gelyje.

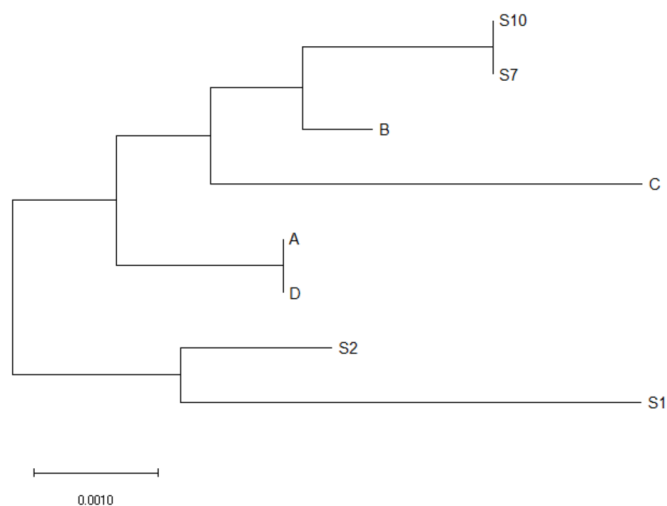
Kadangi panaudojus Cat2, Cat3, Cat6 pradmenų poras pagausinta daugiau negu viena frakcija, todėl DNR buvo gaunama iš elektroforezės gelio iškerpant norimą frakciją. Sekoskaitos rezultatai kiekvienu atveju parodė nešvarias sekas, todėl tokios sekos nebuvo tinkamos tolimesnei analizei. Taip pat nešvarios sekos gaunamos su Cat1 pradmenų pora naudojant Lietuvos laukinės populiacijos *L. minor* mėginius. Atlikus sekoskaitą su Cat5 pradmenų pora švarios sekos gaunamos tik S2, S7 ir B mėginio atveju. Dėl per mažo mėginių skaičiaus, Cat5 fragmentas atmestas kaip netinkamas. Tolimesnei analizei pasirinkti fragmentai su Cat4, Cat4b, Cat7 pradmenų poromis. Atlikus šio geno fragmentų sekoskaitą buvo gautos švarios sekos, kurios panaudotos tolimesnei analizei.

Fragmentai su Cat4 ir Cat4b pradmenų poromis persidengia Cat geno DNR sekoje. Sujungus šiuos du fragmentus, gauname Cat4-Cat4b fragmentą su dviem egzonais ir trimis intronais. Iš kiekvienos populiacijos atrinkta po 4 mėginius, kurie surinkti Nemune ties Kaunu (pažymėti A, B, C, D) ir Neryje ties Vilniumi (pažymėti S2, S1, S7, S10). Sekoskaitos rezultatai buvo palyginti tarpusavyje referentine seka pasirinkus mėginio S2 seką (18 Lentelė).

**18 Lentelė.** Cat4-Cat4b fragmento variabilios pozicijos ir nukleotidų pakaitos lyginant su referentine seka S2. Žalia spalva pažymėta Cat geno penkto ir šešto egzono sritys, o juodai – penkto ir šešto introno sritys. Geltona spalva pažymėta Vilniaus Neries upės mėginiai, pilka spalva – Kauno Nemuno upės mėginiai.

	191	258	430	668	704	748	843	894	944	1418
S2	G/A	G/A	A/G	G/A	A	C	A	G	G	G
S1	.	.	.	.	.	.	.	C	A	.
S7	.	.	G/A	.	G	G	.	.	.	.
S10	.	.	G/A	.	G	G	.	.	.	.
A	A/G	.	.	.	.	G	.	.	.	.
B	.	.	.	.	G	G	.	.	.	A
C	A/G	A/G	.	A/G	G	G	C	.	.	.
D	A/G	.	.	.	.	G	.	.	.	.

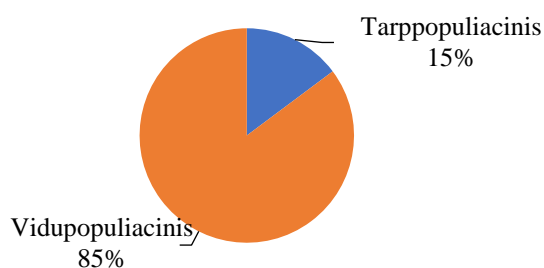
Sulyginus sekas pastebėta, kad variabiliausia sritis yra intronas (704, 748, 894, 944, 1418). Dvigubi pikai aptikti penkto egzono (191, 258, 430) ir penkto introno (668) srityje, kurių nukleotidai yra G arba A. Filogenetinis sekų, pagausintų su Cat4 ir Cat4b pradmenų poromis, panašumas įvertintas pritaikius NJ metodą (25 pav.).



**25 pav.** Cat4-Cat4b fragmento filogenetinis medis tarp laukinės populiacijos *L. minor* mėginių.

Analizuojant Cat4-Cat4b fragmento filogenetinius atstumus tarp pasirinktų dviejų Lietuvos *L. minor* populiacijų, pastebimas mėginių pasiskirstymas į du pagrindinius klasterius. Viena klasteryje grupuojasi du Vilniaus Neries upės mėginiai (S2, S1), kitame klasteryje – likusių abiejų populiacijų mėginiai (25 pav.). Filogenetinių skirtumų tarp Vilniaus Neries upės S10 ir S7 ir tarp Kauno Nemuno upės A ir D mėginių neaptikta.

Atliktus Cat4-Cat4b pradmens molekulinę variacijų analizę, gauti rezultatai parodė, kad Lietuvoje rinktų *L. minor* vidupopuliacinė genetinė įvairovė – 85 %, o tarppopuliacinė genetinė įvairovė – 15 % (26 pav.).



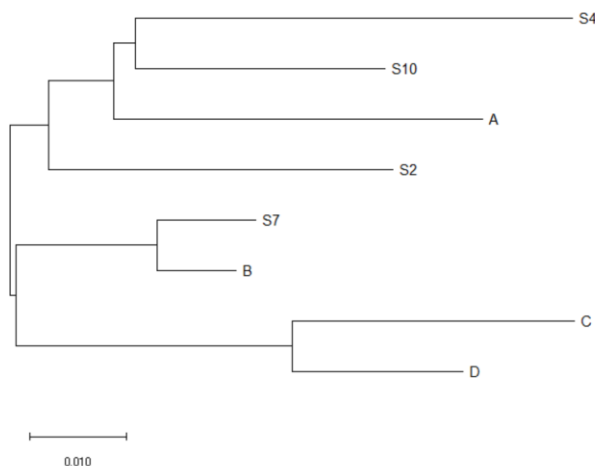
**26 pav.** Procentinis molekulinės įvairovės pasiskirstymas tirtose *L. minor* populiacijose apskaičiuotas naudojant Cat4-Cat4b sekas.

Buvo atlikta turimų laukinės populiacijos *L. minor* mėginių sekoskaita, panaudojant Cat7 pradmenų porą. Iš kiekvienos populiacijos atrinkta po 4 mėginius, kurie buvo surinkti Nemune ties Kaunu (pažymėti A, B, C, D) ir Neryje ties Vilniumi (pažymėti S2, S4, S7, S10). Sekoskaitos rezultatai buvo palyginti tarpusavyje referentine seka pasirinkus mėginio S2 seką (19 Lentelė).

**19 Lentelė.** Cat7 fragmento variabilios pozicijos ir nukleotidų pakaitos lyginant su referentine seka S2. Žalia spalva pažymėta Cat geno trečio egzono sritys, mėlyna – promotoriaus sritys, o likusi – antro ir trečio introno sritys. Geltona spalva pažymėta Vilniaus Neries upės mėginiai, pilka spalva – Kauno Nemuno upės mėginiai.

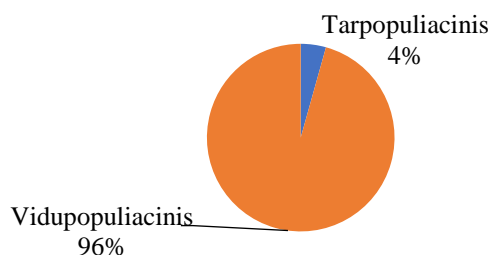
	71	72	73	74	111	226	229	569	623	625	627	629	630	631	632	634	635	636	637	639	640	641	642	644	645	647	648	649	651	653	660	662	663	664	665	666	667	669	671	672	673	674	677	681	682	683	688	689	690	693	694	696	697	698	700	701	702	704	708	709	712
S2	T	C	T	C	G	G	G	G	A	A	A	C	T	G	T	T	C	G	A	A	G	A	G	G	A	C	T	G	A	C	C	C	G	C	G	G	C	T	T	A	G	T	T	C	T	C	A	G	A	G	A	A	C	T	T	A	C	A	T	A	G
S4	.	.	.	.	.	.	.	.	G	G	G	G	A	.	A	A	G	A	G	.	A	C	A	A	G	A	A	.	G	.	T	.	A	.	A	T	.	A	T	.	.	.	C	T	.	A	T	C	T	T	.	.	C	.	.	.	G	.	.		
S7	.	.	.	.	A	.	.	.	G	G	G	G	A	.	.	.	.	T	G	C	.	C	.	.	A	.	C	.	T	T	C	.	.	C	T	.	C	.	T	A	.	.	.	.	T	C	.	.	.	.	.	T	.	G	.	.					
S10	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	G	G	A	.	.	A	.	A	G	.	A	C	A	A	T	A	.	C	G	A	T	.	A	.	C	T	.	A	.	.	C	.	C	T	.	T	C	T	T	.	.	C	.	.	.	G	.	.			
A	G	T	C	T	.	A	.	.	G	.	G	A	C	C	.	.	A	.	.	.	C	A	A	T	A	.	C	G	A	T	.	A	G	.	C	T	.	A	.	.	.	.	C	T	.	A	T	C	G	.	.	.	C	.	.	.	G	.	.		
B	.	.	.	.	.	.	.	.	G	G	G	G	A	.	.	.	T	G	.	C	.	.	A	.	C	G	.	T	T	C	G	.	C	T	.	A	.	.	.	.	T	C	.	.	.	.	.	.	T	.	G	.	.								
C	.	.	.	.	A	C	C	-	C	G	.	C	C	G	A	.	C	G	.	A	C	.	.	A	.	A	.	A	.	A	T	.	C	T	C	C	.	G	A	G	.	A	T	.	A	T	.	.	G	A	G	C	A	T	C	.	T				
D	.	.	.	.	A	C	C	-	C	G	.	C	C	G	A	.	C	G	.	A	C	.	.	A	.	A	.	A	.	A	G	A	T	.	C	T	C	C	.	G	A	G	C	.	.	T	.	T	.	T	C	.	.	G	A	G	.	T	C	C	.

Sulyginus sekas pastebėta, kad didžiausias variabilumas aptinkamas trečio egzono ir trečio introno srityje. Pirmo introno bei pirmo ir antro egzono srityje nukleotidų pakitimų neaptikta. Filogenetinis sekų, pagausintų panaudojus Cat7 pradmenų porą, panašumas įvertintas pritaikius NJ metodą (27 pav.).



**27 pav.** Cat7 fragmento filogenetinis medis, atspindintis filogenetinius ryšius tarp laukinės populiacijos *L. minor* mėginių.

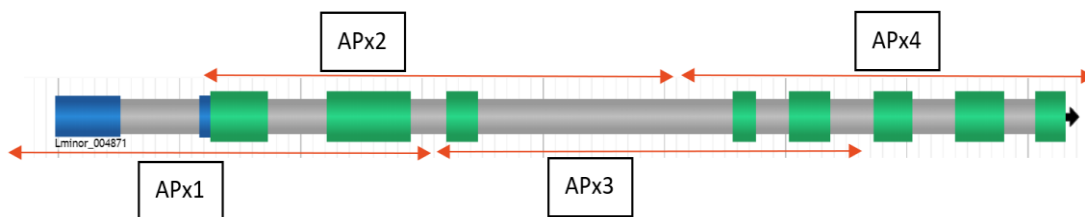
Gauti rezultatai parodė, kad Neryje ties Vilniumi ir Nemune ties Kaunu surinkti mėginiai grupuojasi į du pagrindinius klasterius nepriklausomai nuo geografinės kilmės. Filogenetiškai artimiausi yra Vilniaus Neries S2 ir Kauno Nemuno B mėginiai. Atliktus Cat7 pradmens molekulinį variacijų analizę, gauti rezultatai parodė, kad Lietuvoje rinktų *L. minor* vidupopuliacinė genetinė įvairovė yra 96 %, o tarp populiacinė genetinė įvairovė – 4 % (28 pav.).



**28 pav.** *L. minor* procentinis molekulinės įvairovės pasiskirstymas su Cat7 pradmeniu.

### 3.2.3. Askorbato peroksidazės žymenų įvertinimas

Tyrimui pasirinktas *L. minor* askorbato peroksidazės genas (29 pav.), koduojantis fermentą, kuris mažina H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koncentraciją ląstelėse, bei svarbus augimo reguliacijai (Teixeira et al., 2006). Šis genas susideda iš aštuonių egzono ir aštuonių introno sričių. Savo genetinė struktūra APx genas yra panašus į askorbato peroksidazės 2 geną (*Oryza sativa subsp. japonica*).



**29 pav.** Askorbato peroksidazės genas. Žalia spalva pavaizduota egzono sritis, pilka spalva – introno, mėlyna – promotoriaus sritis. Rodyklėmis pažymėti atitinkamų pradmenų pagalba pagausinami geno fragmentai.

Kadangi šio geno ilgis yra 2085 bp, todėl norint atlikti viso geno sekoskaitą, tenka jį išskaidyti į mažesnius fragmentus, kurie persiklotų. Šiuo atveju gaunasi 4 fragmentai: APx1, APx2, APx3, APx4. Kiekviename fragmente su sukurtais pradmenų poromis įeina bent dvi egzonų ir dvi intronų sritys (20 Lentelė).

**20 Lentelė.** APx geno fragmentų atitinkama pradmenų pora pagausinamų skirtingų sričių ilgiai bazių poromis (bp).

Fragmento pav.	Genų sritys ir jų dydžiai	Iš viso, bp
APx1	Promotorius 1 135 bp   Intronas 1 163 bp   Promotorius 2 22 bp   Egzonas 1 118 bp   Intronas 2 121 bp   Egzonas 2 136 bp	695
APx2	Egzonas 1 87 bp   Intronas 2 121 bp   Egzonas 2 174 bp   Intronas 3 73 bp   Egzonas 3 65 bp   Intronas 4 260 bp	780
APx3	Egzonas 3 65 bp   Intronas 4 526 bp   Egzonas 4 48 bp   Intronas 5 68 bp   Egzonas 5 39 bp	746
APx4	Egzonas 4 43 bp   Intronas 5 68 bp   Egzonas 5 85 bp   Intronas 6 90 bp   Egzonas 6 79 bp   Intronas 7 88 bp   Egzonas 7 102 bp   Intronas 8 64 bp   Egzonas 8 173 bp	792

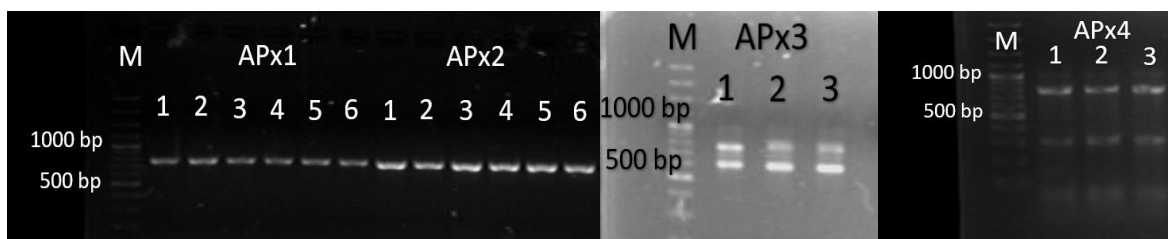


Optimizavus PGR sąlygas pasirinkta 35 ciklai, o pradmenų prikibimo temperatūros kiekvienai pradmenų porai pateiktos 21 Lentelėje.

**21 Lentelė.** APx pradmenų prikibimo temperatūros

Pradmuo	Temperatūra pagal „ThermoFisher“, °C	Taikyta temperatūra, °C	Optimaliausia temperatūra, °C
APx1	56	55, 56, 57	56
APx2	57	56, 57, 58	56
APx3	59	58, 59, 60	59
APx4	58	57, 58, 59	59

Amplifikuoti PGR produktai buvo patikrinti atlikus elektroforezę agarozės gelyje (30 pav.). Patikrinus visus geno fragmentus, pagausintus naudojant atitinkamus pradmenis, kiekvienu atveju elektroforezės agarozės gelyje ryškiausias frakcijos dydis atitiko teorinį fragmento dydį.



**30 pav.** APx1, APx2, APx3, APx4 fragmentų elektroforezė agarozės gelyje. 1 – S2, 2 – S4, 3 – B, M – DNR dydžio standartas.

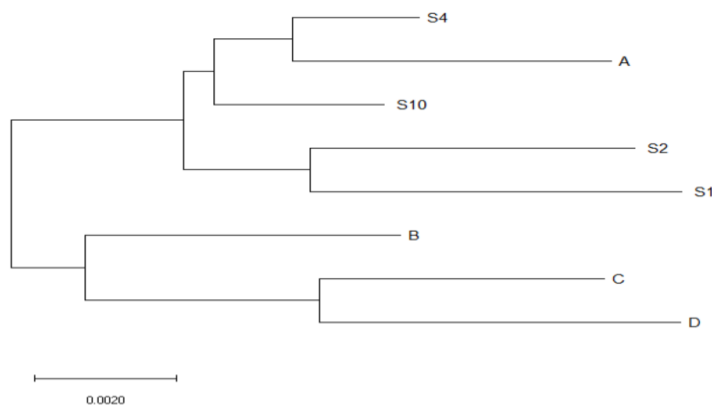
Panaudojus APx1 ir APx2 pradmenų poras pagausinta viena frakcija. Panaudojus Apx3 ir Apx4 pradmenų poras kiekvieno tirto *L. minor* mėginio atveju pagausinta po dvi frakcijas. Dėl atsiradusių nespecifinių produktų su Apx3 ir Apx4 pradmenų poromis iš elektroforezės gelio buvo iškirpti fragmentai, kurie atitiko teorinį fragmento dydį, išskirta DNR ir atlikta sekoskaita. Sekoskaitos rezultatai kiekvienu atveju parodė nešvarias sekas, todėl tokios sekos nebuvo tinkamos tolimesnei analizei. Tolimesnei analizei pasirenkamos Apx1 ir Apx2 pradmenų poros, su kuriomis gaunamos švarios sekos.

Fragmentai su Apx1 ir Apx2 pradmenų poromis yra persidengia APx geno DNR sekoje. Sujungus šiuos du fragmentus, gaunamas Apx1-Apx2 fragmentas su promotoriumi, trimis egzonais ir keturiais intronais. Iš kiekvienos populiacijos atrinkta po 4 mėginius, kurie surinkti Nemune ties Kaunu (pažymėti A, B, C, D) ir Neryje ties Vilniumi (pažymėti S2, S1, S4, S10). Sekoskaitos rezultatai buvo palyginti tarpusavyje referentine seka pasirinkus mėginio S2 seką (22 Lentelė).

**22 Lentelė.** APx1-APx2 fragmento variabilios pozicijos ir nukleotidų pakaitos lyginant su referentine seka S2. Žalia spalva pažymėta antro egzono sritis, mėlyna – promotoriaus sritis, o likusi – pirmo trečio ir ketvirto introno sritys. Geltona spalva pažymėta Vilniaus Neries upės mėginiai, pilka spalva – Kauno Nemuno upės mėginiai.

	25	26	27	53	54	55	70	79	81	88	92	96	103	107	114	291	589	664	945	1115	1366
<b>S2</b>	T	C	A	A	A	G	A	T	C/G	C/A	T	T	C/T	T	G/A	T/C	G	T/A	G	A/T	A/G
<b>S1</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	G/C	.	.	.	.	.	A/G	C/T	.	.	.	.	G/A
<b>S4</b>	.	.	.	.	.	.	.	A	G/C	A/C	.	.	T/C	.	A/G	C/T	.	.	.	T/A	.
<b>S10</b>	.	.	.	.	.	.	.	A	G/C	A/C	.	.	T/C	.	A/G	C/T	.	A/T	.	.	G/A
<b>A</b>	.	.	.	.	.	.	.	A	G/C	A/C	.	.	.	.	A/G	C/T	T	.	T	T/A	.
<b>B</b>	C	.	.	T	G	T	.	A	G/C	A/C	.	.	.	.	A/G	C/T	.	A/T	.	.	.
<b>C</b>	C	.	.	T	G	T	C	C	.	A/C	A	G	.	G	A/G	.	T	.	T	.	G/A
<b>D</b>	.	T	G	T	G	T	C	.	.	A/C	A	.	T/C	.	A/G	.	T	.	T	.	.

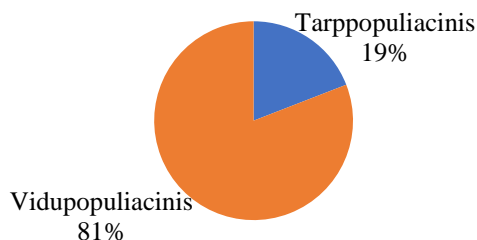
Palyginus mėginius tarpusavyje pastebėta nukleotidų pakaitų promotoriaus, egzono ir introno srityse. Variabiliausia yra promotoriaus sritis, ypač daug nukleotidų pakaitų nustatyta Nemune ties Kaunu surinktuose B, C ir D mėginiuose. Apx1-Apx2 fragmentui, pagausintam panaudojus Apx1 ir Apx2 pradmenų poras, aptikti dvigubi pikai esantys promotoriaus (81, 88, 103, 114), introno (291, 1115, 1366) ir egzono (664) srityse (22 Lentelė). Filogenetinis sekų, panašumas įvertintas pritaikius NJ metodą (31 pav.).



**31 pav.** APx1-APx2 fragmento filogenetinis medis.

Analizuojant APx1-APx2 fragmento filogenetinius atstumus tarp pasirinktų dviejų Lietuvos *L. minor* populiacijų, pastebimas mėginių pasiskirstymas į du pagrindinius klasterius. Viena klasteryje grupuojasi trys Kauno Nemuno upės mėginiai (B, C, D), kitame klasteryje – likusių abiejų populiacijų mėginiai (31 pav.). Filogenetiškai artimiausi yra Vilniaus Neries S2 ir S1 mėginiai.

Atlikus APx1-APx2 fragmento molekulinę variacijų analizę, gauti rezultatai parodė, kad Lietuvoje rinktų *L. minor* vidupopuliacinė genetinė įvairovė yra 81 %, o tarppopuliacinė genetinė įvairovė – 19 % (32 pav.).



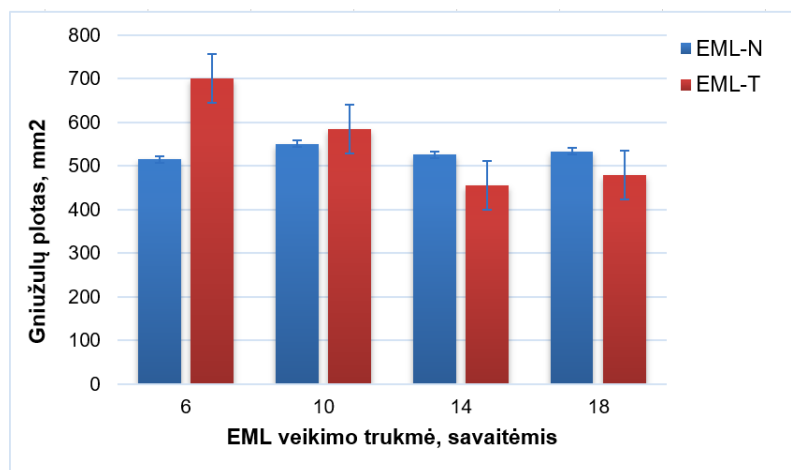
**32 pav.** *L. minor* procentinis molekulinės įvairovės pasiskirstymas su APx1-APx2 pradmenimis.

### 3.3. Genetinių žymenų analizė su EML paveiktais *L. minor* klonais

Atlikus turimų laukinės populiacijos *L. minor* sekoskaitą naudojant GPx6, GPx7, Cat4, Cat4b, Cat7, Apx1 ir Apx2 pradmenų poras, švariausios sekos gautos su Vilniaus Neries S2 mėginiu, kuris pasirinktas EML poveikio tyrimui.

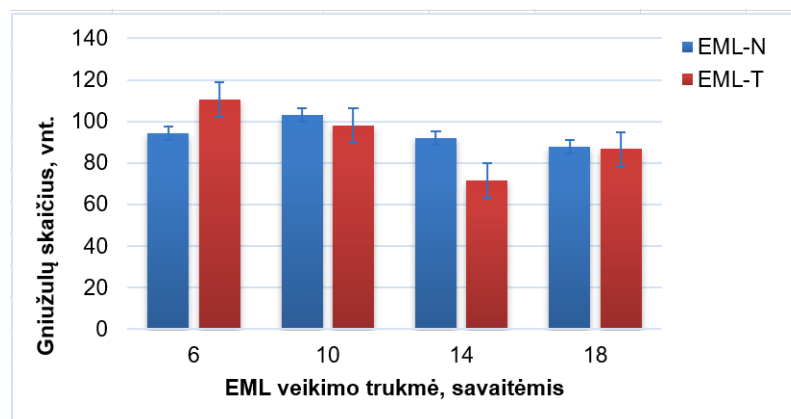
S2 klonai buvo auginami Petri lėkštelėse ant ričių veikiant augalus EML tiesiogiai (pažymėti EML-T), o nuotolinį EML poveikį patiriantys S2 klonai (pažymėti EML-N) buvo auginami 1,5 m atstumu nuo EML generuojančių ričių. Tyrimo trukmė - 18 savaičių, tyrimo metu srovės stiprumas didintas nuo 1,2 mA (1-3 savaitės), 2,4 mA (4-11 savaičių) iki 0,4 A (12-18 savaičių). Matuojamas gniūžulų plotas, gniūžulų skaičius, žaliasis svoris po 6, 10, 14 ir 18 savaičių bei stebimas DNR sekų, padaugintų su Cat4, Cat7, GPx6, APx1 pradmenų poromis, nukleotidų pokytis.

Pastebimas neigiamas poveikis augalų gniūžulų plotui, veikiant S2 klonus tiesiogine elektromagnetine spinduliuote. O *L. minor* klonuose, augančių 1,5 m atstumu nuo EML šaltinio (EML-N), nepastebėta didelių pokyčių skaičiuojant gniūžulų plotą, kuris svyravo nuo 560 mm<sup>2</sup> iki 510 mm<sup>2</sup> (33 pav.).



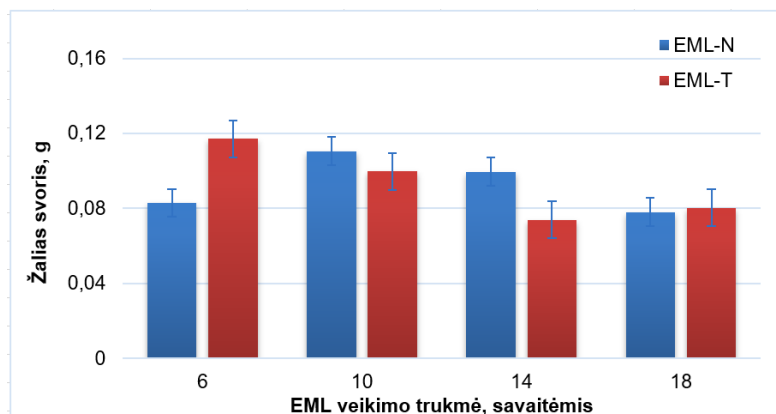
**33 pav.** Gniužulų plotų vidurkiai. EML-T – augalų, veikiamų tiesioginės elektromagnetinės spinduliuotės, EML-N – augalų, veikiamų netiesioginės elektromagnetinės spinduliuotės.

Skaičiuojant augalų gniužulų skaičių Petri lėkštelėse, pastebimas taip pat neigiamas poveikis elektromagnetinės spinduliuotės. Veikiant augalus netiesiogine elektromagnetine spinduliuote gniužulų skaičius išlieka pakankamai stabilus, kuris svyruoja nuo 90 iki 105 vienetų vienoje Petri lėkštelėje (34 pav.).



**34 pav.** Gniužulų skaičiaus vidurkis. EML-T – augalų, veikiamų tiesioginės elektromagnetinės spinduliuotės, EML-N – augalų, veikiamų netiesioginės elektromagnetinės spinduliuotės.

Pastebimas neigiamas poveikis augalų žaliajam svoriui, veikiant S2 klonus tiesiogine elektromagnetine spinduliuote. Netiesioginis EML stimuliuoja žalio svorio augimą nuo 0,08 g (6 sav.) iki 0,10 g (10 sav.), kai srovės stiprumas – 2,4 mA, o po 14 ir 18 savaičių pastebimas žalio svorio sumažėjimas nuo 0,10 g iki 0,08 g, kai srovės stiprumas padidintas iki 0,4 A (35 pav.).



**35 pav.** *L. minor* žalias svoris. EML-T – augalų, veikiamų tiesioginės elektromagnetinės spinduliuotės, EML-N – augalų, veikiamų netiesioginės elektromagnetinės spinduliuotės.

Analizuojant genų žymenis, koduojantys antioksidantinius fermentus, pastebėta, kad su visais tirtais laukinės populiacijos *L. minor* mėginiais švariausios sekos gaunamos naudojant Cat4 pradmenų porą. Šis žymuo pasirenkamas ir eksperimentinių klonų tyrimui, susijusiu su elektromagnetine spinduliuote. DNR buvo išskiriama po 1, 6, 14, 18 savaitių, palyginama tarpusavyje su pasirinkta S2 referentine seka (23 Lentelė).

**23 Lentelė.** Cat4 fragmentų variabilios pozicijos ir nukleotidų pakaitos lyginant augalų paveiktų EML su referentine seka S2. EML-T – augalų, veikiamų tiesioginės elektromagnetinės spinduliuotės, EML-N – augalų, veikiamų netiesioginės elektromagnetinės spinduliuotės. Žalia spalva pažymėta egzono sritis, likusi – intronas.

Laikas	S2	194	206	319	714	EML sąlygos
		C	G	G	G	
1 savaitė	EML-N1	.	.	A	.	50 Hz, 1,2 mA
	EML-T1	.	A	.	.	
	EML-N2	.	.	.	.	
	EML-T2	.	.	.	A	
6 savaitė	EML-N1	T	.	.	.	50 Hz, 2,4 mA
	EML-T1	.	.	.	.	
	EML-N2	.	.	.	.	
	EML-T2	.	.	.	.	
14 savaitė	EML-N1	.	.	.	.	50 Hz, 0,4 A
	EML-T1	.	.	.	.	
	EML-N2	.	.	.	.	
	EML-T2	.	.	.	.	
18 savaitė	EML-N1	.	.	.	.	50 Hz, 0,4 A
	EML-T1	.	.	.	.	
	EML-N2	.	.	.	.	
	EML-T2	.	.	.	.	

Fragmentuose, pagausintus su Cat4 pradmenų pora, nukleotidų pakaitos pastebėta trijose pozicijose (206, 319, 714) po 1 savaitės nepriklausomai nuo elektromagnetinės spinduliuotės

poveikio atstumo, o po 6 savaičių aptikta tik viena nukleotidų pakaita *L. minor* klone, veikiant netiesioginiu EML. Po 14 ir 18 savaičių nukleotidų pakaitų neaptikta.

Nagrinęjant literatūroje pateikta informacija pastebėta, kad antioksidantinių fermentų genų promotoriuose aptikta nukleotidų pakaitos, kai organizmas patiria oksidacinį stresą (Lubos et al., 2011, Chistiakov et al., 2006). Nors žemo dažnio EML nepadidina reaktyviųjų deguonies formų koncentraciją ląstelėje, bet nėra atlikta išsamių tyrimų, kai organizmas veikiamas ilgą laiką žemo dažnio EML. Šiame tyrime pasirenkami antioksidantinių genų fragmentai, kuriuose yra promotoriaus sritys: GPx geno fragmentas (12 Lentelė), padaugintas su GPx6 pradmenų pora, Cat geno fragmentas (16 Lentelė), padaugintas su Cat7 pradmenų pora ir Apx geno fragmentas (20 Lentelė), padaugintas su Apx1 pradmenų pora. DNR buvo išskiriama po 14 ir 18 savaičių, palyginama tarpusavyje ir su pasirinkta S2 referentine seka.

Fragmentuose, pagausintus su GPx6 pradmenų pora, nukleotidų pakaitos pastebėtos keturiose pozicijose (83, 86, 866, 881) po 14 savaičių ir šešiose pozicijose (83, 84, 85, 866, 880, 881) po 18 savaičių paveiktuose EML S2 klonuose nepriklausomai nuo elektromagnetinės spinduliuotės poveikio atstumo (24 Lentelė).

**24 Lentelė.** GPx6 fragmentų variabilios pozicijos ir nukleotidų pakaitos lyginant augalų paveiktų EML su referentine seka S2. EML-T – augalų, veikiamų tiesioginės elektromagnetinės spinduliuotės, EML-N – augalų, veikiamų netiesioginės elektromagnetinės spinduliuotės. Mėlyna spalva pažymėta promotoriaus sritis, likusi – intronas.

Laikas	S2	83	84	85	86	866	880	881	EML sąlygos
		A	G	C	T	T	G	T	
14 savaitė	EML-N1	C	.	.	C	A	.	.	50 Hz, 0,4 A
	EML-T1	C	.	.	C	A	.	C	
	EML-N2	C	.	.	.	A	.	.	
	EML-T2	C	.	.	.	A	.	.	
18 savaitė	EML-N1	G	C	T	.	A	T	.	
	EML-T1	G	C	T	.	A	T	C	
	EML-N2	G	C	T	.	A	T	C	
	EML-T2	G	C	T	.	A	T	.	

Fragmentuose, pagausintus su Cat7 pradmenų pora, nukleotidų pakaitų neaptikta po 14 savaičių, o po 18 savaičių pastebėta nukleotidų pakaitų keturiose pozicijose (170, 464, 606, 614) S2 klonuose nepriklausomai nuo elektromagnetinės spinduliuotės poveikio atstumo (25 Lentelė).

**25 Lentelė.** Cat7 fragmentų variabilios pozicijos ir nukleotidų pakaitos lyginant augalų paveiktų EML su referentine seka S2. EML-T – augalų, veikiamų tiesioginės elektromagnetinės spinduliuotės, EML-N – augalų, veikiamų netiesioginės elektromagnetinės spinduliuotės. Mėlyna spalva pažymėta promotoriaus sritis, žalia spalva – egzono, likusi – introno sritis.

Laikas	S2	170	464	606	614	EML sąlygos
		C	G	A	A	
14 savaitė	EML-N1	.	.	.	.	50 Hz, 0,4 A
	EML-T1	.	.	.	.	
	EML-N2	.	.	.	.	
	EML-T2	.	.	.	.	
18 savaitė	EML-N1	T	.	.	T	
	EML-T1	T	.	.	.	
	EML-N2	.	T	T	.	
	EML-T2	.	.	.	.	

Fragmentuose, pagausintus su Apx1 pradmenų pora, nukleotidų pakaitos pastebėtos penkiose pozicijose (79, 199, 204, 252, 258) po 14 savaitės ir septyniose pozicijose (79, 92, 203, 204, 252, 258, 284) po 18 savaitės S2 klonuose nepriklausomai nuo elektromagnetinės spinduliuotės poveikio atstumo (26 Lentelė).

**26 Lentelė.** APx1 fragmentų variabilios pozicijos ir nukleotidų pakaitos lyginant augalų paveiktų EML su referentine seka S2. EML-T – augalų, veikiamų tiesioginės elektromagnetinės spinduliuotės, EML-N – augalų, veikiamų netiesioginės elektromagnetinės spinduliuotės. Mėlyna spalva pažymėta promotoriaus sritis, likusi – introno sritis.

Laikas	S2	79	92	199	203	204	252	258	284	EML sąlygos
		T	T	A	T	C	T	G	A	
14 savaitė	EML-N1	.	.	.	.	A	A	.	.	50 Hz, 0,4 A
	EML-T1	A	.	G	.	.	.	A	.	
	EML-N2	A	.	.	.	.	.	.	.	
	EML-T2	A	.	.	.	.	A	.	.	
18 savaitė	EML-N1	A	A	.	.	.	.	A	.	
	EML-T1	A	A	.	C	.	.	.	.	
	EML-N2	A	A	.	C	.	.	.	G	
	EML-T2	A	A	.	C	A	A	.	.	

### 3.4. Rezultatų aptarimas

Darbo metu buvo analizuojami penki chloroplasto nekoduojančių sekų mikrosatelitiniai žymenys siekiant įvertinti filogenetinius ryšius bei molekulinės įvairovės pasiskirstymą dviejose *L. minor* Lietuvos populiacijose. Ištyrus 4 mėginius, paimtus iš Neries ties Vilniumi ir 4 mėginius, paimtus iš Nemuno ties Kaunu, nustatyta, kad L4, L7, L16 ir L19 žymenų pasikartojantis motyvas išlieka nepakitęs visuose tirtuose mėginiuose, nepriklausomai nuo populiacijos. Nors šie žymenys yra

pateikiami kaip tinkami genetinės įvairovės tyrimams dėl jų pasikartojančio motyvo skaičiaus variabilumo (Wani et al., 2014), bet su šio magistrinio darbo metu tirtaisiais mėginiais minėtų žymenų pasikartojančio motyvo skaičiaus variacijos neaptiktos nė viename tirtame lokuse, todėl vien fragmentų ilgio palyginimas nepakankamai informatyvus, siekiant atskleisti skirtumus tarp populiacijų. Nagrinėjant nukleotidų pakaitas tarp laukinės populiacijos *L. minor* mėginių, pastebėta, kad L4, L14, L16 lokusuose aptinkama bent po vieną dvigubą piką, o tai apsunkina rezultatų interpretavimą (7, 9, 10 Lentelės), o L7 ir L19 lokusuose neaptikta nukleotidų pakaitų tarp nagrinėjamų mėginių.

Analizuojant filogenetinius ryšius, rekonstruotus remiantis skirtingų lokusų DNR fragmentais, atskleista mėginių grupavimosi į du atskirus klasterius tendencija. Grupavimasis dalinai paremtas mėginių geografiniu pasiskirstymu, tačiau neretai mėginiai, surinkti skirtingose upėse pasirodo esantys filogenetiškai artimesni lyginant su kitais tos pačios populiacijos atstovais. Tai gali būti susieta su genetinės medžiagos pernešimu dėl natūralaus plūdenų plukdymo pasroviui arba netgi dėl pernešimo, susijusio su vandens paukščių perskridimais iš vieno vandens telkinio į kitą.

Apibendrinant šio magistrinio darbo dalies rezultatus galima konstatuoti, kad L4, L14, L16 mikrosatelitinių žymenų informatyvumas potencialiai yra pakankamas, siekiant šiuos žymenis panaudoti *L. minor* populiaciniuose genetiniuose tyrimuose. O L7 ir L19 žymenyse neaptikta variabilių pozicijų, kad būtų galima pritaikyti genetinės įvairovės tyrimuose. Kadangi visuose lokusuose mikrosatelitinių motyvų skaičius pasirodė esą stabilūs, pagrindinį genetinės įvairovės mastą atskleidžia nukleotidų pakaitos ne mikrosatelitinius motyvus talpinančiose DNR fragmentų dalyse, tad siekiant sukaupti pakankamai informacijos statistinei duomenų analizei naudojant chloroplasto DNR žymenis, talpinančius nekoduojančius mikrosatelitinius pasikartojimus apimančias sekas, rekomenduotina generuoti molekulinis duomenis vietoje pagausintų fragmentų ilgio nustatymo kaupiant bei analizuojant DNR sekoskaitos rezultatus.

Siekiant įvertinti koduojančių baltymus DNR sekų variabilumą darbo metu buvo tiriami trys genai, koduojantys baltymus, pasižyminčius antioksidantinėmis savybėmis (GPx, Cat ir APx) siekiant nustatyti informatyvius genetinius žymenis, tinkamus laukinės populiacijos ir eksperimentinių klonų genetinės įvairovės tyrimams. Nagrinėjant GPx geno DNR sekas pastebėta, kad sukurtos pradmenų poros neleido pagausinti švarių DNR fragmentų tiek egzono (GPx1, GPx2, GPx3), tiek introno (GPx4, GPx5) srityse laukinėje *L. minor* populiacijoje. Tolimesnei analizei atrinktos GPx6 ir GPx7 pradmenų poros, kurių pagalba pagausintos DNR sekos buvo pakankamai švarios bei suteikė galimybę palyginti jas tarpusavyje, referentine seka pasirinkus S2 mėginio seką.



Nustatyta, kad introno sritys yra variabilesnės, palyginus su egzono, promotoriaus ir terminatoriaus sritimis.

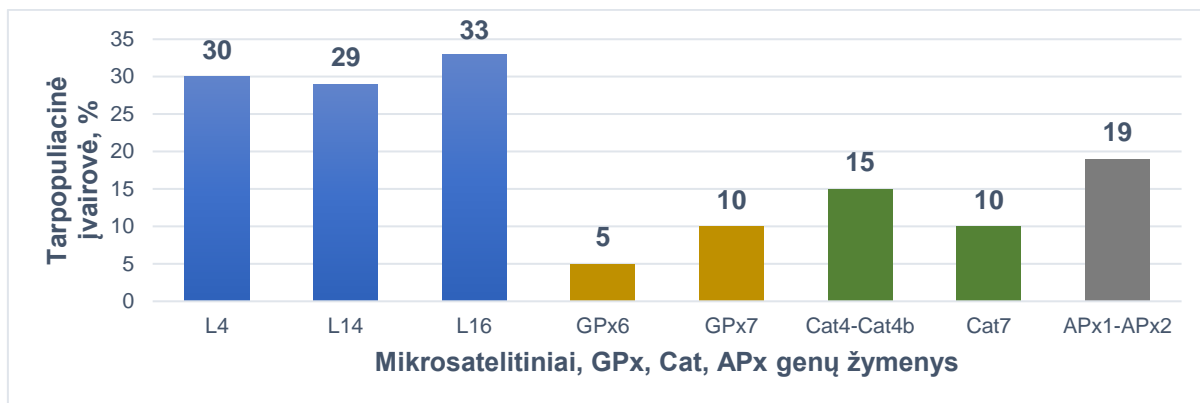
Analizuojant filogenetinius ryšius, rekonstruotus remiantis dviejų fragmentų, pagausintų su GPx6 ir GPx7 pradmenų poromis, atskleista mėginių grupavimosi į du atskirus klasterius tendencija (18, 20 pav.), kurių pasiskirstymas nepriklausė nuo geografinės padėties. Gauti rezultatai rodo, kad tarp tirtų laukinės populiacijos *L. minor* mėginiai, kuriems būdingos skirtingos bet filogenetiškai artimos GPx geno sekos nėra aptinkamos priklausomai nuo geografinės kilmės.

Nagrinėjant Cat geno DNR sekas buvo sukurtos devynios pradmenų poros, kurių specifiškumas išbandytas tiriant mėginius, reprezentuojančius genetinę įvairovę, aptinkamą laukinėje *L. minor* populiacijoje. Tolimesnei analizei atrinktos Cat4, Cat4b ir Cat7 pradmenų poros, kurių DNR sekos palygintos tarpusavyje referentine seka pasirinkus S2 mėginio seką. Variabilios sritys nustatytos introno ir egzono srityse. Cat geno penktame egzone aptikta dvigubų pikų (18 Lentelė). Trečiame egzone Cat geno srityje, padauginto su Cat7 pradmenų pora, aptiktas didelis nukleotidų pakaitų skaičius, dėl gautų nešvarių sekų (19 Lentelė). Tikėtina, kad sukurta Cat7 pradmenų pora specifiškai jungiasi ne vienoje geno srityje.

Analizuojant filogenetinius ryšius, rekonstruotus remiantis dviejų fragmentų, pagausintų su Cat4, Cat4b, Cat7 pradmenų poromis, atskleista mėginių grupavimosi į du atskirus klasterius tendencija (25, 27 pav.). Toks grupavimasis dalinai paremtas mėginių geografiniu pasiskirstymu, tačiau neretai mėginiai, surinkti skirtingose upėse pasirodo esantys filogenetiškai artimesni lyginant su kitais tos pačios populiacijos atstovais.

Nagrinėjant APx geno DNR sekas buvo sukurtos keturios pradmenų poros, kurių specifiškumas išbandytas laukinėje *L. minor* populiacijoje. Tolimesnei analizei atrinktos APx1 ir APx2 pradmenų poros, kurių fragmentai persikloja. Daugiausiai nukleotidų pakaitų aptikta promotoriaus srityje (11 pozicijų) palyginus su egzono (1 pozicija) ir introno (1 pozicija) sritimis (22 Lentelė). Analizuojant APx1-APx2 filogenetinius ryšius pastebėta, kad grupavimasis į klasterius dalinai pasiskirsto pagal geografinę kilmę.

Magistrinio darbo metu antioksidantinei sistemai priklausančius baltymus koduojančių genų fragmentų, pagausintų naudojant GPx6, GPx7, Cat4, Cat4b, Cat7, Apx1, Apx2 pradmenis genetinės įvairovės tyrimo rezultatai buvo palyginti tarpusavyje bei su chloroplasto nekoduojančių sekų mikrosatelitinių fragmentų, pagausintų su L4, L14, L16 pradmenimis analogiškais genetinės įvairovės parametrais (AMOVA testo rezultatais) (36 pav.).



**36 pav.** Tarppopuliacinė genetinė įvairovė nustatyta AMOVA metodu palyginus Neryje ties Vilniumi ir Nemune ties Kaunu surinktus *L. minor* mėginius.

Gauti rezultatai parodo, kad didžiausia tarppopuliacinė įvairovė aptinkama naudojant mikrosatelitinius žymenis. Buvo pastebėta, kad L4, L14, L16 žymenyse esančios nukleotidų pakaitos ne mikrosatelitinių motyvų srityse lemia genetinius skirtumus tarp nagrinėjamų populiacijų, o mikrosatelitinių motyvų skaičius išlieka stabilus visose tirtose *L. minor* mikrosatelitiniuose lokusuose. GPx, Cat ir APx genų žymenis neatskleidė didelės tarppopuliacinės genetinės įvairovės lyginant su chloroplasto mikrosatelitiniais žymenimis, nors atsitiktinių nukleotidų pakaitų aptikta promotoriaus, egzono ir introno srityse. Tikėtina, kad gautos sekos yra pakankamai konservatyvios, nes minėti genų fermentai yra svarbūs ROS koncentracijos mažinimui ląstelėse, o šių genų sekų pokyčiai gali sutrikdyti fermento atsaką į oksidacinį stresą (Kivrak et al., 2017). Nors šių genetinių žymenų tarppopuliacinė įvairovė silpnai išreikšta, bet sekoskaitos rezultatai taip pat gali būti naudojami populiacinės genetinės įvairovės tyrimuose.

Nustatyta S2 klonų, veikiančių tiesiogine elektromagnetine spinduliuote, augimo sulėtėjimas po 10 – 14 eksperimento savaitės lyginant su 6 eksperimento savaitės duomenimis. Netiesiogiai EML veikiančių S2 klonų pastebimi nedideli augimo sulėtėjimai, kurios gali įvykti dėl matavimo paklaidų. Po 18 eksperimento savaitės, neaptikta didelių skirtumų tarp tiesiogiai ir netiesiogiai veikiančių EML. Kadangi, *L. minor* pasižymi galimybe prisitaikyti prie įvairių aplinkos sąlygų (Landolt, 1986), tikėtina, kad po 18 eksperimento savaitės gauti duomenys parodo augalo prisitaikymą prie tiesioginės ir netiesioginės elektromagnetinės spinduliuotės.

Nagrinėjant Cat geno fragmentą, padauginta su Cat4 pradmenų pora, pastebėta, kad po 14 ir 18 poveikio EML savaitės Cat4 fragmentas liko nepakitęs palyginus su pradine S2 klonu seka, nors po 1 ir 6 poveikio EML savaitės buvo nustatytos trys ir viena nukleotidų pakaitos pozicijose (23 Lentelė). GPx6, Cat7, APx1 genetinių žymenų sekose lyginant su laukine populiacija aptikta naujų nukleotidų pakaitų S2 klonuose, kurie buvo auginami skirtingu atstumu nuo EML šaltinio. Pastebėta, kad kuo

ilgiau augalai auginami veikiant EML, tuo daugiau atsiranda naujų nukleotidų pakaitų pozicijų (27 Lentelė).

**27 Lentelė.** Atsiradusios naujos nukleotidų pakaitų pozicijos S2 klonuose, veikiančiais tiesioginės ir netiesioginės elektromagnetinės spinduliuotės po 14 ir 18 savaičių.

	GPx6		Cat7			Apx1
	Promotorius	Intronas 1	Promotorius	Egzonas 2	Intronas 2	Intronas 1
<b>14</b>	83,86	866, 881	-	-	-	199, 204, 252, 258
<b>18</b>	83, 84, 85,	866, 881	170	464	614	203, 204, 252, 258, 284

Šio darbo metu tirtose genetinių žymenų sekose tarp laukinės populiacijos mėginių neaptikta didelė genetinė įvairovė, tačiau veikiant žemo dažnio (50 Hz) EML ilguoju laikotarpiu genų, koduojančių antioksidantinius fermentus, DNR sekos kinta daugėjant nukleotidų pakaitų daugiausia promotoriaus ir introno srityse. Kadangi panašaus pobūdžio tyrimų rezultatų nėra publikuota mokslinėje literatūroje, todėl neaišku ar antioksidantinių genų sekose atsiradusios naujos nukleotidų pakaitos yra ištaisomos DNR reparacijos mechanizmų pagalba. Todėl tolimesnių mokslinių tyrimų metu būtina pratęsti elektromagnetinės spinduliuotės poveikio trukmę bei lygiagrečiai patikrinti GPx, Cat, APx genų fermentų aktyvumo pokyčius augaluose, paveiktuose žemo dažnio elektromagnetine spinduliuote.

## IŠVADOS

1. Atlikus chloroplasto nekoduojančių sekų mikrosatelitinių žymenų sekoskaitą nustatyta *L. minor* mėginių, surinktų Neryje ties Vilniumi ir Nemune ties Kaunu tarppopuliacinė genetinė įvairovė, kuri siekė 30 % (L4), 29 % (L14), 33 % (L16) lokusuose.
2. Sukurti nauji pradmenys, koduojantys GPx (GPx6, GPx7), Cat (Cat4, Cat4b, Cat7), APx (APx1, APx2) genų fragmentus, kuriuos panaudojus atlikta genų fragmentų sekoskaita bei įvertinta tarppopuliacinė genetinė įvairovė tarp *L. minor* Neryje ties Vilniumi ir Nemune ties Kaunu surinktų mėginių, kurios vertės siekė 5 % (GPx6), 10 % (GPx7), 15 % (Cat4-Cat4b), 10 % (Cat7), 19 % (APx1-APx2) lokusuose, o variabiliausios sritys aptinkamos promotoriaus ir introno srityse.
3. Veikiant *L. minor* eksperimentinį kloną žemo dažnio (50 Hz ) elektromagnetine spinduliuote, po 14-os poveikio savaitės pastebima augalo augimo sulėtėjimas bei naujų nukleotidų pakaitų indukcija GPx6, Cat7, APx1 genų fragmentų promotoriaus, egzono ir introno srityse.

## SUMMARY

### Searching and Using of *Lemna minor* Informative Genetic Markers in Wild Populations and Genetic Diversity in Experimental Clones

**The aim of the study** was to measure the genetic diversity of wild population *L. minor* clones using different genetic markers and the genetic variability in experimental clones exposed to increased electromagnetic radiation by GPx, Cat and APx gene sequencing.

**Materials and methods** - The wild type *L. minor* samples from Nemunas River near Kaunas (4 samples) and Neris River near Vilnius (8 samples) were collected. The genetic diversity of the wild type *L. minor* was studied using the genetic markers of the chloroplast genome including microsatellite sequences surrounded by non-coding regions and the antioxidant genes (GPx, Cat, APx). The growth parameters and DNA sequences of genetic markers were measured of *L. minor* grown in Petri dishes placed at different distances from the source of electromagnetic radiation.

**Results** - Seven genetic markers (GPx6, GPx7, Cat4b, Cat4b, Cat7, APx1, APx2) were identified as suitable for wild type and experimental *L. minor* clones genetic diversity studies. Results indicate that the interpopulation diversity identified using microsatellite markers is higher (30% (L4), 29% (L14), 33% (L16)) compared to genetic markers encompassing fragments of antioxidant genes (5% (GPx6), 10% (GPx7), 15 % (Cat4-Cat4b), 10% (Cat7), 19% (APx1-APx2)). Growth of plants were suppressed after 14th week from the beginning of the exposure to low-frequency (50 Hz) electromagnetic radiation and new nucleotide variations in DNA sequences of antioxidant genes were induced.

**Keywords:** *L. minor*, genetic diversity, chloroplast microsatellite markers, GPx, Cat, APx gene sequencing, electromagnetic field.

## LITERATŪRA

1. Abdul – Muneer PM. Application of microsatellite markers in conservation genetics and fisheries management: recent advances in population structure analysis and conservation strategies. Review article. *Genet Res Int* 2014; 691759: 1 – 11.
2. An D, Li C, Zhou Y, Wu Y, Wang W. Genomes and transcriptomes of duckweeds. *Front Chem* 2018; 230: 1-11.
3. Appenroth KJ, Borisjuk N, Lam E. Telling duckweed apart: genotyping technologies for the Lemnaceae. *Chin J Appl Environ Biol* 2013; 19(1):1 – 10.
4. Atamanalp M, Alak G, Fakioglu O, Ucar A, Parlak V. The effects of biopesticide on the antioxidant enzyme activities of *Lemna minor*. *Oceanogr Fish Opens Access J.* 2019; 9(3): 1–5.
5. Borisjuk N, Chu P, Gutierrez R, Zhang H, Acosta K, Friesen N, et al. Assessment, validation and deployment strategy of a two-barcode protocol for facile genotyping of duckweed species. *Plant Biol.* 2015; 1: 42 – 9.
6. Borstnik B, Pumpernik D. Tandem repeats in protein coding regions of primate genes. *Genome Res.* 2002; 12(6):909 – 15.
7. Caverzan A, Passaia G, Rosa SB, Ribeiro CW, Lazzarotto F, Margis-Pinheiro M. Plant responses to stresses: role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genet Mol Biol.* 2012; 35: 1011 – 9.
8. Charakrabarti R, Clark WD, Sharma JG, Goswami RK, Shrivastav AK, Tocher DR. Mass production of *Lemna minor* and its amino acid and fatty acid profiles. *Front Chem.* 2018; 6(479): 1 – 16.
9. Cheng JJ, Stomp AM. Growing duckweed to recover nutrients from wastewaters and for production of fuel ethanol and animal feed. *CLEAN.* 2009; 37: 17–26.
10. Chistiakov DA, Zotova EV, Savostanov KV, Bursa TR, Galeev IV, Stokov IA, Nosikov VV. The 262T>C promoter polymorphism of the catalase gene is associated with diabetic neuropathy in type 1 diabetic Russian patients. *D M J.* 2006; 32(1): 63 – 8.
11. CoGe [duomenų bazė internete]. CoGe: Comparative Genomics. Adresas: [www.genomeevolution.org](http://www.genomeevolution.org).
12. Cole CT, Voskuil MI. Population genetic structure in duckweed (*Lemna minor*, Lemnaceae). *Can J Bot.* 1996; 74: 222 – 30.

13. Correa-Aragunde N, Foresi N, Delledonne M, Lamattina L. Auxin induces redox regulation of ascorbate peroxidase 1 activity by *S*-nitrosylation/denitrosylation balance resulting in changes of root growth pattern in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*. 2013; 64: 3339 – 49.
14. Criqui M, Parmenties C, Marbach Y, Durr A, Fleck J. Isolation and characterization of a plant cDNA showing homology to animal glutathione peroxidases. *Plant Mol Biol*. 1992; 18: 623 – 7.
15. Depege N, Drevet J, Boyer N. Molecular cloning and characterization of tomato cDNAs encoding glutathione peroxidase-like proteins. *Eur J Biochem*. 1998; 253: 445 – 51.
16. Dong Z, Wang H, Dong Y, Wang Y, Liu W, Miao G, Lin X, Wang D, Liu B. Extensive microsatellite variation in rice induced by introgression from wild rice (*Zizania latifolia* Griseb.). *PLOS ONE*. 2013; 8(4): 1 – 12.
17. El-Kholy AS, Youssef MS, Eid EM. Genetic diversity of *Lemna gibba* L. and *L. minor* L. populations in Nile Delta based on biochemical and ISSR markers. *Egypt J Exp Biol*. 2015; 11(1): 11 – 9.
18. Frugoli JA, Zhong HH, Nuccio ML, McCourt P, McPeck MA, Thomas TL, McClung CR. Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiology*. 1996; 112: 327 – 36.
19. Hamrick JL, Godt MJW. Allozyme diversity in plant species. In: Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS, editors. *Plant population genetics, breeding, and genetic resources*. 1990. p. 43 – 63.
20. Herbette S, Roeckel-Drevet P, Drevet JR. Seleno-independent glutathione peroxidases. *The Febs Journal*. 2007; 274: 2163 – 80.
21. Herraes DL, Schafer H, Mosner J, Fries HR, Wink M. Comparison of microsatellite and single nucleotide polymorphism markers for the genetic analysis of a cattle population. *Z Naturforsch*. 2005; 60c: 637 – 43.
22. Hiragi CO, Miranda-Vilela A L, Rocha DMS, Oliveira S F, Hatagima A, Klautau-Guimaraes MN. Superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione *S*-transferases M1 and T1 gene polymorphisms in three Brazilian population groups. *Genet Mol Biol*. 2011; 34(1): 11 – 8.
23. Hoeck AV, Horemans N, Monsieurs P, Cao HX, Vandenhove H, Blust R. The first draft genome of the aquatic model plant *Lemna minor* opens the route for future stress physiology research and biotechnological applications. *Biotechnol Biofuels*. 2015; 8(188): 1 – 13.
24. Hollingsworth ML, Clark AA, Forrest LL, Richardson J, Pennington RT, Long DG, Cowan R, Chase MW, Gaudeul M, Hollingsworth PM. Selecting barcoding loci for plants: evaluation

- o seven candidate loci with species-level sampling in three divergent groups of land plants. *Mol Ecol Resour.* 2009; 9: 439 – 57.
25. Hu S, Li G, Yang J, Hou H. Aquatic plant genomics: advances, applications, and prospects. *Int J Genomics.* 2017; 6347874: 1 – 9.
  26. Kato S, Ueno T, Fukuzumi S, Watanabe Y. Catalase reaction by myoglobin mutants and native catalase. Mechanistic investigation by kinetic isotope effect. *Journal of Biological Chemistry.* 2004; 279: 52376 – 81.
  27. Kivrak EG, Yurt KK, Kaplan AA, Alkan I, Altun G. Effects of electromagnetic fields exposure on the antioxidant defense system. *J Microsc Ultrastruct.* 2017; 5(4): 167 – 76.
  28. Landolt E, Kandeler R. The family of Lemnaceae - a monographic study. Zurich: Geobotanische Institut ETH; 1986.
  29. Lazzarotto F, Teixeira FK, Rosa SB, Dunand C, Fernandes CL, de Vasconcelos Fontenele A, et al. Ascorbate peroxidase – related (APx – R) is a new heme-containing protein functionally associated with ascorbate peroxidase but evolutionarily divergent. *NewPhytol.* 2011; 191: 234 – 50.
  30. Lei XG, Zhu JH, Cheng WH, Bao Y, Ho YS, Reddi AR, Holmgren A, Arner ESJ. Paradoxical roles of antioxidant enzymes: basic mechanisms and health implications. *Physiol Rev.* 2016; 96(1): 307 – 64.
  31. Lemon GD, Posluszny U, Husband BC. Potential and realized rates of vegetative reproduction in *Spirodela polyrhiza*, *Lemna minor*, and *Wolffia borealis*. *Aquat Bot.* 2001; 70(1):79 – 87.
  32. Les DH, Crawford DJ, Landolt E, Gabel JD, Kimball RT. Phylogeny and systematics of Lemnaceae, the duckweed family. *Syst Bot.* 2002; 27(2): 221 – 40.
  33. Li YC, Korol AB, Fahima T, Nevo E. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Mol Biol Evol.* 2004; 21(6): 991 – 1007.
  34. Lubos E, Loscalzo J, Handy DE. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal.* 2011; 15(7):1957 – 97.
  35. Margis R, Dunand C, Teixeira FK, Pinheiro MM. Glutathione peroxidase family – an evolutionary overview. *FEBS Journal.* 2008; 275: 3959 – 70.
  36. Mhamdi A, Queval G, Chaouch S, Vanderauwera S, Breusegem FV, Noctor G. Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *J Exp Bot.* 2010; 61(15): 4197 – 220.



37. Mieh G, Rafii MY, Ismail MR, Puteh AB, Rahim HA, Islam KN, Latif MA. A review of microsatellite markers and their applications in rice breeding programs to improve blast disease resistance. *Int J Mol Scri*. 2013; 14: 22499 – 528.
38. Milla MAR, Maurer A, Huete AR, Guustafson JP. Glutathione peroxidase genes in *Arabidopsis* are ubiquitous and regulated by abiotic stresses through diverse signaling pathways. *The Plant Journal*. 2003; 36: 602 – 15.
39. Mittler R, Zilinskas BA. Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought. *Plant J*. 1994; 5(3): 397 – 405.
40. Morgante M, Hanafey M, Powell. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nat Genet*. 2002; 30: 194 – 200.
41. Narendra S, Venkataramani S, Shen G, Wang J, Pasapula V, Lin Y, Kornyejev D, Holaday AS and Zhang H. The *Arabidopsis* ascorbate peroxidase 3 is a peroxisomal membrane-bound antioxidant enzyme and is dispensable for *Arabidopsis* growth and development. *J Exp Bot*. 2006; 57: 3033 – 42.
42. Olivero M, Ruggiero T, Coltella N, Maffe A, Calogero R, Medico E, Renzo MF Di. Amplification of repeat – containing transcribed sequences (ARTS): a transcriptome fingerprinting strategy to detect functionally relevant microsatellite mutations in cancer. *Nucleic Acids Res*. 2003; 31(7): 1 – 8.
43. Radic S, Pevalek-Kozlina B. Effects of osmotic stress on antioxidative system of duckweed (*Lemna minor* L.). *Period Biol*. 2010; 112(3): 293 – 9.
44. Ren X, Zou L, Zhang X, Branco V, Wang J, Carvalho C, Holmegren A, Lu J. Redox signaling mediated by thioredoxin and glutathione systems in the central nervous system. *Antioxid Redox Signal*. 2017; 27(13): 989 – 1010.
45. Richard G, Dujon B. Trinucleotide repeats in yeast. *Res Microbiol*. 1997; 148: 731 – 44. 1997.
46. Romero-Puertas MC, Corpas FJ, Rodríguez-Serrano M, Gómez M, Del Rio LA, Sandalio LM. Differential expression and regulation of antioxidative enzymes by cadmium in pea plants. *J Plant Physiol*. 2007; 164(10): 1346 – 57.
47. Samadi S, Erard F, Estoup A, Jarne P. The influence of mutation, selection and reproductive systems on microsatellite variability: a simulation approach. *Genetic research*. 1998; 71:213–22.
48. Schwarzlander M, Fricker MD, Marty L, Brach T, Novak J, Sweetlovel J, Meyer AJ. Confocal imaging of glutathione redox potential in living plant cells. *J Microsc*. 2008; 231(2): 299 – 316.

49. Selles B, Hugo M, Trujillo M, Srivastava V, Wingsle G, Jacquot JP, Radi R, Rouhier N. Hydroperoxide and peroxyxynitrite reductase activity of poplar thioredoxin-dependent glutathione peroxidase 5: kinetics, catalytic mechanism and oxidative inactivation. *Biochem J.* 2012; 442(2): 369 – 80.
50. Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J. Exp. Bot.* 2002; 53: 1305 – 19.
51. Song XH. Research progress on catalase in plants. *Chin J Anhui Agric Sci.* 2007; 35: 9824 – 7.
52. Sugimoto M, Sakamoto W. Putative phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene from *Arabidopsis thaliana* induced by oxidative stress. *Genes Genet Syst.* 1997; 72: 311 – 6.
53. Sun T, Liu F, Wang W, Wang L, Wang Z, Li J, Que Y, Xu L, Su Y. The role of sugarcane catalase gene ScCAT2 in the defense response to pathogen challenge and adversity stress. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(9): 1 – 21.
54. Teixeira FK, Menezes-Benavente L, Galvão VC, Margis R, Margis-Pinheiro M. Rice ascorbate peroxidase gene family encodes functionally diverse isoforms localized in different subcellular compartments. *Planta.* 2006; 224:300 – 14.
55. Tkalec M, Malaric K, Pevalek – Kozlina B. Influence of 400, 900, and 1900 MHz electromagnetic fields on *Lemna minor* growth and peroxidase activity. *Bioelectromagnetics.* 2005; 26(3): 185 – 93.
56. Tlidjen S, Meksem Amara L, Bouchlaghem S, Sbartaï H, Djebbar MR. Oxidative stress in *Elodea canadensis* and *Lemna minor* exposed to Calliofop 36EC. *Glob J Biodivers Sci Manag.* 2012; 2(1): 29 – 37.
57. Toth G, Gaspari Z, Jurka J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Res.* 2000; 10: 967 – 81.
58. Varga M, Horvatic J, Čelic A. Short term exposure of *Lemna minor* and *Lemna gibba* to mercury, cadmium and chromium. *Cent Eur J Biol.* 2013; 8(11): 1083 – 93.
59. Vian A, Davies E, Gendraud M, Bonnet P. Plant responses to high frequency electromagnetic fields. *Biomed Res Int.* 2016; 1830262: 1 – 13.
60. Wang W, Li R, Zhu Q, Tang X, Zhao Q. Transcriptomic and physiological analysis of common duckweed *Lemna minor* responses to NH<sub>4</sub><sup>+</sup> toxicity. *BMC Plant Biol.* 2016; 16(92): 1 – 13.
61. Wani GA, Shah MA, Reshi ZA, Atangana AR, Khasa DP. cpDNA microsatellite markers for *Lemna minor* (Araceae): phylogeographic implications. *Appl Plant Sci.* 2014; 2(7): 1 – 4.

62. Willekens H, Inze D, Van Montagu, Van Camp W. Catalases in plants. *Mol Breed.* 1995; 1(3): 207 – 28.
63. Wolverton BC, McDonald RC. Energy from vascular plants wastewater treatments system. *Econ Bot.* 1980; 35: 224 – 32.
64. Xue H, Xiao Y, Jin Y, Li X, Fang Y, Zhao H, Zhao Y, Guan J. Genetic diversity and geographic differentiation analysis of duckweed using inter-simple sequence repeat markers. *Mol Biol Rep.* 2012; 39(1): 547 – 54.
65. Zhou Y, Hu L, Ye S, Jiang L, Liu S. Genome-wide identification of glutathione peroxidase (GPX) gene family and their response to abiotic stress in cucumber. *3 Biotech.* 2018; 8(159): 1 – 11.