



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

**Informatyviausių oligonukleotidinių žymenų identifikavimas
hibridinės drebulės mikroūglių DNR polimorfizmo
nustatymui**

Baigiamasis magistro projektas

Irmina Kralikauskaitė

Projekto autorė

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

Vadovė

Kaunas, 2019



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

**Informatyviausių oligonukleotidinių žymenų identifikavimas
hibridinės drebulės mikroūglių DNR polimorfizmo
nustatymui**

Baigiamasis magistro projektas

Pramoninė biotechnologija (6211FX010)

Irmina Kralikauskaitė

Projekto autorė

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

Vadovė

Doc. dr. Sigutė Kuusienė

Konsultantė

Dr. Ingrida Tumosienė

Recenzentė

Kaunas, 2019



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Irmina Kralikauskaitė

Informatyviausių oligonukleotidinių žymenų identifikavimas hibridinės drebulės mikroūglių DNR polimorfizmo nustatymui

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad mano, Irminos Kralikauskaitės, baigiamasis projektas tema „Informatyviausių oligonukleotidinių žymenų identifikavimas hibridinės drebulės mikroūglių DNR polimorfizmo nustatymui“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

Aš suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo faktui, man bus taikomos nuobaudos, remiantis Kauno technologijos universitete galiojančia tvarka.

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

(parašas)

Kralikauskaitė, Irmė. Informatyviausių oligonukleotidinių žymenų identifikavimas hibridinės drebulės mikroūglių DNR polimorfizmo nustatymui. Magistro baigiamasis projektas / vadovė doc. dr. Ilona Jonuškienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis: Biotechnologija, Technologijų mokslai.

Reikšminiai žodžiai: hibridinė drebulė, molekuliniai žymenys, DNR tyrimai, trumpos apyvartos želdiniai.

Kaunas, 2019. 53 p.

Santrauka

Miško medžiai sudaro didžiausią biomasės dalį pasaulyje, tačiau dėl didelės jos paklausos energijos gamybai bei medienos pramonei biomasės ištekliai senka, o miškų rotacijos laikotarpis trunka apie 50 – 120 metų. Todėl pradėta intensyviai ieškoti metodų kaip išgauti biomasę greičiau ir didesniais kiekiais. Trumpos apyvartos želdiniai yra alternatyvus būdas šiai problemai išspręsti, nes jų rotacijos trukmė mažesnė nei 30 metų. Šis tyrimas buvo atliekamas siekiant įvertinti hibridinės drebulės (*Populus tremula* × *Populus tremuloides* Michx.) tinkamumą trumpos apyvartos miškininkystei, atrinkti perspektyviausius drebulės hibridus bei nustatyti jų genetinę įvairovę panaudojant molekulinis žymenis. Tyrimų metu CTAB metodu išskirta DNR iš hibridinės drebulės šviežių lapų, jos koncentracija buvo nustatyta spektrofotometru. Branduolinė DNR pagausinta PGR metodu naudojant atsitiktinius pradmenis. DNR fragmentus atskyrus agarozės gelyje buvo atlikta AAPD analizė. Tyrimų rezultatai parodė, kad iš 53 ištirtų oligonukleotidinių pradmenų informatyviausi ir aukščiausia amplifikacijos kokybę pasižymėję pradmenys buvo šie: Roth B012, Roth B07, Roth 170 – 02, Roth 170 – 03 ir Roth 170 – 10, kitų naudotų pradmenų amplifikacijos kokybė buvo gauta žema arba vidutinė. Panaudojant atrinktus informatyviausius pradmenis tarp genotipų nustatytas 85,24% polimorfizmas, visi hibridai buvo skirtingi.

Kralikauskaitė, Irmina. The most informative oligonucleotide markers for determination of hybrid aspen microshoots DNA polymorphism. Master's Final Degree Project / supervisor assoc.prof.dr. Ilona Jonuškienė; The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Study field and area: Biotechnology, Technological sciences.

Keywords: hybrid aspen, molecular markers, DNA variation, short rotation forestry.

Kaunas, 2019. 53 p.

Summary

Forest trees account for the largest share of biomass in the world, but due to high demand for energy production and the wood industry, biomass resources are depleting and forest rotation is about 50 – 120 years. Which is why it has been started to look for faster ways to extract biomass in larger quantities. Short rotation forestry is an alternative way of solving this problem because this kind of forest's rotation time is less than 30 years. This study was carried out to assess the suitability of hybrid aspen (*Populus tremula* × *Populus tremuloides* Michx.) for SRF (short rotation forestry). To select the most promising aspen hybrids and to identify their genetic diversity through molecular markers. During the studies, DNA was isolated from fresh leaves of hybrid aspen using CTAB method, its concentration was determined by a spectrophotometer. Nuclear DNA was amplified by PCR using random primers. The DNA fragments were analyzed by RAPD after they have been separated in agarose gel. The results of the study showed that out of the 53 analyzed oligonucleotide primers the most informative and highest amplification quality primers were: Roth B012, Roth B07, Roth 170 – 02, Roth 170 – 03 and Roth 170 – 10, the quality of amplification of other used primers was medium or low. Using the selected informative primers, 85.24% polymorphism between genotypes was detected, all hybrids were different.

Turinys

Santrumpų ir terminų sąrašas	7
Įvadas.....	8
1. Literatūros apžvalga	9
1.1. Trumpos apyvartos želdinių svarba.....	9
1.2. Tuopų genties (lot. Populus L.) veisimo svarba.....	9
1.3. Hibridinė drebulė (Populus tremula × Populus tremuloides Michx.)	10
1.3.1. Hibridinės drebulės botaninis aprašymas.....	10
1.3.2. Hibridinės drebulės pranašumai, lyginat su P. tremula ir P. tremuloides rūšimis.....	11
1.3.3. Hibridinės drebulės panaudojimas trumpos apyvartos želdiniams	12
1.4. In vitro technologijų taikymas greitai augančių medžių mikroklonavimui	13
1.5. Medžių genetiniai tyrimai pasitelkiant molekulinis metodus	15
1.5.1. DNR išskyrimo metodai iš augalinės medžiagos.....	15
1.5.2. Molekulinių žymenų panaudojimas augalų genetiniuose tyrimuose	15
1.5.3. AAPD molekuliniai žymenys ir jų taikymas.....	18
2. Medžiagos ir tyrimų metodai	20
2.1. Tyrimų vieta	20
2.2. Tyrimų objektai	20
2.3. Tyrimų sąlygos.....	20
2.4. Tyrimų metu naudota aparatūra	20
2.5. Tyriamųjų darbų principinė schema.....	21
2.6. Tyrimų metodai	22
2.6.1. Maitinamosios terpės sudėtis ir gamyba	22
2.6.2. Hibridinės drebulės mikrodauginimas in vitro kultūroje	23
2.6.3. Hibridinės drebulės augimo in vitro įvertinimas.....	24
2.6.4. Hibridinės drebulės DNR išskyrimas modifikuotu CTAB metodu	25
2.6.5. Polimerazės grandininė reakcija (PGR), panaudojant atsitiktinius pradmenis	27
2.6.6. PGR produktų atskyrimas agarozės gelyje elektroforezės metodu.....	28
2.6.7. Oligonukleotidinių pradmenų įvertinimas	29
2.6.8. AAPD analizė.....	30
2.6.9. Tyrimo duomenų apdorojimas	30
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas.....	31
3.1. Hibridinės drebulės mikroūglių in vitro padauginimas ir augimo požymių vertinimas	31
3.1.1. Pirminis hibridinės drebulės mikroūglių in vitro vertinimas	31
3.1.2. Hibridinės drebulės augimo požymių in vitro vertinimas.....	34
3.1.3. Perspektyviausių hibridinės drebulės palikuonių atrinkimas.....	37
3.2. Informatyviausių oligonukleotidinių žymenų nustatymas	38
3.2.1. Hibridinės drebulės DNR koncentracijos nustatymas.....	38
3.2.2. Elektroforegramų analizė	39
3.3. Hibridinės drebulės palikuonių DNR polimorfizmo nustatymas.....	41
3.3.1. DNR genetinės įvairovės nustatymas, panaudojant informatyviausius pradmenis.....	41
3.3.2. Drebulės hibridų giminingumo nustatymas	45
4. Rekomendacijų dalis	48
Išvados	50
Literatūros sąrašas	51

Santrumpų ir terminų sąrašas

Santrumpos:

AAPD – atsitiktinai amplifikuota polimorfinė DNR

AFLP – pagausintų fragmentų ilgio polimorfizmas

BAP - 6 – benzilaminopurino

CTAB – cetilo trimetilo amonio bromidas

IAR - 3 – indolilacto rūgštis

PGR – polimerazės grandininė reakcija

SSR - mikrosatelitai

Įvadas

Klimato kaita yra viena iš plačiausiai aptarinėjamų temų pasaulyje [1]. Žmonija pradėjo kritiškai vertinti energijos gamybos būdus iš neatsinaujinančių išteklių bei jų naudojimo mastus. Tuo tikslu, kad sumažintų iškastinio kuro naudojimą, šiltnamio efektą sukeliančių dujų išmetimą į aplinką ir klimato kaitą, pradėta ieškoti energijos gamybos būdų iš atsinaujinančių išteklių. Vienas iš pagrindinių atsinaujinančių šaltinių – tai biomasė [2].

Miško medžiai sudaro apie 82% biomasės pasaulyje ir daugiau kaip 50% sausumos biologinės įvairovės. Tai yra žaliavų šaltinis daugeliui esminių žmonių poreikių, įskaitant statybines medžiagas, popieriaus gaminius ir kaip kietasis kuras šilumai bei energijai išgauti. Miškai taip pat teikia įvairią ekologinę naudą pvz., biologinės įvairovės išsaugojimas, anglies dvideginio mažinimas, klimato reguliavimas ir vandens kokybės išsaugojimas. Dėl didelės miško medžių naudos gamtai ir žmonėms, pradėta remti genominių tyrimų tobulinimo programas, siekiant sukurti diagnostines priemones miško medžiams išsaugoti bei atkurti gamtinių populiacijų valdymą [3].

Trumpos apyvartos miškininkystė yra perspektyvus ir aplinkai draugiškas būdas gaminti biomasę energijos gamybai ir patenkinti kitiems žmonių poreikiams [4]. Šiaurės Europoje ir Baltijos šalyse miškininkystė tradiciškai orientuota į ilgus medžių rotacijos laikus (apie 50 – 120 metų), o trumpos apyvartos želdinių rotacijos trukmė mažiau nei 30 metų, todėl tai tapo nauja miškininkystės koncepcija [5].

Drebulės laikomos vienos iš perspektyviausių miško medžių rūšių trumpos apyvartos miškininkystei Europoje vystyti dėl greitos augimo spartos bei atsparumo šalčiams. Hibridinė drebulė (*P.tremula* × *P.tremuloides*) jau nuo dvidešimtojo amžiaus pradžios buvo sodinama ir auginama eksperimentiniams ir komerciniams tikslams Šiaurės ir Baltijos šalyse, tačiau kol kas dar nėra auginama pramoniniu mastu. Todėl mokslininkai ir veisėjai siekia, kad hibridinė drebulė taptų ekonomiškai ir ekologiškai svarbiu medžiu [5].

Biotechnologijos metodų pagalba siekiama nustatyti drebulės hibridų genotipus, kurie būtų tinkamiausi auginti trumpos apyvartos želdinių plantacijose. Vienas iš tyrimų metodų – tai medžių klonavimas *in vitro* sistemoje [6]. Klonų polimorfizmo tyrimui dažniausiai naudojami molekuliniai žymenys. Šių metodų dėka galima identifikuoti ir nustatyti augalų rūšies genetinę įvairovę, molekuliniam lygmenyje išanalizuoti geresniais fenotipiniais požymiais pasižyminčius genotipus [7]. Genetinės įvairovės nustatymas panaudojant molekulinis žymenis gali padėti atrinkti perspektyviausius drebulės hibridus ir pasiūlyti juos naudoti trumpos apyvartos miškininkystėje [8].

Šio **darbo tikslas** – ištirti ir nustatyti atrinktų perspektyviausių hibridinės drebulės (*Populus tremula* × *Populus tremuloides* Michx.) individų polimorfizmą, panaudojant informatyviausius oligonukleotidinius pradmenis.

Siekiant šio darbo tikslo buvo iškelti šie **uždaviniai**:

1. Atrinkti perspektyviausius ir geriausiais fenotipiniais požymiais pasižyminčius hibridinės drebulės palikuonius.
2. Ištirti ir palyginti informatyviausius oligonukleotidinius pradmenis hibridinės drebulės genetinės įvairovės tyrimui.
3. Nustatyti *Populus tremula* × *Populus tremuloides* hibridinių palikuonių polimorfizmą.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Trumpos apyvartos želdinių svarba

Trumpos apyvartos želdiniai – tai sparčiai augantis dauginimo būdas tų medžių ir krūmų, kurie sugeba per trumpą laiką (3 – 10 metų) pasiekti didelį biomasės kiekį [9]. Sodinant trumpos apyvartos želdinius siekiama dviejų pagrindinių tikslų: 1) padidinti saugomų miškų plotą biologiniam medžių išsaugojimui ir 2) padidinti miškų plotus, siekiant išgauti kuo didesnę kiekį biomasės. Tai labai aktualu Šiaurės ir Baltijos šalimis, kuriuose miškininkystė tradiciškai grindžiama ilgai augančių (60 – 120 metų) medžių sodinimu, o greita trumpalaikė miškininkystė su trumpesniu nei 30 metų rotacijos laikotarpiu vis dar nėra gerai išvystyta. Trumpos rotacijos miškininkystės augimas yra pastebimas visame pasaulyje, jau dabar 6 – 7% pasodintų tokio tipo miškų biomasė sudaro apie ketvirtadalį pasaulio metinės medienos produkcijos ir prognozuojama, kad ateityje ši dalis gerokai padidės [4].

Yra dvi pagrindinės priežastys, kodėl greitos apyvartos želdiniai per pastaruosius tris dešimtmečius Šiaurės Europoje gavo vis daugiau dėmesio ir tampa vis svarbesni. Pirmą priežastį yra ta, kad keliose šalyse dėl politinių, ekonominių ir socialinių pokyčių sumažėjo žemės ūkio paskirties plotų [10]. Antroji priežastis yra ta, kad dėl klimato kaitos turime pakeisti iškastinį kurą atsinaujinančiais energijos šaltiniais Europos Sąjungos valstybių narių įsipareigojimu. Pagal ES energetikos politiką, medienos biomasės gamybos augimas greitos apyvartos plantacijose yra perspektyvi priemonė šiam tikslui pasiekti [4].

Švedijoje miškų biomasė yra svarbi sudedamoji dalis, bandant spręsti klimato kaitos poveikį gamtai. Energijos naudojimas šalyje šiuo metu grindžiamas atsinaujinančiais energijos šaltiniais, kurie šiuo metu viršija 53% visos gaunamos energijos, o biomasė - dominuojantis atsinaujinančios energijos šaltinis. Mediena ir jos produktai gali veikti kaip anglies natūralūs šaltiniai, turintys galimybę pakeisti iškastinį kurą. Tyrimai dėl medienos biomasės gamybos didinimo galimybių parodė, kad vien tik Švedijoje 300 000 – 500 000 ha žemės ūkio paskirties plotas gali būti panaudotas miškų užsodinimui, tačiau žemės plotas, kuriame gali būti auginamos sparčiai augančios medžių rūšys – daug didesnis [11].

1.2. Tuopų genties (lot. *Populus L.*) veisimo svarba

Miško medžiai turi didelę ekologinę ir ekonominę reikšmę bei dideles galimybes jų panaudojimo vystimuisi pramonėje. Greitai augantys tuopų genties medžiai plačiai auginami įvairiose klimato zonose, siekiant stabilizuoti dirvožemį, sumažinti ir sustabdyti vėjo nešamas dulkes bei teršalus. Taip pat *Populus* rūšys yra ekonomiškai ir ekologiškai svarbios dėl gerų medienos savybių [12], o tai labai aktualu popieriaus ir medienos pramonei [13]. *Populus* rūšis dėl spartaus augimo greičio ir didelės biologinės įvairovės buvo antra medžių rūšis dažniausiai naudojama biotechnologijos tyrimuose po *Pinuso* spp. ir dažniausiai pasaulyje naudojama rūšis atliekant genetines modifikacijas [14].

Pastaraisiais metais medžių molekulinės genetikos ir genomikos tyrimuose įvyko daug pokyčių. Šie pokyčiai buvo ryškiausi tuopų rūšyse ir jų hibriduose [15]. Per pastarąjį dešimtmetį *Populus* genties atstovai tapo vienu pagrindinių miško augalų molekulinės genetikos tyrimų objektu [16]. Tuopų genties medžiai turi keletą potencialių biologinių pranašumų, tokių kaip mažas genomo dydis ($2n = 38$, apie 550 Mbp), daugiau nei 30 visame pasaulyje augančių rūšių, greitas ūglių augimas, klonų dauginimo paprastumas, genetinės transformacijos paprastumas ir regeneravimas [17]. Dėl šių

priežasčių *Populus* genties atstovai yra tinkamiausi naudoti kaip modelį atliekant molekulinis tyrimus [16, 17].

Populus rūšys yra greitai augantys medžiai, vertinami visame pasaulyje dėl spartaus biomasės augimo ir kokybės, kuri gali būti panaudota įvairiems mechaniniams ir cheminiams procesams. Šios rūšys ypač svarbios celiuliozės ir popieriaus gamybos pramonei bei kuro ir energetikos gavybos sektoriams. Europoje labiausiai šalčiui atspari ir produktyviausia populiacijos rūšis, prisitaikiusi augti nederlinguose ir rūgštiniuose dirvožemiuose – tai paprastoji drebulė (*Populus tremula* L.) [18].

Paprastoji drebulė (lot. *Populus tremula* L.) yra lapuočių medžių rūšis, plačiai paplitusi Šiaurės pusrutulyje. Jos augimo geografinis pasiskirstymas svyruoja nuo vėsių ir vidutinio klimato regionų Šiaurės Europoje ir Šiaurės Rytų Azijoje iki šiltų ir sausų vietovių Pietų Europoje ir Šiaurės Afrikoje. *P. tremula* priklauso *Salicaceae* šeimai ir yra glaudžiai susijusi su tuopų gentimis, kurios dažniausiai naudojamos trumpos apyvartos želdiniams. Skirtingai nuo kitų *Populus* rūšių, kurios yra daugiausia prisitaikiusios prie pakrančių ekosistemų, drebulės geba toleruoti įvairias klimato sąlygas, dirvožemio derlingumą, vandens tiekimą bei nėra jautrios sausrai ir vėjui [19]. Tačiau, dėl ganėtinai mažos biomasės, paprastoji drebulė nepriskiriama prie plantacijose auginamų medžių [17].

1.3. Hibridinė drebulė (*Populus tremula* × *Populus tremuloides* Michx.)

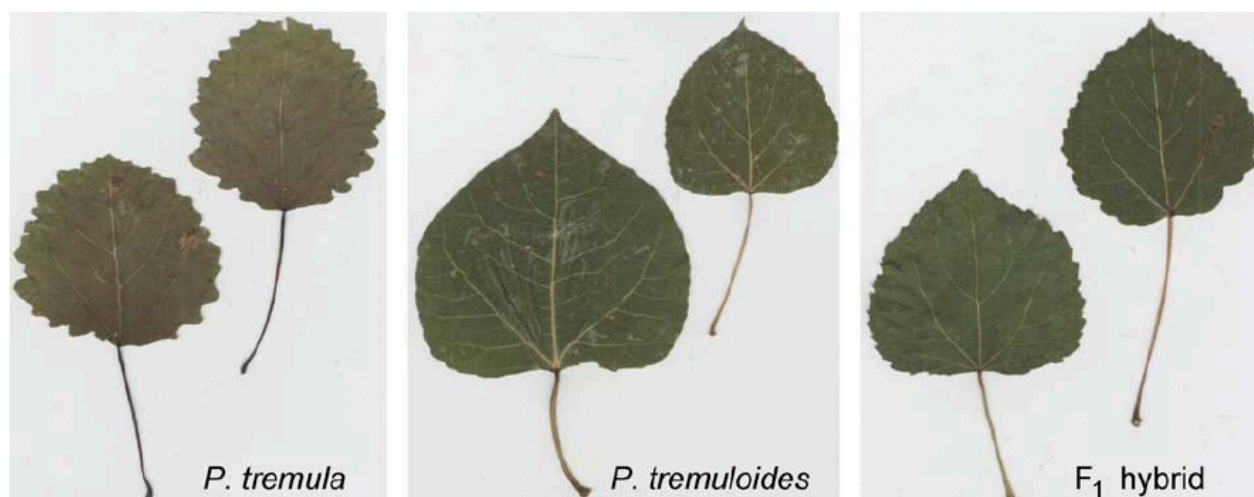
R. Murkaitė ir A. Pliūra 1983 metais kryžminimų metu gavo hibridinės drebulės selekcinę medžiagą [20]. Drebulės hibridas (*P. tremuloides* × *P. tremula*) ir drebulė (*P. tremula*), esant labai plačiam jų natūralaus paplitimo arealui, yra auginami beveik visose Europos bei Šiaurės Amerikos šalyse [8]. Šalia įprastinės medienos produkcijos paskirties, hibridinės drebulės klonai, pasižymintys sparčiu augimu, yra perspektyvūs auginti trumpos apyvartos želdiniuose. Šios paskirties želdinių auginimas aktualus ir Lietuvoje, kadangi biokuro gamyba iš atsinaujinančių gamtos šaltinių tampa prioritete [5].

1.3.1. Hibridinės drebulės botaninis aprašymas

Hibridinė drebulė (*Populus tremula* × *Populus tremuloides* Michx.) yra greitai augantis paprastosios drebulės *Populus tremula* L. ir kanadietiškos drebulės *Populus tremuloides* L. dirbtinio apdulkinimo būdu gautas tarprūšinis hibridas. Abi rūšys priklauso gluosnių (lot. *Salicaceae* L.) šeimai ir tuopų (lot. *Populus* L.) genčiai. Šios rūšys turi labai platų natūralaus paplitimo arealą – *P. tremula* yra vienas iš labiausiai paplitusių medžių pasaulyje, o *P. tremuloides* medžių rūšis yra labiausiai paplitusi Šiaurės Amerikoje. *P. tremula* ir *P. tremuloides* yra genetiškai artimos rūšys, todėl buvo pasiūlyta jas priskirti vienai rūšiai, turinčiai skirtingą geografinį augimo pasiskirstymą. Drebulės paprastai yra diploidiniai medžiai ($2n=38$), nors taip pat randami triploidiniai ir tetraploidiniai individai [5].

P. tremula ir *P. tremuloides* yra paprastai vidutinio dydžio medžiai, tačiau jie gali pasiekti nuo 35 iki 40 m aukštį ir 1 m stiebo skersmenį, pažeistose ar labiau pažeidžiamose stiebo vietose skersmens matmenys gali būti ir mažesni. Abi medžių rūšys yra ekonomiškai labai svarbios, genetiškai kintančios, turinčios kelias rases ir formas, priklausomai nuo geografinės augimo padėties, todėl suteikia didelę skirtingų medžių pasiūlą jų veisimui ir atrankai. Tai yra greitai augančios ir prie augimo sąlygų prisitaikančios rūšys, kurios dažnai yra naudojamos atsodinti miškus ir miškų plotus po gaisro ar masinio išpjovimo, jomis užsėjant arba dauginant šaknų atžalomis, pastarasis yra dominuojantis natūralios regeneracijos būdas [5].

Hibridinė drebulė gauta dirbtinai sukryžminus *P. tremula* ir *P. tremuloides* rūšis, pirmą kartą buvo aprašyta 1920 metų pradžioje Vokietijoje [21]. Drebulės hibridai per pirmuosius 20 – 30 metų auga daug sparčiau ir pasižymi didesniu biomasės kiekiu nei jos pagrindinės rūšys – tai patvirtinta keliose eksperimentinėse ir komercinėse trumpos apyvartos želdinių plantacijose Skandinavijoje, Vidurio Europoje ir Šiaurės Amerikoje. Eksperimentai parodė, kad hibridinė drebulė pasižymi derlingumu ir gali natūraliai kryžmintis su tėvinėmis rūšimis. Paprasčiausias fenotipinis požymis pagal kurį galima atskirti drebulės hibridą nuo tėvinių rūšių – tai lapų forma. Pagal smailią viršutinę lapo dalį panašūs į *P. tremuloides*, bet skiriasi labiau banguotais lapo kraštais (1.1.pav), tačiau tarp skirtingų hibrido klonų atsiranda tam tikrų skirtumų [5].



1.1.pav. *P. tremula*, *P. tremuloides* ir jų bendro hibridinio palikuonio lapų skirtumai

Hibridinės drebulės lapų dimorfizmas pasireiškia panašiai kaip ir jos tėvinėms bei kitoms *Populus* rūšims. Lapų dydžio ir formos skirtumai pastebėti tarp ankstyvųjų ir vėlyvųjų lapų. Ankstyvieji lapai yra labiau apvalūs ir jie būdingi žemesniems ūgliams, o vėlyvieji labiau primena trikampio formą ir būdingi aukštesniems ūgliams. Lapų dimorfizmas labiausiai pasireiškia jauname ūglio amžiuje [5].

1.3.2. Hibridinės drebulės pranašumai, lyginat su *P. tremula* ir *P. tremuloides* rūšimis

Remiantis švedų ir estų mokslininkų tyrimų duomenimis, hibridinės drebulės pranašumas, lyginant su tėvinėmis rūšimis, buvo paaiškintas trimis būdais: 1) heterozės efektas, 2) didesnis atsparumas *Melampsora* spp. ir *Venturia* spp. kenkėjams, kurie gali įtakoti ir smarkiai sumažinti medžio augimą, ir 3) didesnis atsparumas šaltesniam oro klimatui, dėl kurio rudenį hibridai auga ilgiau.

Yra dvi pagrindinės hipotezės, paaiškinančios drebulės hibridų heterozės efektą: genų dominavimas ir visiškasis dominavimas. Tyrimų metu nustatyta, kad drebulės hibridų atveju heterozė gali atsirasti dėl dviejų vienodų visiškai dominuojančių genų sąveikos – vieno iš *P. tremuloides* ir kito iš *P. tremula* tėvinių rūšių. Hibridinės drebulės gebėjimas augti šiauriniuose regionuose, tokiuose kaip Suomija, iš dalies paaiškina šių hibridų ilgesnį augimo laikotarpį šaltesniame klimate, lyginant su kitomis drebulių rūšimis, kurių sezono augimo trukmė yra trumpesnė. Kalbant apie fiziologinius požymius, kurie galėtų paaiškinti hibridų didesnį atsparumą atšiauresniam klimatui pastebėta, kad hibridinis drebulė turi stomatą su geresnėmis apsauginėmis savybėmis bei lapai pasireiškia didesniu fotosintezės greičiu. Apibendrinus tyrimo duomenis, tarp hibridinių drebulės klonų pastebėtas reikšmingas augimo, fenologijos, fiziologijos ir fitochemijos svyravimas, o tai parodo, kad auginimo ir pritaikymo galimybės yra didelės [5].

1.3.3. Hibridinės drebulės panaudojimas trumpos apyvartos želdiniams

Hibridinės drebulės augimas, derlingumas, savybės bei jų pokyčiai tarp klonų buvo nagrinėjami keliuose tyrimuose. Tačiau norint, kad hibridinė drebulė taptų ekonomiškai ir ekologiškai reikšmingu medžiu, reikia užsodinti ir stebėti didesnius hibridinių drebulių plantacijų plotus. Šiam tikslui pasiekti, reikėtų toliau tirti ryšius, susijusius tarp augimo ir sodinimo vietos didelio masto komercinėse plantacijose, siekiant išsiaiškinti hibridinės drebulės augimui tinkamas vietas. Toliau tobulinti hibridinės drebulės miškininkystės metodus, kadangi remiantis dabartinėmis žiniomis, galima pateikti tik bendras rekomendacijas dėl retinimo ir kitų veiklų, susijusių su augimo reguliavimu. Šiuo metu tyrimams naudojama augalinė medžiaga dažniausiai auginama Pietų Šiaurės ir Baltijos regiono dalyse. Norint apimti didesnę regiono dalį ir pagerinti komercinių augalinių medžiagų produktyvumą ir efektyvumą, turi būti gaminami nauji klonai. Taip pat svarbu iširti dirvožemio įtaką, kai maistinių medžiagų kiekis jame mažas, kelių iš eilės trumpos rotacijos želdinių augimo efektyvumui. Tokio pobūdžio tyrimai prasidėjo prieš keletą metų. Norint auginti hibridinę drebulę trumpos apyvartos želdiniuose turi būti patikslinti ilgalaikiai hibridų plantacijų biologinės įvairovės pokyčiai, įskaitant ir veiklos susijusios su miškininkyste poveikį. Taip pat turi būti stebima faunos, dirvožemio, vabzdžių, kerpių ir grybų įtaka drebulės augimui [5].

Lietuvoje hibridinės drebulės atrankos ir veisimo darbai prasidėjo 1965 metais. Veikla suaktyvėjo 1982 m., o vėliau ir 2007 m. Iki 2007 metų hibridinėmis drebulėmis buvo užsodinta apie 50 ha miškų ir apleistų žemės ūkio paskirties plotų. Nuo to laiko kasmet apželdinama 100 – 400 ha naudojant lietuviškus, latviškus ir suomiškus hibridinės drebulės klonus [22]. Veisimas leido klonams pasiekti 11-13 m³ ha⁻¹ per metus (250 – 300 m³ ha⁻¹ 23 metų amžiaus) vidutinį metinį prieaugį, kai buvo auginami 20 – 30 metų rotacijos želdiniai medienos gamybai. Pastaruoju metu Lietuvoje užbaigti du dideli hibridinės drebulės veisimo nacionaliniai projektai. Jie apima tokias temas kaip generacinį ir vegetatyvinį dauginimąsi, hibridinės drebulės potencialą vykdant trumpos rotacijos želdinimą [23], apleistų žemės ūkio ir miško plotų apželdinimą ir bioenergijos gamybą [22].

Hibridinių drebulių plantacijos buvo pasodintos naudojant atrinktus klonus, kurie buvo komerciškai padauginoti naudojant mikrodauginimą arba šaknų atžalomis. Skandinavijoje ir Baltijos šalyse sodinimo tankis paprastai yra 1100 – 1600 augalų ha⁻¹. Dažniausiai auginimui atliekamas vietos paruošimas, o žemės ūkio dirvožemiuose pirmaisiais metais reikalinga cheminė ar mechaninė piktžolių kontrolė. Didesni sodinimo tankiai (4000 medžių ha⁻¹) galėtų būti naudojami, kai vykdomas sodinimas trumpos rotacijos (5-10 metų) želdiniams. Dažniausiai tokia biomasė yra skirta kietam kurui gaminti, kaip rekomenduojama vidurio Europoje. Tačiau tokie drebulių sodinimo metodai nenaudojami šiaurės Europoje, kur tradiciškai praktikuojami mažesni medžių sodinimo tankiai [5].

Hibridinė drebulė (*P. tremula* L. × *P.tremuloides* Michx.) yra medžių rūšis, tinkama gaminti didelį kiekį atsinaujinančios biomasės per trumpą laiką. Jos auginimo diapozonas Šiaurės Europoje galėtų būti išplėstas, jei auginimui būtų naudojami ne tik žemės ūkio paskirties plotai, bet ir miško žemė, tačiau žinios apie tinkamus miško plotus, sąlygas ir vietos paruošimo metodus hibridinės drebulės auginimui yra ribotos [11].

Švedijoje dėl šios priežasties buvo atlikti du tyrimai, kuriuose nagrinėjamos hibridinės drebulės auginimo sąlygos. Pirmajame šiltnamio sąlygomis buvo atliktas hibridinės drebulės jautrumas rūgštiesiems dirvožemiams, panaudojant dviejų tipų dirvožemį: a) durpių dirvožemis, kurio pH buvo 3,4 – 5,7 ir b) miško dirvožemis, kuriame pH svyravo nuo 3,9 iki 5,3. Esant mažiausiam dirvožemio pH abejais atvejais suletėjo drebulių augimas, tačiau kitų reikšmingų skirtumų nepastebėta. Antrasis

tyrimas buvo atliktas siekiant nustatyti vietos paruošimo metodų poveikį medžių išlikimui ir augimui. Atlikti tokie metodai: 1) kontrolė be vietos papildomo paruošimo, 2) dirvožemio purenimas, 3) supiltas dirvožemio kalnas ir 4) dirvožemio inversija. Tyrimo rezultatai parodė, kad jokių skirtumų tarp šių metodų drebulių išlikimui nenustatyta, tačiau pastebėtas, kad drebulės geriausiai augo ant supilto dirvožemio kalno. Tai galėjo įtakoti gera dirvožemio aeracija ir mažesnė kitų augalų konkurencija. Lauko tyrimas taip pat atskleidė augimo efektyvumą tarp klonų skirtumus, kurie pabrėžia klonų atrankos svarbą prieš masinį dauginimą. Šių tyrimų rezultatai rodo, kad hibridinė drebulė yra mažiau jautri pH ir auginimo vietos paruošimo metodams, palyginti su kitomis tuopų rūšimis, sprendžiant iš panašių atliktų tyrimų [11].

1.4. *In vitro* technologijų taikymas greitai augančių medžių mikroklonavimui

Biotechnologijos mokslo pagalba siekiama sukurti būdus, kurie padėtų pašalinti pagrindines kliūtis, trukdančias genetiškai tobulinti daugiamečius augalus. Svarbiausi uždaviniai yra padidinti augalų biomasės kiekį, prailginti gyvavimo ciklą, sukurti atsparumą kenkėjams ir ligoms, tačiau šiuo metu pagrindinė problema yra genetinės ir paveldimumo informacijos trūkumas. Todėl vienas iš pagrindinių naudojamų biotechnologijos metodų – tai augalų ląstelių ir audinių kultūrų *in vitro* sąlygomis tyrimas [24].

Populus genties Salicaceae L. šeimoje yra apie 25 – 35 augalų rūšių, kurios yra geografiškai labai plačiai paplitusios Šiaurės pusrutulyje, kur vyrauja vidutinės klimato sąlygos. *Populus* rūšys yra labai svarbios tam tikroms pramonėms šakoms, kur yra naudojamos kaip atsinaujinantys išteklių bei atlieka ypatingą vaidmenį vykdant biologinius ir žemės ūkio sistemos mokslinius tyrimus.

In vitro dauginimas – tai ląstelių, audinių ir organelių dauginimas ant skystos ar kietos terpės ir jų auginimas kontroliuojant aplinkos sąlygas. Pradėtas miško medžių klonavimas *in vitro* sąlygomis tapo patraukliu būdu sparčiai dauginti tų medžių rūšių genotipus, kurie buvo sunkiai dauginami kitais įprastiniais metodais.

Dėl vis didėjančio biomasės poreikio ir didelės medienos pramonės paklausos, *in vitro* dauginimo metodai gali būti panaudojami norint sparčiai klonuoti perspektyviausius genotipus ir juos panaudoti trumpos apyvartos želdiniams. Remiantis atliktų tyrimų duomenimis, nustatyta, kad pradėjus naudoti *in vitro* technologijas augalų mikrodauginimui buvo pasiekta didelė mokslinė pažanga augalų audinių kultūrų srityje bei buvo pripažintas kaip vienas iš dinamiškiausių ir perspektyviausių metodų, naudojamų eksperimentinėje biologijoje [6].

Sukurti modernūs drebulės kultūrų dauginimo metodai *in vitro* sąlygomis [25], tačiau vis dar atsiranda daug klausimų, susijusių su kultūros įvedimo į *in vitro* būdais – tai tinkamų maitinamųjų terpių parinkimu, augimo regulatoriaus panaudojimu ir kitais augimui įtakos turinčiais veiksniais. Tuo tikslu, Rusijoje, Kostromos regiono teritorijoje buvo atrinkta daugiau nei 20 įvairių aukštos kokybės diploidinių ir triploidinių drebulės individų. Pagrindinis šio tyrimo tikslas buvo optimaliausias maitinamosios terpės parinkimas drebulių mikrodauginimui *in vitro* bei tuo pačiu užauginti aukštos kokybės drebulės mikroūglių kultūras *in vitro* ir palyginti diploidinių bei triploidinių drebulių augimo greičius ir reprodukciją [26].

Tyrimui buvo pasirinkti perspektyvūs, aukštos kokybės drebulės klonai: vienas diploidinis, pažymėtas Nr.29 ir du triploidiniai klonai Nr.27 ir Nr.35. Atskiros drebulės klonų pašaknio dalys 10 – 20 cm ilgio ir 1 – 3 cm pločio buvo apdorojamos kalio permanganato vandeniniu tirpalu 10 min,

toliau pasodintos paruoštame dirvožemyje ir padedamos po šildančia lempa (1.2.pav.). Prieš tai dirva džiovinimo kameroje buvo sterilizuota. Augalų ūglių iš pašaknio augimas prasidėjo 10 – 14 dieną, o po 20 dienų daigai pasiekė nuo 8 iki 12 cm aukštį. Kultūros įvedimui *in vitro* buvo naudojamos daigų viršutinė dalis, kurios buvo sterilizuotos 70% etanolio ir 3% natrio hipochlorito vandens tirpalu, tada tris kartus išplautos distiliuotame vandenyje. Į maitinamąją terpę buvo perkeliama 0,5 – 1,0 cm ilgio ūgliai. Naudotos MS ir WPM (angl. *woody plant medium*) terpės [26].



1.2.pav. Daigų auginimas iš izoliuotos pašaknio dalies

Gauti tyrimo duomenys parodė maitinamosios terpės įtaką *P. tremula* klonų morfogenezei įvedant ūglius į *in vitro* kultūrą. MS mitybinėje terpėje daigai pradėjo augti po 25 – 28 dienas, o WPM 27 – 33 dienas nuo perkėlimo ant terpės. Augimo reguliatorių įtaka daigų atsiradimo greičiui nepastebėta, tačiau ji akivaizdžiai pastebima po 6 savaičių auginimo. Tačiau didelis aukščio mikroūglių vidutinis prieaugis buvo pastebėtas po 42 dienų MS terpėje be augimo reguliatorių: kolono Nr. 29 vidutinis aukščio prieaugis 2,5 cm, Nr.27 – 3,1 cm, o Nr.35 – 3,2 cm, kai naudojant terpes su augimo reguliatoriais didžiausias prieaugis buvo 2,1 cm [26].

Lietuvoje atlikti tyrimai buvo labiau orientuoti ne į egzogeninių hormonų taikymą, bet tuopos mikrodauginimo metu dujų mainų tarp kultūros ir aplinkos apribojimą. Eksplantų stiebo segmentai buvo išpjauti iš *in vitro* sukurtų hibridinių baltųjų tuopų (*P. alba* L. × *P.tremula* L.). Toliau mikroūgliai buvo inkubuojami stikliniuose mėgintuvėliuose, užsandarintuose su parafinu, arba neužsandarintuose, bet uždarytuose mėgintuvėliuose. Eksperimente buvo naudojama WPM maitinamoji terpė. Pirmiausia mikroūglių augimas buvo pastebėtas užsandarintuose su parafinu mėgintuvėliuose. Rezultatai parodė, kad po trijų mėnesių auginimo išaugusių iš eksplanto mikroūglių skaičiaus užsandarintuose ir neužsandarintuose mėgintuvėliuose skyrėsi, buvo apskaičiuoti ūglių vidurkiai ir jų standartinis nuokrypis. Pirmuoju atveju vidutiniškai buvo $3,2 \pm 0,4$ mikroūgliai, o atuoju – $1,1 \pm 0,1$. Taip pat mėgintuvėlių sandarinimas su parafinu neturėjo didelio reikšmingo poveikio tiriamųjų hibridinių tuopų ūglių aukščiui, tačiau neužsandarintuose mėgintuvėliuose mikroūglių vidutinis aukštis buvo minimaliai didesnis nei užsandarintuose [27].

Remiantis aptartais duomenimis, galima teigti, kad maitinamoji terpė ir išorės veiksniai įtakoja regenerantų augimą *in vitro* sąlygomis. Apibendrintai, nėra ištirta visų veiksnių įtaka ar bendras

kultūrų *in vitro* auginimo metodas visiems augalams, nes skirtingoms rūšims įtakos gali turėti visiškai skirtingi veiksniai. Todėl atliekant eksperimentus *in vitro* turėtų būti atsižvelgiama į pasirinkta audinių kultūrą bei būtent jos mikrodauginimo sąlygas [28].

1.5. Medžių genetiniai tyrimai pasitelkiant molekulinis metodus

1.5.1. DNR išskyrimo metodai iš augalinės medžiagos

Augalai dažnai gamina antrinius metabolitus, tokius kaip alkaloidus, flavonoidus, fenolinius junginius, krakmolinius polisacharidus, terpenus, chininą [29]. Šie junginiai trukdo sėkmingam DNR išskyrimui ir tolimesnėms reakcijoms, tokioms kaip DNR fragmentacijai, amplifikacijai ir klonavimui. Branduolinės DNR išskyrimas ir gryninimas iš augalų susiduria su šiomis pagrindinėmis problemomis: 1) DNR denatūracija dėl endonukleazių, 2) bendras izoliavimas dėl polisacharidų ir 3) inhibitorinių junginių, pavyzdžiui, polifenolių ir kitų antrinių metabolitų, kurie tiesiogiai arba netiesiogiai įtaka fermentinėms reakcijoms. Polifenoliai kaip stiprūs oksidatoriai gali sumažinti ekstrahuojamos DNR išeigą ir grynumą [30].

Polimerazinės grandininės reakcijos (PGR) procedūra, ypač atliekant genetiškai modifikuotą atranką, reikalauja aukštos kokybės DNR, kad būtų užtikrintas sėkmingas amplifikavimas su atkuriamais rezultatais [31].

Yra kelios genominės DNR išskyrimo procedūros iš įvairių augalų rūšių, tačiau šiame darbe naudojama cetilo trimetilo amonio bromido (CTAB). Šis metodas ir jo modifikacijos yra plačiai naudojamas įvairiose laboratorijose dėl savo paprastumo, tačiau jo atlikimas reikalauja daug laiko [32]. Iš augalų, kuriuose DNR yra stipriai izoliuotas, dažnai reikia naudoti CTAB metodo komercinius reagentų komplektus, jeigu norima gauti pakankamai aukštos kokybės genomine DNR. Aukštas DNR grynumas yra reikalingas norint atlikti PGR metodus, pavyzdžiui, atsitiktinai amplifikuota polimorfine DNR (AAPD), mikro- ir makrosatelitinės analizės, restrikcijos fragmentų ilgio polimorfizmas (RFLP) ir amplifikuotas fragmento ilgio polimorfizmas (AFLP) bei genomo kartografavimui ir siekiant ištirti DNR pirštų atspaudus [33]. Siūlomi komerciniai ekstrakcijos metodai padeda lengviau išgryninti ir išskirti DNR, bet dažnai tai būna brangus pasirinkimas, ypač jei analizei reikia daug pavyzdžių [32].

1.5.2. Molekulių žymenų panaudojimas augalų genetiniuose tyrimuose

In vitro regeneracijos tyrimai ne tik atlieka svarbų vaidmenį mikroūglių dauginime bei genetinės informacijos išsaugojime, bet yra neatsiejama dalis genų tobulinimo tyrimuose, panaudojant augalų genų inžineriją įvairioms augalų rūšims. *In vitro* padauginti augalai turi būti kruopščiai išanalizuoti atsižvelgiant į jų genetinę įvairovę naudojant įvairius molekulinis žymenis [6].

Žmonės jau nuo senų laikų tiria ir aprašo augalų genetinę įvairovę. Ankstyvieji metodai buvo paremti fenotipiniais požymiais ir vertinami vizualiai, aprašant augalų žiedų spalvą, lapų formą, aukštį ir kitus išorinius bruožus [8]. Kadangi morfologiškai ir anatomiškai skirtingi augalų klonai gali atrodyti panašūs, tai labai svarbu patikimai nustatyti ir atskirti tuos klonus, kurie gali būti glaudžiai susiję ir beveik nesiskirti savo išvazda nuo kitų rūšių atstovų. Miškininkystėje genetinės įvairovės identifikavimo problema yra ypač svarbi, nes išorinė medžių išvaizda gali priklausyti nuo aplinkos parametrų ir skirtis tarp klonų [34]. Dėl šių priežasčių sparti technologijų plėtra augalų lastelių ir audinių kultūrų srityse per paskutinius XX a. dešimtmečius paskatino molekulių žymenų panaudojimą augalų biotechnologijoje bei genetiniuose tyrimuose [35, 36].

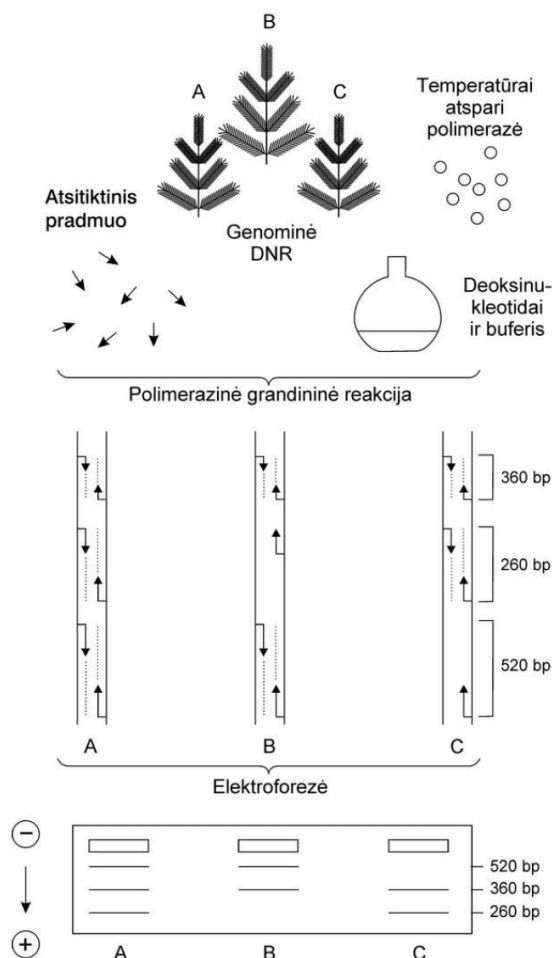
Genetinės įvairovės analizė paprastai grindžiama to paties geno skirtingų alelių koduojamų fermentų nustatymu arba molekuliniais žymenimis, kurie paprastai yra natūraliai selektyvūs. Buvo atliktas tyrimas siekiant nustatyti, kokiais būdais galima įvertinti genetinę įvairovę tarp populiacijų. Buvo tiriamas heterozigotiškumas, kiekybinė genetinė variacija ir populiacijos dydis. Remiantis išvadomis, pagrįstomis 34 duomenų rinkiniais, nustatyta, kad genetinę įvairovę galima įvertinti:

1. polimorfinių genų skaičiumi ar procentais populiacijoje;
2. kiekvieno polimorfinio geno alelių skaičiumi;
3. heterozigotinių lokusų santykiu vienam individui.

Elektroforezė ir molekuliniai metodai, tokie kaip DNR analizė, tiesiogiai matuoja genetinę įvairovę bei parodo rūšies ar populiacijos genetinės įvairovės lygį. Toliau pateikiama pagrindinių žymenų tipų, naudojamų vertinat genetinę įvairovę, apžvalga [37].

Genetiniai žymenys gali būti skirstomi į tris pagrindines klases: morfologiniai, biocheminiai ir molekuliniai, pastarieji žymenys yra efektyviausi [38]. Pagrindiniai molekuliniai žymenų metodai, naudojami augalų genetikoje ir selekcijoje, yra šie: atsitiktiniai amplifikuotos polimorfinės DNR (AAPD) metodas, amplifikuotų fragmentų ilgio polimorfizmas (AFLP), mikrosatelitai (SSR) ir restrikcijos fragmentų ilgio polimorfizmas (RFLP) [39].

Atsitiktiniai amplifikuotos polimorfinės DNR (AAPD) molekuliniai žymenys buvo pirmieji, kurie buvo paremti polimerazės grandininės reakcijos metodu genetinės įvairovės nustatymui. Tai techniškai pats paprasčiausias metodas (1.3.pav.) [40].



1.3.pav. Principinė AAPD metodo schema

Pradmenys – tai viengrandės DNR gabaliukai (oligonukleotidai), turintys seką, komplementarią šabloninės DNR sekoms. AAPD žymenys generuojami atsitiktiniu genomine DNR amplifikavimu dažniausiai naudojant 10 nukleotidų ilgio pradmenis su ne mažesniu kaip 50% bendru G + C porų skaičiumi. Toliau gautus DNR fragmentus atskiriant agarozės gelyje naudojant etidžio bromidą ir galiausiai išryškinant gelį ultravioletinėje šviesoje. Nors sekos yra atsitiktinės, trumpų pradmenų panaudojimas yra reikalingas siekiant padidinti tikimybę rasti temperatūrai atsparias polimerazes. Kadangi šis metodas nereikalauja išankstinių žinių apie analizuojamą genomą, todėl naudojant universalius pradmenis galima tirti įvairių rūšių augalų genetinę įvairovę. Pagrindinis šio metodo trūkumas yra tas, kad amplifikacijos priklauso nuo reakcijos sąlygų, kurios gali skirtis laboratorijose, net ir temperatūros skirtumo pakanka, kad būtų gauta skirtingi bendra AAPD profilio kokybė [37].

Mikrosatelitai – tai dar vienas polimerazės grandininė reakcija paremtas metodas, kuris pagausina trumpų pasikartojančių sekų sancaupas (mikrosatelitus). Šis metodas priklauso kartotinių DNR sekų grupei. Šie mikrosatelitiniai motyvai paprastai yra 18 – 24 bazių porų ilgio. Naudojant PGR technologiją, galima lengvai nukreipti ir sustiprinti specifinį mikrosatelitinį lokusą. Kiekvieno lokuso tyrimui reikalingi du specifiniai pradmenys: tiesioginis ir atvirkštinis. PGR pradmenys yra sukuriami pagal konservatyvias DNR sekas, supančias mikrosatelitinį lokusą. Naudojant kelis mikrosatelitinius žymenis per gana trumpą laiką galima sugeneruoti tarp- arba intraspecifinius populiacijos genetinius duomenis. Panaudojant didesnę žymenų skaičių, padidėja tikimybė sudaryti interspecifinį arba intraspecifinį kintamumą [41].

1.1.lentelė. Dažniausiai naudojamų molekulinį žymenų tipai ir jiems būtinos sąlygos

Molekulinis žymuo	Reikalingas DNR kiekis	DNR sekos reikalingumas	Paremti PGR	Polimorfizmo lygis	Reikalingas gelis
AAPD	mažas	Ne	Taip	Vidutiniškai aukštas	Agarozės
AFLP	Vidutiniškai didelis	Ne	Taip	Aukštas	Akrilamidinis
SSR	Vidutiniškai mažas	Taip	Taip	Aukštas	Akrilamidinis
RFLP	didelis	Ne	Ne	Vidutiniškai žemas	Agarozės

Amplifikuotų fragmentų ilgio polimorfizmas – šis metodas pagrįstas restrikcijos endonukleazės fermentais ir PGR technologija [42]. Visa genomine DNR sukarpoma su restrikcijos fermentų pora. Žinomos sekos adapteriai prikljuojami prie DNR fragmentai. Pradmenys komplementarus adapteriams naudojami pagausinti restrikcijos fragmentus. DNR fragmentai atskiriami agarozės gelyje. AFLP metodui naudojamos pradmenų poros paprastai amplifikuoja 50 – 100 juostų bei nereikalauja išankstinių žinių apie analizuojamą genomą. AFLP polimorfizmas gali būti susijęs su restrikcijos vietos mutacijomis, sekų, besiribojančių su restrikcijos vieta, mutacijos, amplifikuotų fragmentų įterpimo, dubliavimo ar ištrynimo mutacijomis. Šios mutacijos gali pakeisti fragmento išvaizdą ir amplifikuoto fragmento dydžio padidėjimą ar sumažėjimą [37].

Molekuliniai žymenys, pagrįsti restrikcijos – hibridizacijos metodais, augalų tyrimų srityje pradėti naudoti gana senai. Restrikcijos endonukleazės yra fermentai, galintys sukarpyti DNR į fragmentus, identifikuoti specifines sekas ir amplifikuoti įvairaus dydžio polinukleotidinius fragmentus. Tačiau, tarp dviejų vietų ir fermento viduje mutacijos gali sukelti amplifikuoto fragmento, gauto po

restrikcinio karpymo, ilgio pokyčius. RFLP žymekliai yra palyginti polimorfiniai, iš esmės paveldimi, lengvai gausinami ir leidžia vienu metu analizuoti daugybę mėginių [37]. Nepaisant to, šis metodas nėra labai plačiai naudojamas, nes jo atlikimas užima daug laiko, reikalingi brangūs, radioaktyvūs ir toksiški reagentai bei reikalauja aukštos kokybės DNR [43].

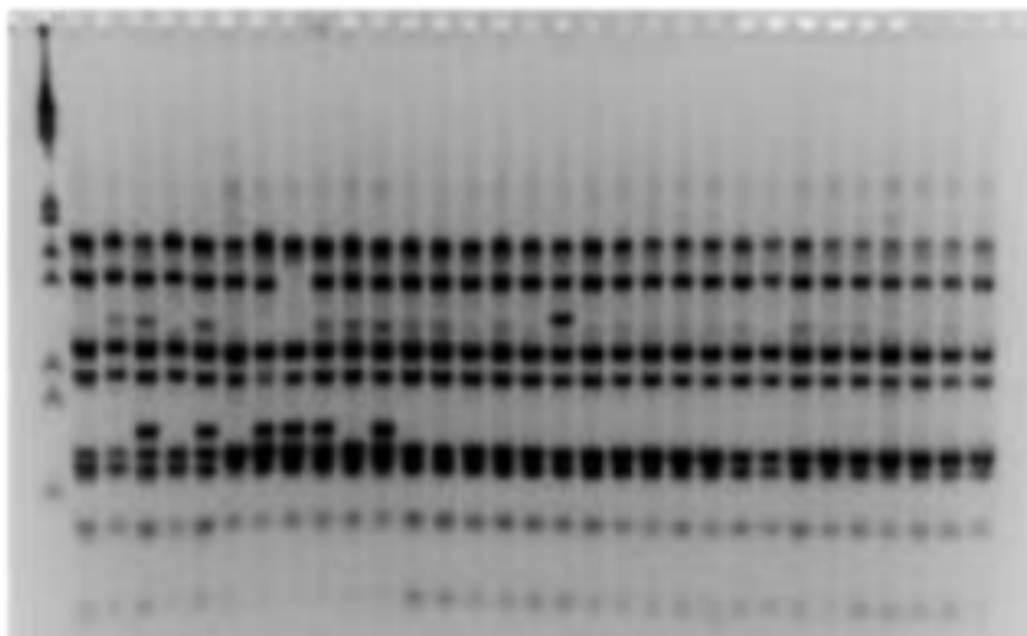
1.5.3. AAPD molekuliniai žymenys ir jų taikymas

Šiame tyrime drebulės hibridų polimorfizmo nustatymui buvo naudojamas AAPD metodas. AAPD analizė yra dažniausiai naudojamas molekulinis žymuo genetinės įvairovės tyrimuose. Pagrindinė šio metodo sėkmės priežastis – tai reikalingas mažas DNR kiekis bei paprastas metodo atlikimas [44].

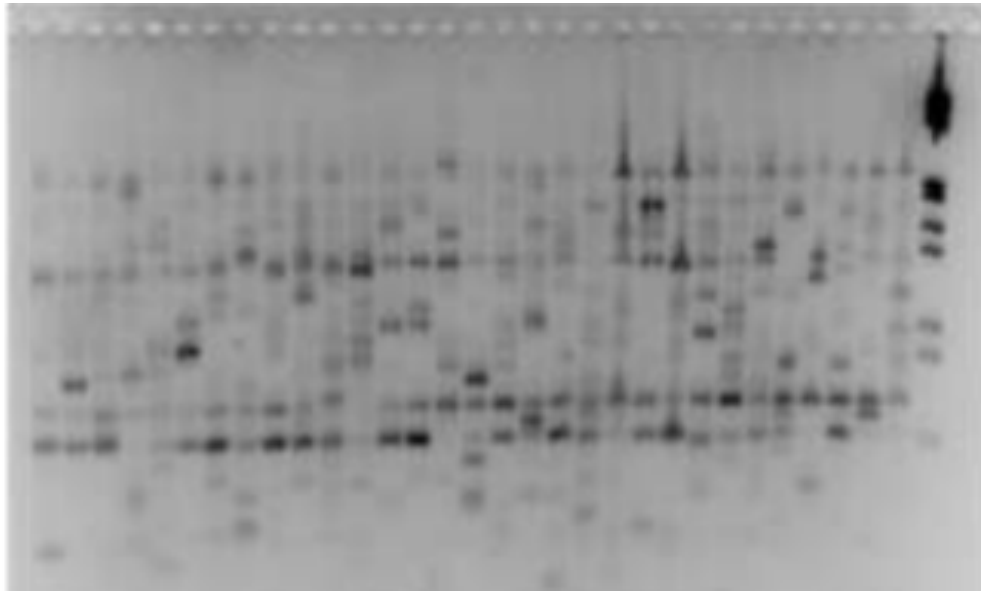
Buvo atliktas tyrimas, kuriame aptariama AAPD žymenų atlikimo eiga, duomenų analizė ir interpretavimas bei pagrindiniai AAPD žymenų panaudojimo būdai biologijoje.

Kaip ir buvo paminėta, AAPD metodas pasižymi paprastu metodo atlikimu. Pradžioje išskiriama DNR iš augalinės medžiagos. Užtenka mažo kiekio DNR, tačiau ji turi būti pakankamo grynumo. Jei grynumo lygis per mažas, bus sunku užtikrinti rezultatų atkuriamumą. Išskirtos DNR koncentracija nustatoma spektrofotometru, esant 260 ir 280 nm bangos ilgiui. Santykis 260/280 parodo DNR grynumą, rekomenduojama, kad jis būtų ne mažesnis nei 1,6. Toliau vykdoma polimerazės grandininė reakcija naudojant oligonukleotidinius pradmenis. DNR fragmentų atskyrimas vykdomas elektroforezės gelyje. Rezultatai išryškunami ultravioletinėje šviesoje.

Gauti elektroforezės spektrai ne visada gaunami vienodos kokybės. Kartais gaunami labai aukštos kokybės amplifikacija (1.4.pav). Dauguma juostų buvimas ar nebuvimas būna labai aiškus, todėl lengva atskirti skirtingo dydžio fragmentus. Tačiau kartais gaunami elektroforezės spektrai, kuriuose amplifikacijos kokybė žema, juostos gaunamos miglotos, neryškios, sunku atskirti fragmentus vienas nuo kito, todėl tokie AAPD rezultatai gali būti sunkiai įvertinami (1.5.pav.) [40].



1.4.pav. AAPD metodu gauta aukštos kokybės amplifikacija



1.5.pav. AAPD metodu gauta žemos kokybės amplifikacija

Pagrindiniai APPD motodo pritaikymai augalų tyrimuose:

1. genetinei įvairovei / polimorfizmui nustatyti;
2. germoplazmos apibūdinimui;
3. nustatyti populiacijos genetinę struktūrą;
4. somotokloniniai variacijai nustatyti;
5. rūšies identifikavimui;
6. hibrido grynumui nustatyti;
7. kurti genetinius žyменis;
8. nustatyti augalų atsparumą pesticidams ir herbicidams [14, 40].

2. Medžiagos ir tyrimų metodai

2.1. Tyrimų vieta

Bandymai atlikti 2018 – 2019 m. Lietuvos agrarinių ir miškų mokslo centro filialo Miškų instituto Miško augalų biotechnologijos laboratorijoje.

2.2. Tyrimų objektai

Tyrimams atlikti buvo pasirinkti Lietuvos miškų instituto laboratorijoje *in vitro* sukurto modelinio medžio – hibridinės drebulės (*Populus tremula* L. × *Populus tremuloides* L.) palikuonys. Bandymams atlikti buvo panaudoti 160 hibridinės drebulės individai.

2.3. Tyrimų sąlygos

Hibridinio medžio įvedimas ar perkėlimas į *in vitro* kultūrą buvo atliekamas steriliomis sąlygomis, veikiančiame laminare. Prieš darbo pradžią laminaro stalas 20 min sterilinamas ultravioletine lempa. Bandymas buvo atliktas dėvint pirštines, naudojant spiritinę lempuotę ir etilo alkoholį (96%), kuris panaudojamas sterilizuojant metalinius darbo įrankius (pincetus, skalpelius). Prieš kiekvieną atliekamą veiksmą metaliniai įrankiai buvo papildomai trumpai sterilinami, pamerkiant juos į etilo alkoholį ir pakaitinant spiritinės lempuotės liepsnoje. Plastmasiniai indeliai ir mėgintuvėliai buvo sterilinami autoklave 30 min 120 °C temperatūroje. Laminaro paviršius darbo eigoje reguliariai valomas 96 % spiritu.

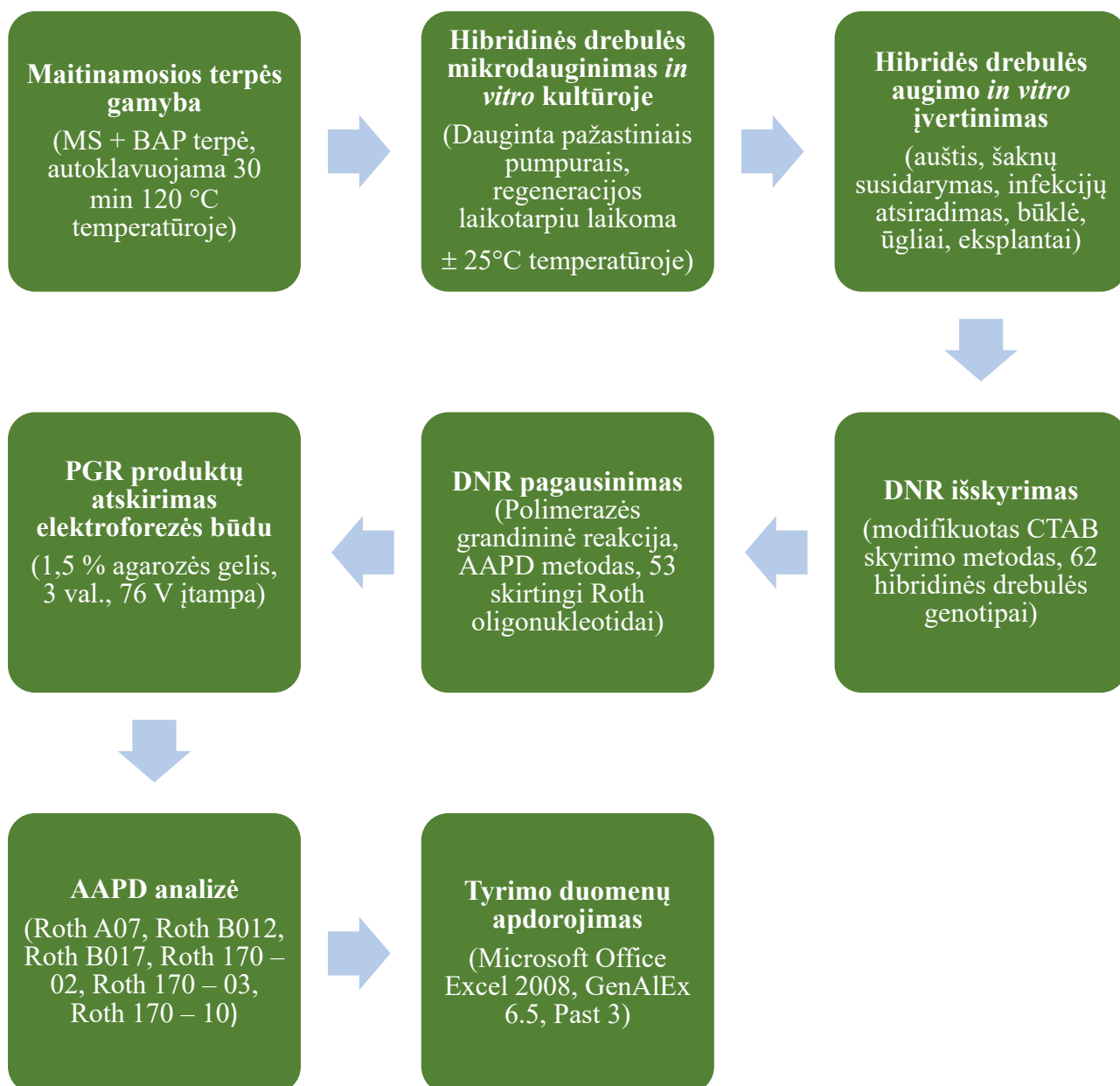
DNR išskyrimas, PGR ir AAPD bandymai buvo atlikti dėvint pirštines, naudojant sterilius mėgintuvėlius bei automatinės pipetės antgalius.

2.4. Tyrimų metu naudota aparatūra

- ◇ Laminarinis boksas „TKA Teknolabo A.S.S.I.“
- ◇ Autoklavas „Autoclave 60”
- ◇ Svarstyklės „And“
- ◇ pH matuoklis „Winlab“
- ◇ Skysčių dozatorius „Eppendorf varispenser plus“
- ◇ Mikrobangų krosnelė „Samsung”
- ◇ Purtyklė „IKA MS1 Minishaker“
- ◇ Termostatuojama vandens vonelė „Memmert WNB14”
- ◇ Mikrocentrifuga „Eppendorf 5415D Centrifuge“
- ◇ Automatinės pipetės „Socorex“
- ◇ Spektrofotometras „NanoDrop One“
- ◇ Traukos spinta „BIOBASE“
- ◇ Termocikleris „Biometra T-Gradient“
- ◇ Elektroforezės aparatūra „Biometra. Gibco BRL“
- ◇ Elektroforezės rezultatų išryškinimo sistema „BioDocAnalyse Biometra Ti5“

2.5. Tyriamųjų darbų principinė schema

Tiriamieji darbai buvo atlikti pagal žemiau pateiktą principinę darbų schemą (2.1.pav), kurioje atsispindi bandymuose naudoti metodai bei trumpi jų apibūdinimai ar sąlygos.



2.1.pav. Principinė schema

2.6. Tyrimų metodai

2.6.1. Maitinamosios terpės sudėtis ir gamyba

Bandymams buvo naudojami hibridinės drebulės stiebo segmentų ir lapų eksplantai iš donorinio augalo, užauginto aseptinėmis sąlygomis. Eksplantai buvo auginti ant Murashige ir Skoog (MS) maitinamosios terpės, papildytos 6 – benzilaminopurino (BAP) 1 mg/l ir 3 – indolilacto rūgštis (IAR) 0,01 mg/ ml augimo reguliatoriais (2.1.lentelė).

Ruošiant mitybinę terpę koncentruotų tirpalų atitinkamai tūriai buvo išmatuoti steriliomis pipetėmis ar matavimo cilindrais ir supilstyti į švairius stiklinius butelius. Sausos medžiagos pasvertos ir ištirpintos. Augimo reguliatorių 6 – benzilaminopurino ir 3 – indolilacto rūgšties reikalingi kiekiai buvo pasverti ir ištirpinti atitinkamuose tirpikliuose. Toliau ruošiama terpė praskiesta distiliuotu vandeniu iki pusės numatyto galutinio tūrio. Naudojantis pH – metru nustatytas terpės rūgštingumas, kuris toliau koreguotas 1 M NaOH ir 1 M HCl tirpalais, kol pH varijuoja nuo 5,3 iki 5,8. Toliau į paruoštą mišinį įberama 5 g gelorito vienam litrui terpės. Gauta terpė po 500 ml supilstyta į 1 l talpos karščiui atsparius butelius. Maitinamoji terpė autoklavuojama 30 minučių 120 °C temperatūroje. Po autoklavavimo, terpė atvėsinama iki 40 °C. Paruošta terpė išpilstoma į sterilius plastmasinius indelius ar mėgintuvėlius [45].

2.1.lentelė. Tyrimuose naudotos maitinamosios terpės sudėtis ir kiekiai

Medžiagos	Medžiagų kiekiai
Makroelementai, mg/l	
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
KH ₂ PO ₄	170
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440
MgSO ₄ · 7H ₂ O	555
Mikroelementai, mg/m	
KI	0,83
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22,3
Na ₂ MoO ₄ · 4H ₂ O	0,25
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,03
H ₃ B ₃	6,2
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8,6
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,03
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27,8
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	37,8
Angliavandeniai, g/l	
Sacharozė	30
Vitaminai, mg/l	
Piridoksinas · HCl (B ₆)	0,2
Tiaminas · HCl (B ₁)	0,2
Askorbo rūgštis	0,5
Nikotininė rūgštis	0,5
Mio – Inozitolis	100
Augimo reguliatoriai, mg/l	
6 – benzilaminopurinas (BAP)	0,1
3 – indolilacto rūgštis (IAR)	0,01

Augimo reguliatorių reikalingi miltelių kiekiai buvo pasverti ir suberti į atskiras matavimo kolbas. Toliau atsverti BAP ir IAR milteliai buvo ištirpinti 2 – 5 ml atitinkamuose tirpikliuose. Augimo reguliatorius 3 – indolilacto rūgštis ištirpinama vandenyje, o 6 – benzilaminopurinas – 1 N NaOH ir vandenyje. Visiškai ištirpinus augimo reguliatorių miltelius, į kolbas buvo įpilta dvigubas kiekis distiliuoto vandens. Gautą tirpalą išmaišius pripilama distiliuoto vandens iki 100 ml žymės ant kolbos.

Reikalingas paimti augimo reguliatoriaus tirpalo tūris terpei iš pradinio tirpalo apskaičiuojamas pagal formulę (2.1):

$$X = \frac{A \times B}{C} \quad (2.1)$$

čia: X – reikalingas paimti tirpalo tūris iš pradinio paruošto tirpalo su augimo reguliatoriaus medžiaga, ml;

A – reikalinga gauti galutinė koncentracija, mg/l;

B – praskiedimo tūris, l;

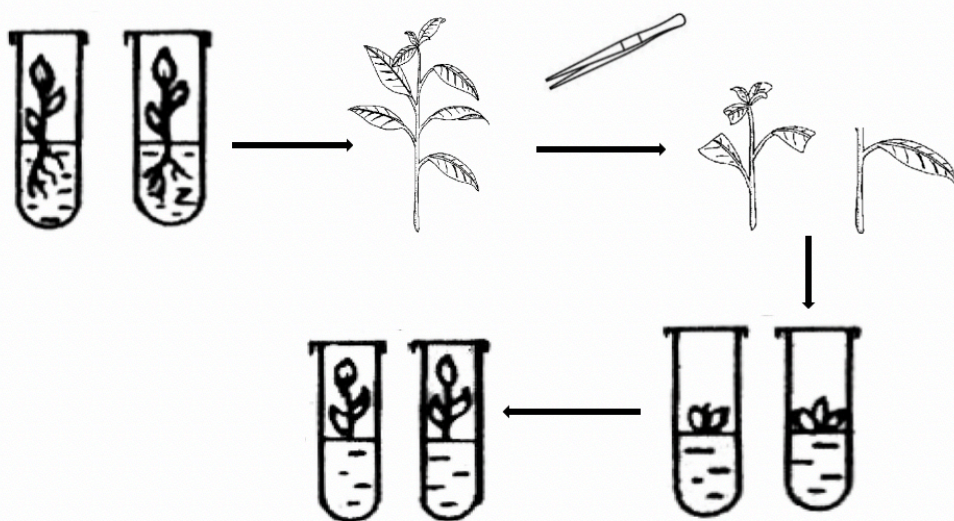
C – pradinio tirpalo, paruošto su tiriamąja medžiaga, koncentracija, mg/ml.

2.6.2. Hibridinės drebulės mikrodauginimas *in vitro* kultūroje

Drebulės hibridai buvo padauginami pažastiniais pumpurais, eksplantai perkelti tokiu būdu:

1. Drebulės mikroūglis su steriliu pincetu išimamas iš indelio ir padalijamas į trumpesnes atkarpas.
2. Nuo mikroūglių atkarpų buvo pašalinami lapai, paliekant po kelis viršūnėje.
3. Paruošti nauji eksplantai perkeliama į mėgintuvėlius su regeneraciją skatinančia maitinamąja terpe.
4. Mėgintuvėliai laikomi regeneracijos kambarėje, kuriame palaikoma 20 – 25 °C temperatūra.

Mikroūglių pagausinimas buvo atliktas laminare ant sterilių stiklinių lėkštelių. Ūglių mikrodauginimui buvo naudojami stikliniai mėgintuvėliai, uždaromi plastikiniais dangteliais. Į mėgintuvėlius išpilstyta po 5 ml maitinamosios terpės [27].



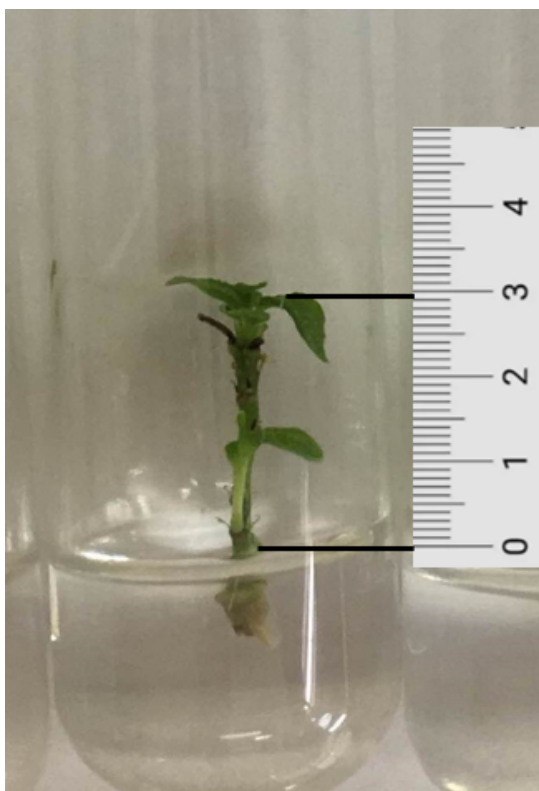
2.2.pav. Hibridinės drebulės mikroūglių mikrodauginimo principinė schema

2.6.3. Hibridinės drebulės augimo *in vitro* įvertinimas

Įvertintas morfologinių struktūrų susidarymas ant hibridinės drebulės eksplantų. Vertinimas buvo atliekamas du kartus: pirminis hibridų mikroūglių vertinimas ir naujai padaugintų mikroūglių po 4 savaitių auginimo *in vitro* sąlygomis augimo požymių įvertinimas, kurių metu nustatyti hibridinės drebulės mikroūglių, augintų ant maitinamosios terpės, šie fenotipiniai požymiai: aukštis (2.3.pav.), šaknų susidarymas, infekcijų atsiradimas, būklė bei ūglių ir eksplantų skaičius (2.2.lentelė).

2.2. lentelė. Hibridinės drebulės augimo požymių vertinimo kriterijai

Eil. Nr.	Apibendrintas požymis	Požymio aprašymas, matavimo būdas, skalė
1.	Aukštis	Matuotas atstumas nuo viršutinio pumpuro iki maitinamosios terpės, cm
2.	Šaknų susidarymas	Šaknų išvaizda ir buvimas/nebuvimas aprašytas kodais ir konvertuojamas į balus: 5 – formuoja šaknis, stambias su daug pridėtinių šaknelių, 4 – formuoja šaknis, vidutinio stambumo su keliomis pridėtinėmis šaknelėmis, 3 – šaknys smulkios, be pridėtinių šaknelių, 2 – viena šaknelė, 1 – nėra šaknų
3.	Infekcijos atsiradimas	Bakterija/ grybelinė infekcija
4.	Būklė	Eksplantų išvaizda ir būklė aprašyta kodais ir konvertuojama į balus: 5 – būklė puiki, gausus lapuotumas, ūglis žaliuoja, 4 – būklė gera, vidutinis lapuotumas, ūglis žaliuoja, 3 – būklė vidutinė, negausus lapuotumas, ūglis žaliuoja, 2 – būklė prasta, nėra naujų lapų, ūglis padžiuvęs, 1- būklė bloga, ūglis nudžiuvęs
5.	Ūgliai	Eksplantų ir regeneracijos laikotarpiu išaugusių ūglių suma, vnt
6.	Eksplantai	Pasodintų eksplantų skaičius, vnt



2.3.pav. Drebulės mikroūglio aukščio matavimas

2.6.4. Hibridinės drebulės DNR išskyrimas modifikuotu CTAB metodu

Molekuliniams tyrimams buvo atrinkti 58 geriausiai fenotipiniais požymiais pasižymėję genotipai (2.3 lentelė). Hibridinės drebulės genotipams buvo suteiktas numeris.

Suteiktas numeris	Genotipo pavadinimas	Suteiktas numeris	Genotipo pavadinimas	Suteiktas numeris	Genotipo pavadinimas
Nr.1	C25-7	Nr.24	C25 – 5	Nr.44	D18 – 5
Nr.2	H617 - 7	Nr.25	D14 – 1	Nr.45	H617 – 55
Nr.3	A6 - 3	Nr.26	B8 – 1	Nr.46	C13 – 1
Nr.4	C2 -1	Nr.27	A13 – 1	Nr.47	D14 – 1
Nr.5	H617 – 4	Nr.28	C25 – 6	Nr.48	D18 – 5
Nr.6	A6 – 2	Nr.29	D18 – 2	Nr.49	C15 – 1
Nr.7	H617 – 45	Nr.30	C16 – 4	Nr.50	D7 – 3
Nr.9	H617 – 41	Nr.31	A3 – 5	Nr.52	C7 – 1
Nr.10	H617 - 5	Nr.32	C8 – 1	Nr.53	A9 – 4
Nr.11	A7 – 6	Nr.33	C5 – 4	Nr.54	C33 – 1
Nr.13	A9 – 1	Nr.34	C1 – 1	Nr.55	H617 – 13
Nr.14	H617 – 9	Nr.35	A8 – 2	Nr.56	D14 – 3
Nr.16	H617 – 40	Nr.36	D5 - 3	Nr.57	B9 – 1
Nr.17	D13 – 2	Nr.37	D5 – 4	Nr.58	C24 – 4
Nr.18	A10 – 3	Nr.38	H617 – 34	Nr.59	A11 – 1
Nr.19	C21 – 3	Nr.39	H617 – 12	Nr.60	H617 – 28
Nr.20	A6 – 6	Nr.40	D12 – 4	Nr.61	C23 – 4
Nr.21	C30 – 6	Nr.41	C8 – 1	Nr.62	H617 - 51
Nr.22	C 10 – 1	Nr.42	H617 – 37	-	-
Nr.23	D17 – 5	Nr.43	C35 – 1	-	-

Drebulės DNR buvo išskirta naudojant modifikuotą CTAB skyrimo metodą [46], kuris atliktas tokiu būdu:

Bandymui į 250 ml butelį buvo paruoštas sterilus ekstrakcijos buferis (2.4.lentelė).

2.4. lentelė. Ekstrakcijos buferio sudėtis ir kiekiai

Reagentas	Kiekis, ml
EDTA	0,04
TRIS	0,1
NaCl	0,275
CTAB	0,2
β – merkapotetanolis	0,0002
PVP – 40	10
Dejonizuotas vanduo	0,3848

Toliau pasverta 50 – 100 mg hibridinės drebulės šviežių lapų, sudėta į 2 ml talpos mėgintuvėlius ir grūstuvėliu smulkiai sutrinta. Sutrinti lapai užpilti iš anksto paruoštu ekstrakcijos buferiu, viskas gerai

išmaišyta vartant. Mėginys buvo inkubuotas vandens termostate 60 °C temperatūroje 25 min. Po inkubacijos atvėsintas iki kambario temperatūros. Į atvėsintą mėginį įpilama 1 ml chloroformo, išmaišoma ir centrifuguojama mikrocentrifugoje 3 min. 10000 aps./min. greičiu. Nucentrifuguoto mėginio viršutinė vandeninė fazė (iki 380 μl), kurioje yra DNR, perpilta į naują 2 ml talpos mėgintuvėlį, į kurį toliau pilama 0,5V 5M NaCl ir gerai išmaišoma. Išmaišius įpilta 2V šalto 95 % etilo alkoholio. Mėginys vėl išmaišomas vartant ir palaikomas 20 min. –20 °C temperatūroje.

Atšaldytas mėginys su nusėdusia DNR buvo centrifuguojamas 5 min. 10000 aps./min. greičiu. Supernatantas atsargiai pašalintas, o nusėdusi DNR ištirpinta 300 μl dejonizuotame vandenyje. Į mėgintuvėlį su ištirpinta DNR įpilta 2,5 μl RNRazės A ir inkubuojama vandens termostate 37 °C temperatūroje 30 min. Po inkubacijos įpilta 300 μl chloroformo, išmaišyta ir centrifuguota 3 min. 10000 aps./min. greičiu. Viršutinė vandeninė fazė atsargiai perkelta į naują 1,5 ml mėgintuvėlį, tuomet įpilta 0,1V natrio acetato (3M) ir 2,5V šalto (–20 °C) 95% etilo alkoholio. Mėginys išmaišytas vartant ir laikytas –20°C temperatūroje 30 min., kad išsiskirtų DNR. Atšaldytas mėginys nucentrifuguotas 5 min. 10000 aps./min. greičiu. Supernatantas atsargiai pašalintas, o DNR praplauta 200 μl 76 % alkoholiu.

Išskirta DNR ištirpinta 100 μl steriliame dejonizuotame vandenyje. Mėginiai toliau laikomi šaldytuve 4 °C temperatūroje. Ilgesnį laiką nenaudojama DNR buvo saugoma šaldytuve – 20 °C temperatūroje

Išskirtos DNR koncentracija buvo nustatyta naudojant spektrofotometrą (2.4.pav.) 260 nm bangos ilgyje.



2.4.pav. Spektrofotometras „NanoDrop One“

Tyrimams atlikti DNR koncentracija mėginiuose turi būti iki 50 ng/μl. Mėginiai, kurių koncentracijos gautos didesnės, buvo skiedžiami dejonizuotu vandeniu. Reikalingas dejonizuoto vandens kiekis skiedimui apskaičiuotas pagal formulę (2.2.):

$$V_{H_2O} = \left(\frac{C_x \cdot V_m}{C_n} \right) - V_m \quad (2.2)$$

Čia: V_{H_2O} – reikalingas dejuonizuoto vandens, μl;

C_x – gauta mėginio koncentracija, ng/μl;

V_m – naudotas mėginio tūris, μl;

C_n – norima gauti koncentracija, ng/μl.

2.6.5. Polimerazės grandininė reakcija (PGR), panaudojant atsitiktinius pradmenis

Naujai gautų hibridinės drebulės regenerantų tapatumo nustatymui buvo naudotas atsitiktiniai pagausintos polimorfinės DNR metodas (RAPD). DNR pagausinimas buvo atliekamas tokiu būdu:

DNR gausinimo reakcijos mišinys (2.5. lentelė) buvo paruoštas steriliomis sąlygomis traukos spintoje į 0,5 ml talpos sterilius vienkartinis mėgintuvėlius.

2.5.lentelė. DNR pagausinimo reakcijos mišinio sudėtis ir jų kiekiai

Reagentas	Kiekis, µl;
10X PGR buferis	2,5
MgCl ₂	3,0
dNTP	2,5
Pradmuo	1,0
<i>Taq</i> DNR polimerazė	0,2
DNR matrica	2,0
Dejonizuotas vanduo	13,8

Paruoštas mėginys gerai išmaišytas ir trumpai nucentrifuguotas. Ant mėginio viršaus užlašinta 15 µl mineralinės alyvos ir mėgintuvėliai su mišiniu trumpai nucentrifuguoti. Bandyme naudoti 53 skirtingi Roth oligonukleotidiniai pradmenys (2.6.lentelė).

2.6. lentelė. Pradmenys naudoti *P. tremula* × *P. tremuloides* hibrido palikuonių DNR pagausinimui

Pradmuo	Pradmenų sekos 5'-3'	Pradmuo	Pradmenų sekos 5'-3'
Roth A01	CAGGCCCTTC	Roth B08	GTCCACACGG
Roth A02	TGCCGAGCTG	Roth B09	TGGGGGACTC
Roth A03	AGTCAGCCAC	Roth B010	CTGCTGGGAC
Roth A04	AATCGGGCTG	Roth B011	GTAGACCCGT
Roth A05	AGGGGTCTTG	Roth B012	CCTTGACGCA
Roth A06	GGTCCCTGAC	Roth B013	TTCCCCGCT
Roth A07	GAAACGGGTG	Roth B014	TCCGCTCTGG
Roth A08	GTGACGTAGG	Roth B015	GGAGGGTGTT
Roth A010	GTGATCGCAG	Roth B016	TTTGCCCGGA
Roth A011	CAATCGCCGT	Roth B017	AGGGAACGAG
Roth A012	TCGGCGATAG	Roth B018	CCACAGCAGT
Roth A013	CAGCACCCAC	Roth B019	ACCCCCGAAG
Roth A014	TCTGTGCTGG	Roth B020	GGACCCCTAC
Roth A015	TTCCGAACCC	Roth 170-01	CATCCCGAAC
Roth A016	AGCCAGCGAA	Roth 170-02	CAGGGTCGAA
Roth A017	GACCGCTTGT	Roth 170-03	ACGGTGCCTG
Roth A018	AGGTGACCGT	Roth 170-04	CGCATTCCGC
Roth A019	CAAACGTCCG	Roth 170-05	GAGATCCGCG
Roth A020	GTTGCGATCC	Roth 170-06	GGACTCCACG
Roth B01	GTTTCGCTCC	Roth 170-07	ATCTCCCGGG
Roth B02	TGATCCCTGG	Roth 170-08	CTGTACCCCC
Roth B03	CATCCCCCTG	Roth 170-09	TGCAGCACCG
Roth B04	GGACTGGAGT	Roth 170-10	CAGACACGGC
Roth B05	TGCGCCCTTC	Roth 370-01	TCCCTGTGCC
Roth B06	TGCTCTGCCC	Roth 370-04	GTATCCGCG
Roth B07	GGTGACGCAG	Roth 370-10	CTGTCCGGTC

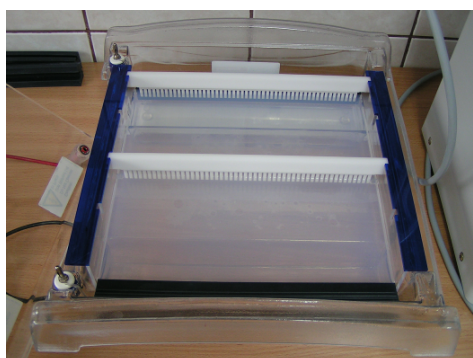
Polimerazinė grandininė reakcija atlikta automatiškai termocikleryje. DNR gausinimo pakopos aprašytos 2.7.lentelėje, 2–4 pakopos kartojamos 40 ciklų. Po reakcijos mėgintuvėliai su PGR produktais iki tolimesnės analizės laikyti šaldytuve [40].

2.7.lentelė. DNR gausinimo pakopų vykdymo sąlygos

Pakopa	Temperatūra, °C	Trukmė, min
Pirminė denatūracija	94	5
DNR denatūracija	94	1
Pradmenų prilipimas	35	1
DNR sintezė	72	2
Baigiamoji DNR sintezė	72	5
Atvėsinimas	25	1

2.6.6. PGR produktų atskyrimas agarozės gelyje elektroforezės metodu

PGR produktų atskyrimas atliktas elektroforezės būdu 1,5 % agarozės gelyje. Bandymui atlikti buvo pasverta 6 g agarozės, kuri toliau užpilta 400 ml 10X TBE buferiu ir 360 ml distiliuotu vandeniu. Viskas gerai išmaišoma. Mišinys mikrobangų krosnelėje pakaitintas 2 – 3 min., keletą kartų gerai pamaišant, kol agarozė visiškai ištirpsta. Gautas gelis atvėsintas iki 60 °C temperatūros, tada į jį buvo įpilta 40 µl etidžio bromido tirpalo. Paruoštas agarozės tirpalas supiltas į elektroforezės padėklą su šukomis ir buvo paliekamas, kol gelis visiškai sustings (2.5.pav.)



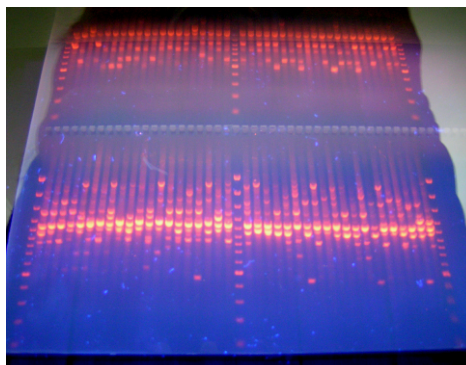
2.5. pav. Paruoštas gelis

Sustingus agarozės geliui, atsargiai ištrauktos šukos, kad susidarytų šulneliai. Paruošti DNR mėginiai su automatine pipete supilstyti į gelio šulnelius po 25 µl (2.6.pav).



2.6. pav. Mėginių supilstymas į gelio šulnelius

Gelis su mėginiais atsargiai užpiltas 1X TBE buferiu, kad visiškai apsemtų. Į kelis šulnelius šalia tiriamųjų mėginių buvo įpilta 2 µl DNR ilgio standarto. Elektroforezė atlikta apie 3 val. esant 76 V įtampai. Pabaigus vykdyti elektroforezę, toliau naudojant BioDocAnalyse aparatūrą, gautas gelis išryškintas UV šviesoje ir nufotografuotas (2.7.pav.) [47].



2.7.pav. Elektroforezės metodu gautas spektras

2.6.7. Oligonukleotidinių pradmenų įvertinimas

Pradmenų informatyvumas buvo įvertintas pagal kelis kriterijus:

- bendrą DNR amplifikacijos kokybę;
- polimorfinių fragmentų amplifikaciją;
- DNR fragmentų dydžio skirtumus;
- DNR fragmentų atkuriamumą [48].

Pradmenys įvertinti vizualiai, toliau kriterijai aprašyti kodais ir konvertuoti į ženklus (2.8.lentelė).

2.8.lentelė. Pradmenų informatyvumo įvertinimo kriterijai ir jų požymiai

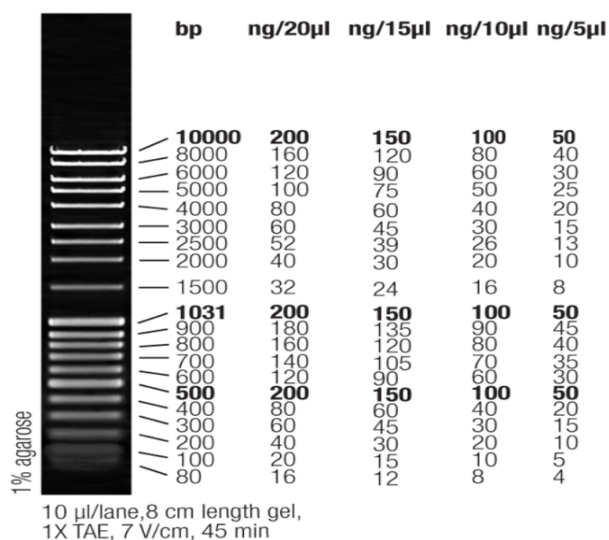
Kriterijus	Apibendrinimo požymis	Požymio apibūdinimas
Bendra DNR amplifikacijos kokybė	nėra amplifikacijos	+
	žemos kokybės amplifikacija	++
	geros kokybės amplifikacija	+++
Polimorfinių fragmentų amplifikacija	nėra polimorfinių DNR fragmentų	■
	keletas polimorfinių DNR fragmentų	■■
	aiškūs polimorfiniai DNR fragmentai	■■■
DNR fragmentų dydžio skirtumai	DNR fragmentų nėra arba visi skirtingo dydžio	*
	dauguma DNR fragmentų yra panašaus dydžio	**
	DNR fragmentai yra panašaus dydžio ir juos lengva atskirti	***
DNR fragmentų atkuriamumas	DNR fragmentai neturi atkuriamumo	●
	Dauguma DNR fragmentų yra atkuriami, bet vis dar neaiškūs	●●
	DNR fragmentai yra atkuriami ir lengvai sugrupuojami	●●●

2.6.8. AAPD analizė

AAPD analizei iš 53 patikrintų (2.5.lentelė) ir įvertintų pradmenų buvo pasirinkta 5 informatyviausi:

1. Roth B012
2. Roth B017
3. Roth 170 – 02
4. Roth 170 – 03
5. Roth 170 – 10

Polimerazės grandininės reakcijos rezultatai buvo analizuojami naudojant tik aiškias, patikimai pasikartojančias DNR juostas. Konkretaus dydžio (lokuso) DNR fragmento buvimas ar nebuvimas DNR pagausinimo spektre buvo įvertintas atitinkamai pažyminėjus 1 arba 0. Vienodo dydžio ir judrumo juostos buvo registruojamos kaip identiškios. Gelio vietos, kurias dėl daugybės juostų buvo sudėtinga tiksliai įvertinti, nebuvo įtrauktos į tolimesnę analizę. Pagausintų DNR fragmentų dydžiai bazių poromis (bp) buvo identifikuojami pagal DNR ilgio standartą MassRuler™ DNA Ladder Mix (2.8.pav).



2.8.pav. DNR ilgio standartas MassRuler™ DNA Ladder Mix

2.6.9. Tyrimo duomenų apdorojimas

Matematinė statistinė tyrimo analizė atlikta naudojant Microsoft Office Excel 2008 statistinį paketą. Apskaičiuota ir įvertinta rezultatų vidutinė vertė, standartiniai nuokrypiai. AAPD analizei buvo naudojama GenAlEx 6.5 ir Past 3 kompiuterinė programinė įranga.

3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

3.1. Hibridinės drebulės mikroūglių *in vitro* padauginimas ir augimo požymių vertinimas

Vieni iš svarbiausių rodiklių trumpos apyvartos želdiniams yra medžio augimo sparta bei kokybė [49]. Norint atrinkti perspektyviausius ir greičiausiai augančius hibridus būtina nustatyti kaip auga kiekvienas drebulės hibridas. Tuo tikslu *in vitro* sąlygomis buvo auginami ir vienodomis sąlygomis palyginti skirtingi drebulės genotipai.

Šiame tyrime auginant drebulės hibridus mėgintuvėliuose buvo išmatuotas mikroūglių aukštis bei vizualiai nustatyti adaptaciniai požymiai. Kad užtikrinti matavimų pastovumą ir tikslumą, aukštis matuotas nuo viršutinio pumpuro iki maitinimo terpės, o būklė įvertinta balais. Procentais išreikštų dydžių paklaidai S_p apskaičiuoti buvo panaudota formulė: $S_p = \pm \sqrt{(p(100 - p)/n)}$.

3.1.1. Pirminis hibridinės drebulės mikroūglių *in vitro* vertinimas

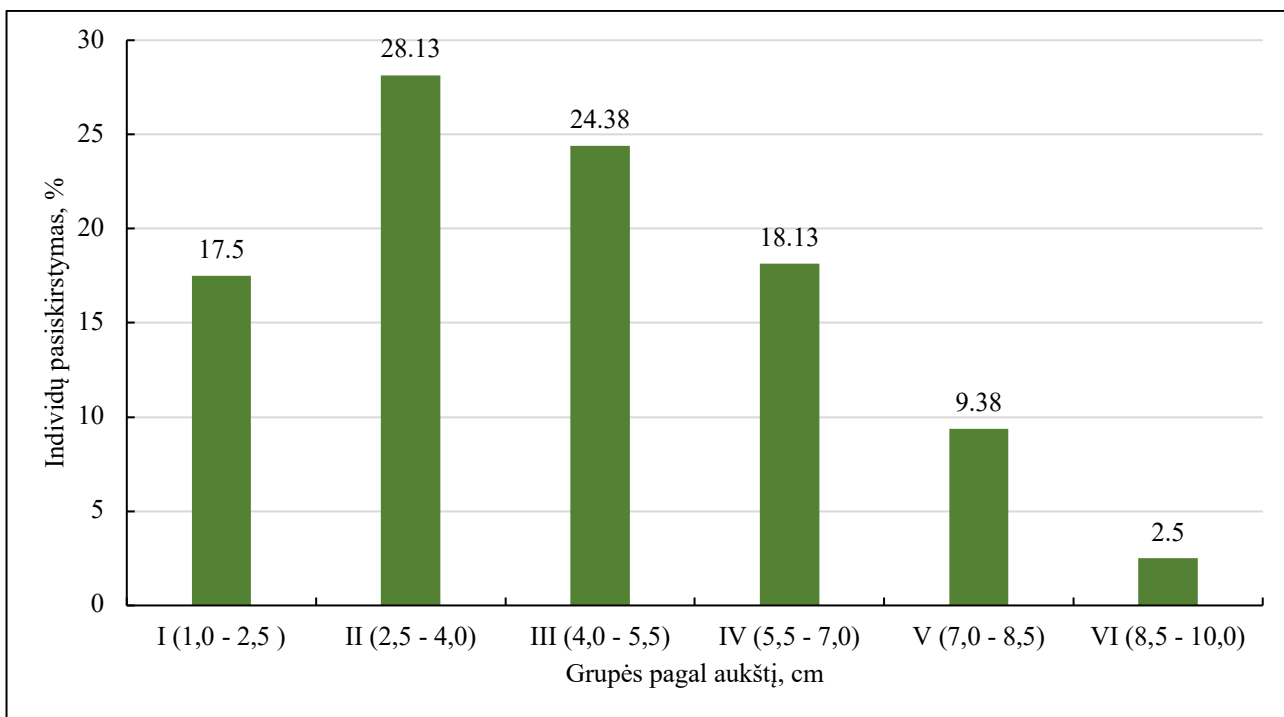
Norint atrinkti perspektyviausius drebulės hibridų genotipus tolimesniems tyrimams, tuo tikslu atliktas regeneravusių augalų *in vitro* pirminis vertinimas. Buvo vertinami 2 mėnesius mėgintuvėliuose auginti hibridinės drebulės mikroūgliai.

Atlikus aukščio matavimus, rezultatai parodė didelę įvairovę tarp tirtų augalų aukščio. Todėl buvo išskirtos šešios grupės pagal mikroūglių aukščius, apskaičiuoti jų vidurkiai bei individų procentinis pasiskirstymas grupėse (3.1. lentelė, 3.2., 3.3.pav.).

3.1. lentelė. Drebulės hibridų pasiskirstymas pagal aukščio grupes

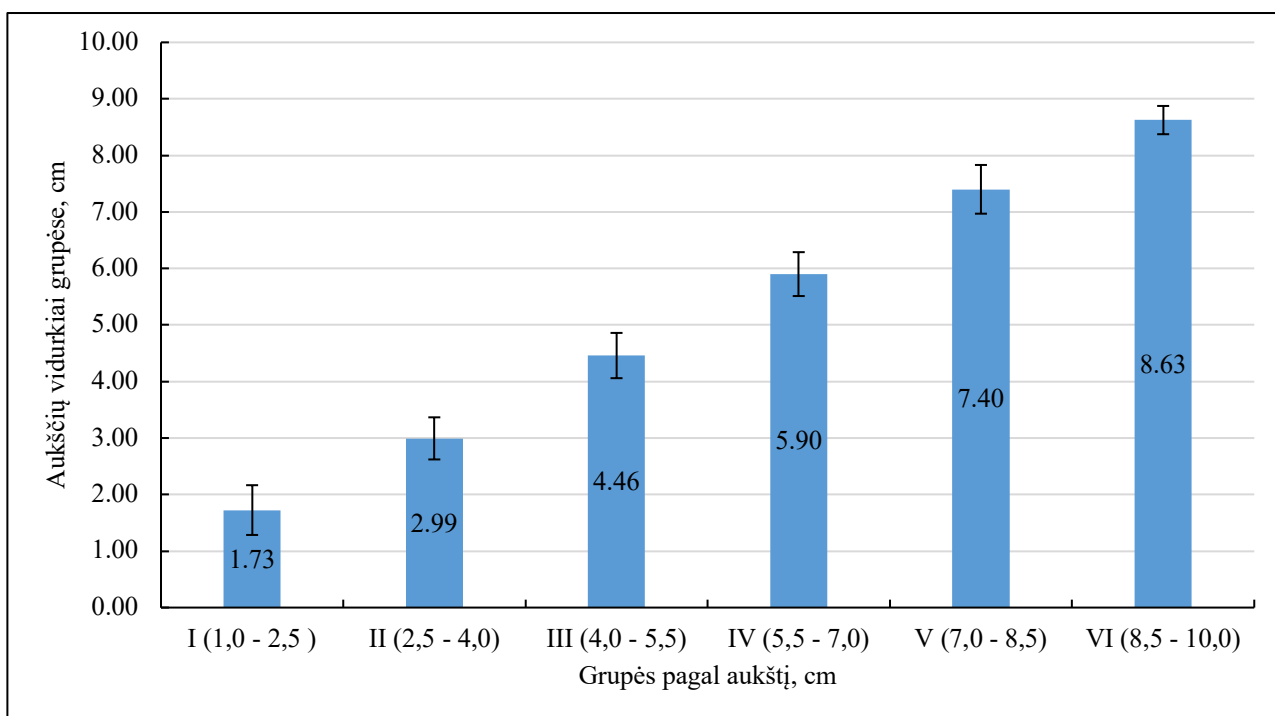
Hibridinės drebulės individų grupės pagal aukštį, cm	Įvertintų individų skaičius	Individų procentinis pasiskirstymas	Aukščių vidurkiai, cm
	Vnt.	Proc. $\pm S_p$	Vid. $\pm SN$
I (1,0 - 2,5)	28	17,5 \pm 7,18	1,73 \pm 0,44
II (2,5 - 4,0)	45	28,13 \pm 6,70	2,99 \pm 0,37
III (4,0 - 5,5)	39	24,38 \pm 6,88	4,46 \pm 0,40
IV (5,5 - 7,0)	29	18,13 \pm 7,15	5,90 \pm 0,39
V (7,0 - 8,5)	15	9,38 \pm 7,53	7,40 \pm 0,43
VI (8,5 - 10,0)	4	2,5 \pm 7,81	8,63 \pm 0,25
Įvertintų individų bendri rezultatai	160	100	4,21 \pm 1,91

Mažiausią dalį iš visų vertintų hibridų sudarė augalai, esantys šeštoje grupėje. Tik 4 individai pasiekė 8,5 – 10,0 cm aukštį, kuris sudarė tik 2,5 % visų tirtų augalų. Daugiausiai 45 tirtų hibridinės drebulės individų aukščiai pateko į antrąją grupę, kurios intervalas yra 2,5 – 4,0 cm, o tai sudarė 28,13 %. Iš pateiktų rezultatų matome, kad II ir III aukščių grupių procentinis pasiskirstymas skiriasi minimaliai, o bendrai į šias grupes pateko daugiau nei 50 % visų vertintų mikroūglių. Panaši tendencija matoma ir tarp I ir IV grupių, kurių procentiniai pasiskirstymai skiriasi tik 1 %. Tai rodo, kad hibridinės drebulės mikroūglių dažniausiai pasiekiamas aukštis po 2 mėnesių auginimo varijuoja intervale nuo 1,0 – 7,0 cm.



3.1.pav. Hibridinės drebulės individų procentinis pasiskirstymas pagal aukščių grupes

Bandyme taip pat buvo apskaičiuoti hibridinės drebulės grupių aukščių vidurkiai bei jų standartiniai nuokrypiai. VI grupėje mikroūglių aukščio vidurkis 8,63 cm, o standartinis nuokrypis nuo vidurkio $\pm 0,25$ cm. Tai buvo mažiausias gautas standartinis nuokrypis iš visų šešių grupių pagal aukštį. Didžiausias standartinis nuokrypis apskaičiuotas pirmoje grupėje, kurios aukščių vidurkis 1,75 cm, o standartinis nuokrypis $\pm 0,44$ cm. I, II, III, IV ir V grupių pagal aukštį standartiniai nuokrypiai varijuoja nuo $\pm 0,37$ iki $\pm 0,44$ cm, o tai rodo, kad visuose penkiuose paminėtuose grupėse hibridų mikroūgliai auga labai panašiai. VI grupėje standartinis nuokrypis išsiskiria iš kitų grupių, tačiau tam gali turėti įtakos į šią grupę patenkantis mažas hibridų skaičius.



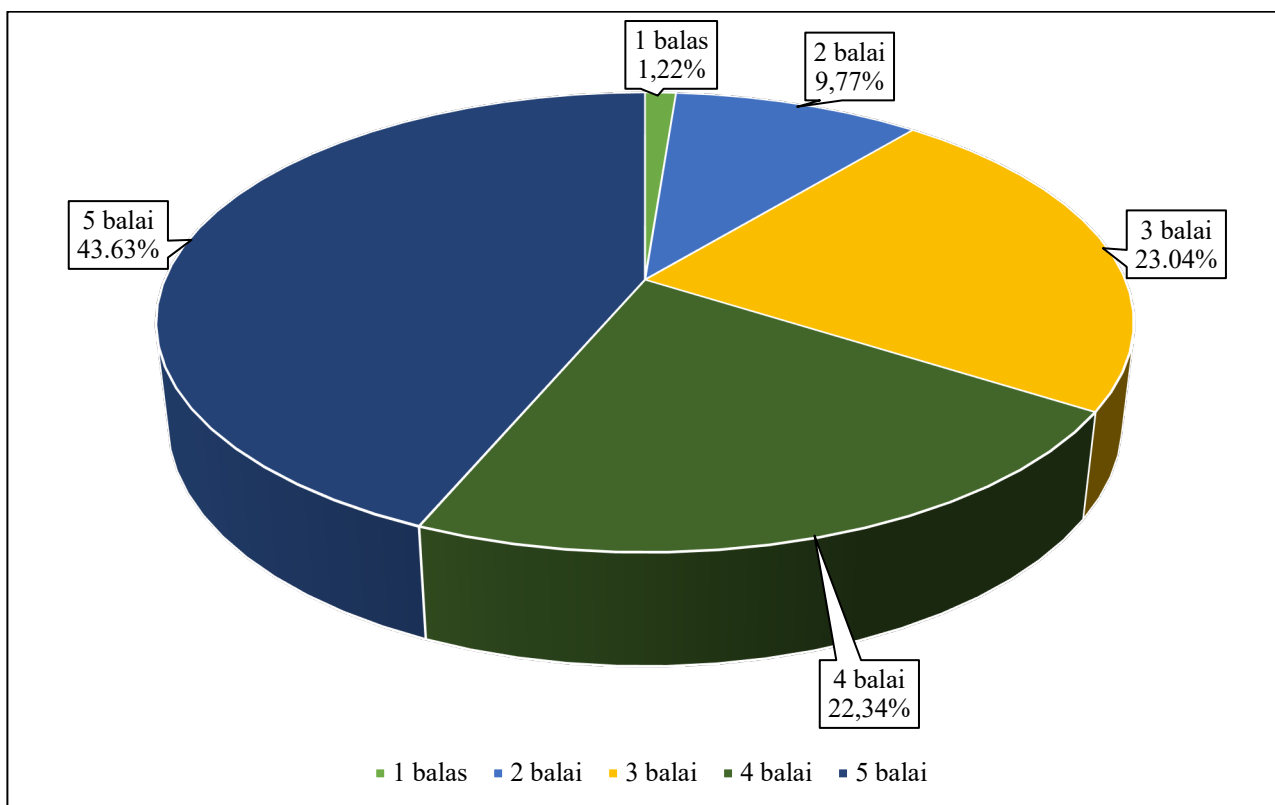
3.2. pav. Hibridinės drebulės individų grupių aukščių vidurkiai ir standartiniai nuokrypiai

Tyrimo metu buvo siekiama įvertinti ir atrinkti geriausiais fenotipiniais požymiais pasižyminčius hibridinės drebulės genotipus. Mikroūglių būklės įvertinimo balais ir hibridų procentinio pasiskirstymo rezultatai pateikti 3.2. lentelėje.

3.2. lentelė. Hibridinės drebulės individų būklės įvertinimas balais

Hibridinės drebulės individų būklė, balai	Įvertintų individų skaičius	Individų procentinis pasiskirstymas
	Vnt.	Proc.
1	7	1,22
2	28	9,77
3	44	23,04
4	32	22,34
5	50	43,63
Įvertintų individų bendras kiekis	160	100

Iš 160 ištirtų skirtingų hibridinės drebulės genotipų tik septinių iš jų būklė buvo įvertinta 1 balu, tai sudarė 1,22 %. Šių hibridų būklė buvo bloga, dažniausiai mikroūglis buvo jau visiškai nudžiuvęs. Daugiausiai 43,63 % sudarė hibridinės drebulės genotipai, kurie įvertinti 5 balais. Šių individų būklė buvo puiki, jie pasižymėjo gausiu lapuotumu, ūglis žaliavo. 3 ir 4 balais įvertintų hibridų procentinis pasiskirstymas buvo gautas beveik vienodas, atitinkamai 23,04 % ir 22,34 %. Rezultatai parodė, kad didžioji dalis tirtų genotipų pasižymėjo gera ar puikia būkle. Skritulinėje diagramoje galima vizualiai matyti mikroūglių procentinį pasiskirstymą pagal būklės balus (3.3.pav).



3.3.pav. Hibridinės drebulės individų būklės įvertinimas balais ir jų procentinis pasiskirstymas

3.1.2. Hibridinės drebulės augimo požymių *in vitro* vertinimas

Tyrimo metu po pirminio hibridinės drebulės vertinimo, mikroūgliai steriliomis sąlygomis buvo padalinti į vienodas trumpesnes dalis ir perkelti į naujus mėgintuvėlius su MS terpe. Vertinimas buvo atliekamas po 4 savaičių nuo perkėlimo dienos. Buvo išmatuotas eksplantų aukštis ir nustatyta būklė. Vertinimas vyko tokiu pačiu metodu kaip pirminis hibridinės drebulės vertinimas.

Dalis hibridų buvo netinkami naudoti tolimesniems matavimams dėl pasireiškusių grybelinės ar bakterinės infekcijos matavimo metu, nes tai galėjo įtakoti augimo spartą. Dalis šių augalų persodinta į maitinimo terpę su antibiotiku, kad būtų išsaugoti hibridinės drebulės genotipai. Tolimesniems vertinimams buvo naudoti 126 drebulės hibridai.

Hibridinės drebulės mikroūglių aukščio rezultatai po 4 savaičių auginimo *in vitro* pateikti 3.3. lentelėje.

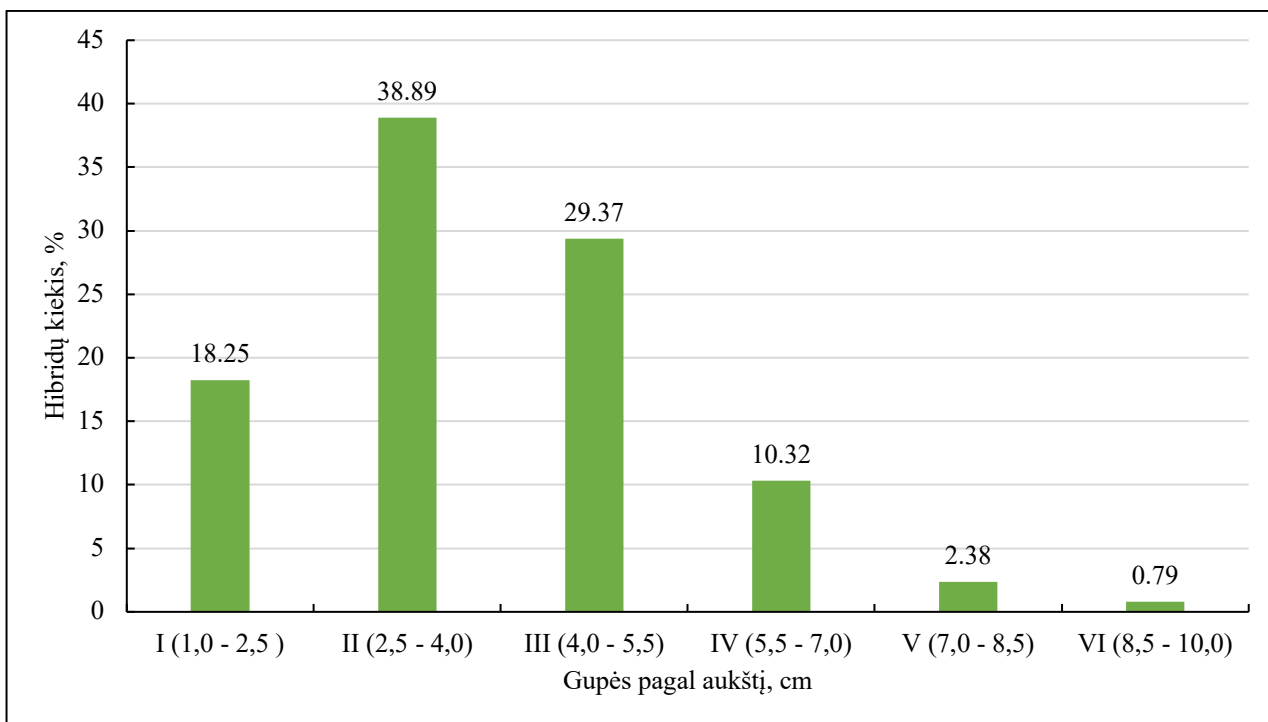
3.3.lentelė. Drebulės hibridų pasiskirstymas pagal aukščio grupes po 4 savaičių auginimo

Hibridinės drebulės individų grupės pagal aukštį, cm	Įvertintų individų skaičius	Individų procentinis pasiskirstymas	Aukščių vidurkiai, cm
	Vnt.	Proc. ± S _p	Vid. ± SN
I (1,0 - 2,5)	23	18,25 ± 8,05	1,65 ± 0,35
II (2,5 - 4,0)	49	38,89 ± 6,96	2,99 ± 0,39
III (4,0 - 5,5)	37	29,37 ± 7,49	4,52 ± 0,40
IV (5,5 - 7,0)	13	10,32 ± 8,44	5,85 ± 0,38
V (7,0 - 8,5)	3	2,38 ± 8,80	7,00 ± 0
VI (8,5 - 10,0)	1	0,79 ± 8,51	9,50 ± 0
Įvertintų individų bendri rezultatai	126	100	3,64 ± 1,52

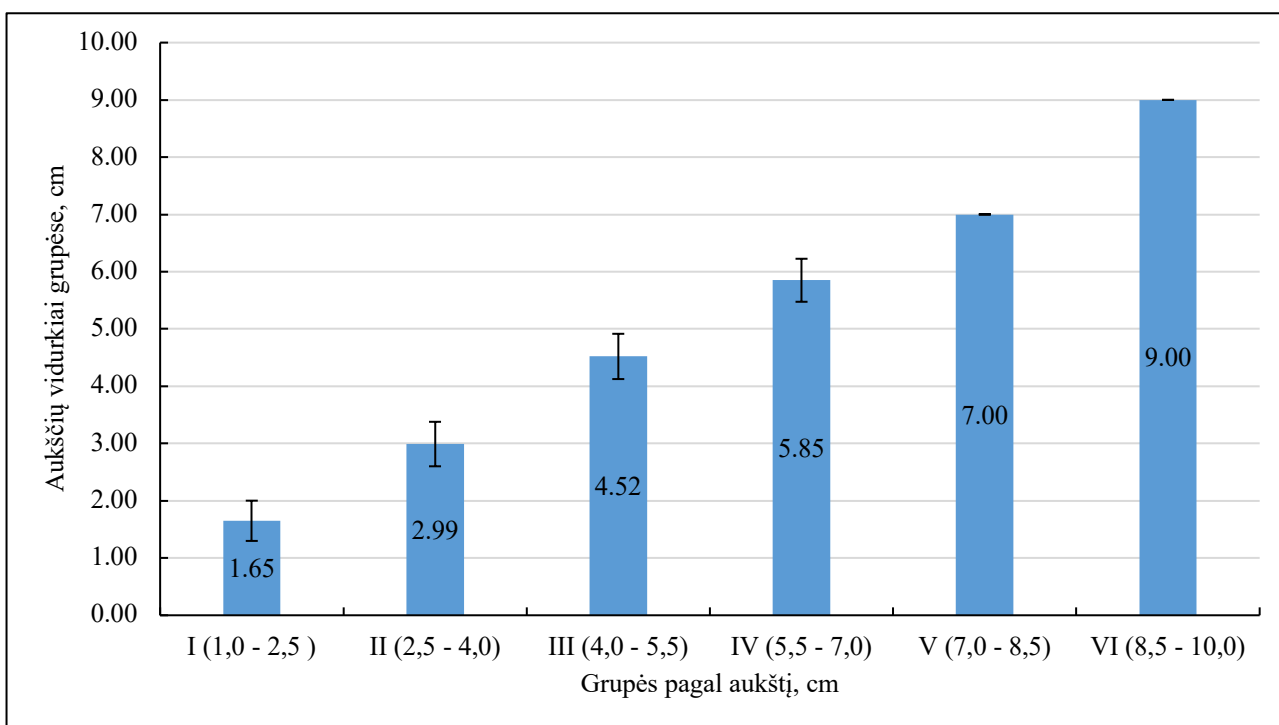
Didžiausią dalį 38,89 % iš 126 vertintų hibridų sudarė augalai, esantys II grupėje, kurios intervalas nuo 2,5 iki 4,0 cm. Taip pat daug mikroūglių grupėje nuo 4,0 iki 5,5 cm, kurie sudarė 29,37 %. Kiek mažiau pateko į I ir IV grupes, atitinkamai 18,25 % ir 10,32 %. Tik 3 hibridai pateko į V grupę, kurios aukščių intervalas 7,0 – 8,5 cm. Mažiausiai 0,79 % sudarė 1 mikroūglis IV grupėje, kurios intervalas 8,5 – 10,0 cm. Hibridinės drebulės mikroūglių po 4 savaičių auginimo *in vitro* sąlygomis optimalus pasiektas aukštis varijuoja intervale nuo 2,5 – 5,5 cm (3.4. pav.)

Apskaičiuoti aukščių vidurkiai grupėse parodė, kad arčiausiai bendro visų įvertintų hibridų vidurkio 3,64 ± 1,52 cm buvo mikroūgliai, esantys II ir III grupėse, kurių vidurkiai atitinkamai buvo gauti 2,99 ± 0,39 cm ir 4,52 ± 0,40 cm (3.5. pav.). Mikroūglių vidurkis grupėje nuo 1,0 iki 2,5 cm – 1,65 ± 0,35 cm. IV grupėje, kurios aukščių intervalas 5,5 – 7,0 cm, vidurkis gautas 5,85 ± 0,38. Ir nedidelę dalį sudarė labiausiai nutolę nuo vidurkio mikroūgliai V grupėje, kurių vidurkis buvo 7,0 cm ir vos 1 hibridas VI grupėje, kurio aukštis buvo net 9,5 cm. I, II, III ir IV grupių pagal aukštį standartiniai nuokrypiai yra labai panašūs ir varijuoja nuo ± 0,35 iki ± 0,40 cm.

Taigi apibendrinus pirminio hibridinės drebulės mikroūglių aukščio vertinimo (3.1.lentelė) ir po 4 savaičių auginimo *in vitro* (3.3.lentelė) rezultatus matoma, nors ir labai didelė aukščių įvairovė abiejų vertinimų metu, tačiau didžiausią dalį sudaro mikroūgliai, esantys II grupėje, kurios intervalas nuo 2,5 iki 4,0 cm.



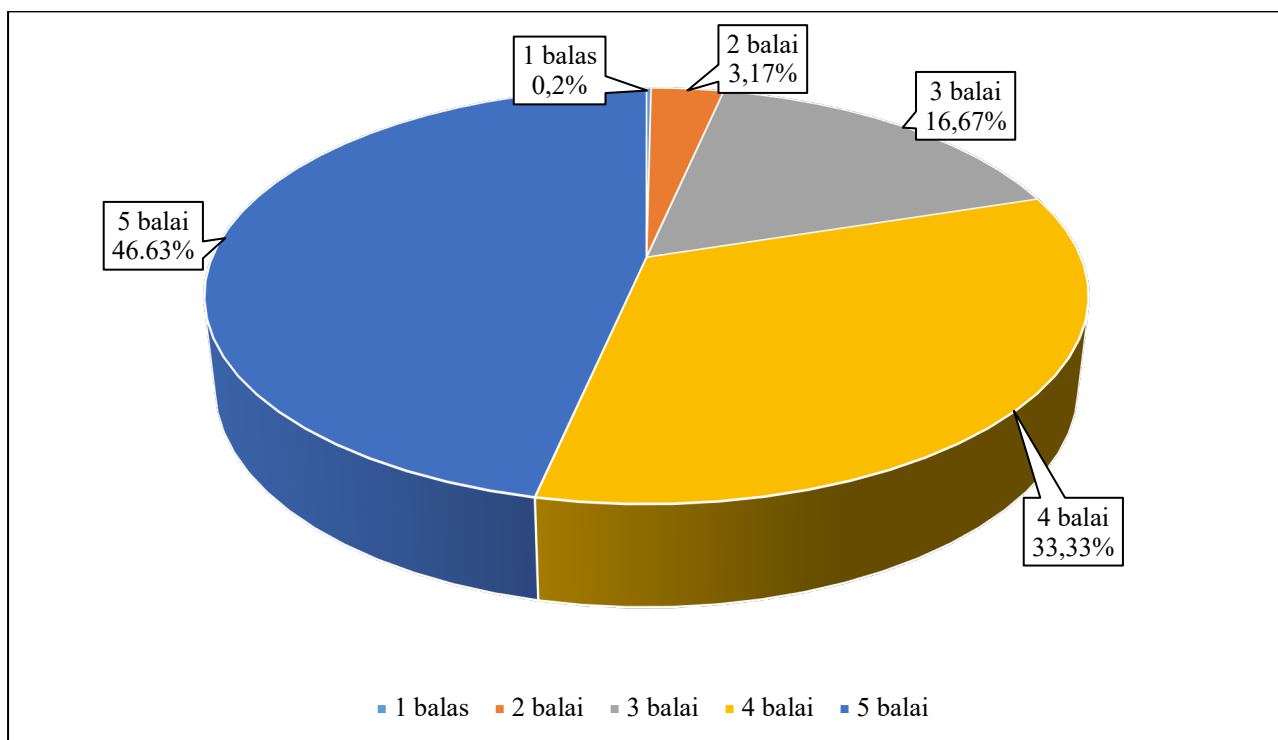
3.4. pav. Hibridinės drebulės individų procentinis pasiskirstymas pagal aukščių grupes po 4 savaičių auginimo *in vitro* sąlygomis



3.5. pav. Hibridinės drebulės individų grupių aukščių vidurkiai ir jų standartiniai nuokrypiai po 4 savaičių mikroūglių auginimo *in vitro* sąlygomis

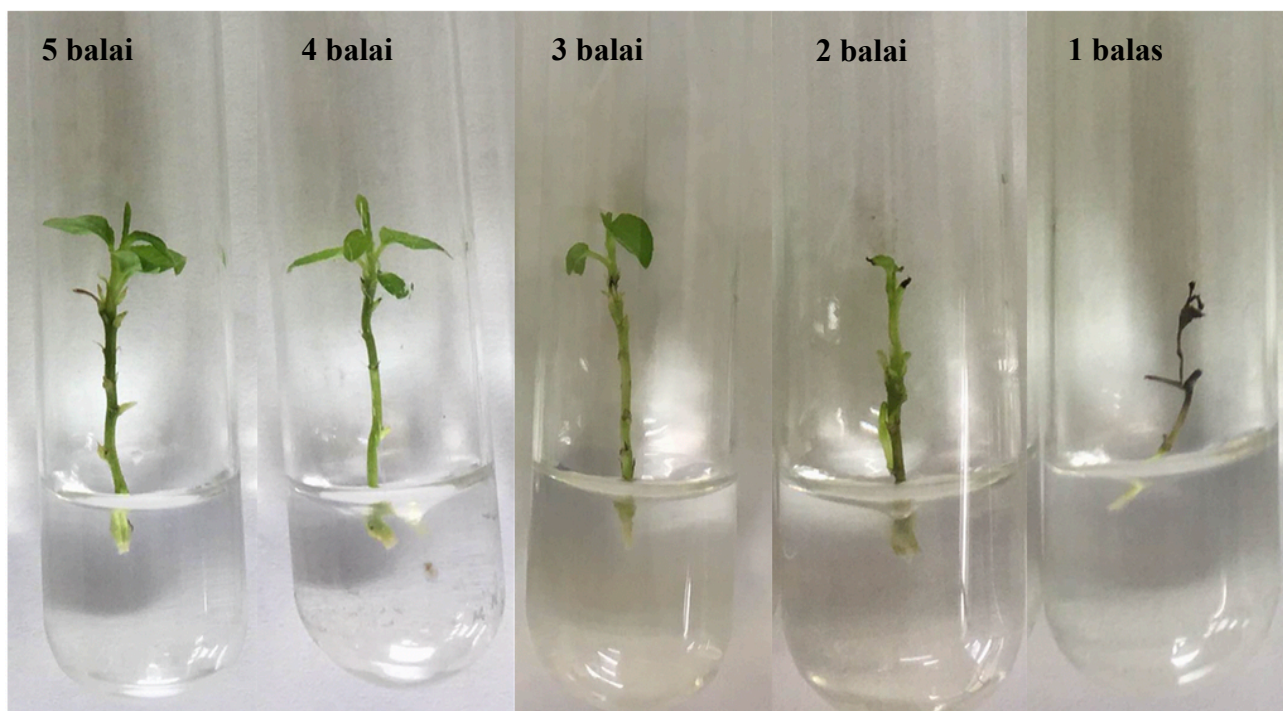
Po 4 savaičių auginimo *in vitro* sąlygomis hibridinės drebulės mikroūglių būklė buvo įvairi (3.6.pav.). Pastebėjus didelę fenotipinių požymių įvairovę, būklė taip pat buvo įvertinta balais. Didžiausią dalį 46,63 % sudarė hibridai, kurių būklė įvertinta 5 balais. Mikroūgliai, kurie buvo įvertinti 3 ir 4 balais, gautas procentinis pasiskirstymas atitinkamai 16,67 % ir 33,33 %, sudarė pusę visų tirtų drebulės

hibridų. Prastai augantys ir visiškai nudžiuvę augalai, kurie įvertinti atitinkamai 2 ir 1 balais, bendrai sudarė tik 3,37 %.



3.6. pav. Hibridinės drebulės individų po 4 savaičių auginimo *in vitro* būklės įvertinimas balais ir jų procentinis pasiskirstymas

Drebulės hibridų po 4 savaičių auginimo *in vitro* sąlygomis skirtingų būklių pavyzdžiai pateikti 3.7 paveiksle.



3.7.pav. Hibridinės drebulės mikroūglių būklės pavyzdžiai: 5 balai – būklė puiki, gausus lapuotumas, ūglis žaliuoja, 4 balai – būklė gera, vidutinis lapuotumas, ūglis žaliuoja, 3 balai – būklė vidutinė, negausus lapuotumas, ūglis žaliuoja, 2 balai – būklė prasta, nėra naujų lapų, ūglis padžiuvęs, 1 balas – būklė bloga, ūglis nudžiuvęs

3.1.3. Perspektyviausių hibridinės drebulės palikuonių atrinkimas

Įvertinus visus hibridinės drebulės palikuonių genotipus pagal augimo ir fenotipinius požymius, buvo atrinkti 58 hibridai tolimesniems molekuliniais tyrimams (3.4.lentelė).

3.4. lentelė. Perspektyviausių hibridinės drebulės genotipų augimo ir fenotipiniai požymiai

Hibrido Nr.	Genotipo pavadinimas	Aukštis, cm	Infekcijos atsiradimas	Šaknų susidarymas, balais	Būklė, balais	Ūgliai, vnt	Eksplantai, vnt
1.	C25-7	3,1	-	5	5	2	2
2.	H617 - 7	6,5	-	4	5	1	1
3.	A6 - 3	3	-	1	4	3	3
4.	C2 -1	8	-	5	5	1	1
5.	H617 - 4	5,5	-	5	5	1	1
6.	A6 - 2	5,3	-	1	5	1	1
7.	H617 - 45	4	-	1	5	1	1
9.	H617 - 41	6	-	1	5	1	2
10.	H617 - 5	7	-	3	4	2	1
11.	A7 - 6	4	-	3	5	2	2
13.	A9 - 1	4,5	-	4	4	1	1
14.	H617 - 9	6,3	-	3	4	1	1
16.	H617 - 40	4,5	-	2	4	1	1
17.	D13 - 2	6	-	2	5	2	1
18.	A10 - 3	7	-	1	5	1	2
19.	C21 - 3	4	-	4	4	1	1
20.	A6 - 6	5,4	-	3	4	2	1
21.	C30 - 6	6	-	3	4	2	2
22.	C10 - 1	5	-	4	5	1	1
23.	D17 - 5	5,3	-	2	4	1	1
24.	C25 - 5	4,5	-	5	5	1	1
25.	D14 - 1	6,4	-	4	4	2	2
26.	B8 - 1	5	-	3	5	1	1
27.	A13 - 1	4,5	-	2	4	1	1
28.	C25 - 6	7	-	3	4	1	1
29.	D18 - 2	6,3	-	4	4	1	2
30.	C16 - 4	4,5	-	5	5	1	1
31.	A3 - 5	4,3	-	3	5	1	1
32.	C8 - 1	5	-	3	4	1	1
33.	C5 - 4	5,1	-	1	4	2	1
34.	C1 - 1	3,2	-	4	4	1	1
35.	A8 - 2	4,5	-	2	5	2	1
36.	D5 - 3	5,3	-	1	4	1	2
37.	D5 - 4	3,4	-	2	3	1	1
38.	H617 - 34	4,6	-	4	4	1	1
39.	H617 - 12	4,7	-	3	5	1	1
40.	D12 - 4	5	-	2	3	1	1
41.	C8 - 1	6,4	-	4	5	1	1
42.	H617 - 37	4,3	-	3	5	3	3
43.	C35 - 1	5	-	2	5	1	2
44.	D18 - 5	5,3	-	4	4	1	2
45.	H617 - 55	6,1	-	5	4	1	1
46.	C13 - 1	3,7	-	1	4	1	1
47.	D14 - 1	4,7	-	1	4	1	1
48.	D18 - 5	5,6	-	3	5	2	1
49.	C15 - 1	4,8	-	2	4	1	1
50.	D7 - 3	5	-	2	5	2	1
52.	C7 - 1	4,3	-	4	4	2	2
53.	A9 - 4	3,8	-	3	5	1	2
54.	C33 - 1	3,5	-	4	4	1	1

55.	H617 – 13	8	-	3	3	1	1
56.	D14 – 3	6,7	-	3	4	2	1
57.	B9-1	5,7	-	3	5	1	1
58.	C24 – 4	4	-	4	5	1	2
59.	A11 – 1	4,6	-	4	5	1	2
60.	H617 – 28	5,7	-	5	4	1	1
61.	C23 – 4	5,2	-	3	4	1	1
62.	H617 - 51	4,4	-	2	4	1	1

3.2. Informatyviausių oligonukleotidinių žymenų nustatymas

Norint nustatyti, kad buvo gauti skirtingi drebulės hibridai, būtina atlikti DNR įvairovės nustatymo tyrimus. Tyrime DNR įvairovė buvo tirta APPD metodu. Tuo tikslu buvo atlikta informatyviausių oligonukleotidų žymenų identifikavimas ir atrinkti geriausiai amplifikuojantys žymenys.

3.2.1. Hibridinės drebulės DNR koncentracijos nustatymas

Tyrimo metu CTAB metodu buvo išskirta DNR iš atrinktų perspektyviausių hibridinės drebulės genotipų lapų mėginių. Koncentracija buvo nustatyta spektrofotometriškai, taip pat kartu buvo išmatuotas DNR grynumas (3.5.lentelė).

3.5.lentelė. Hibridinės drebulės DNR koncentracijos ir grynumo nustatymas

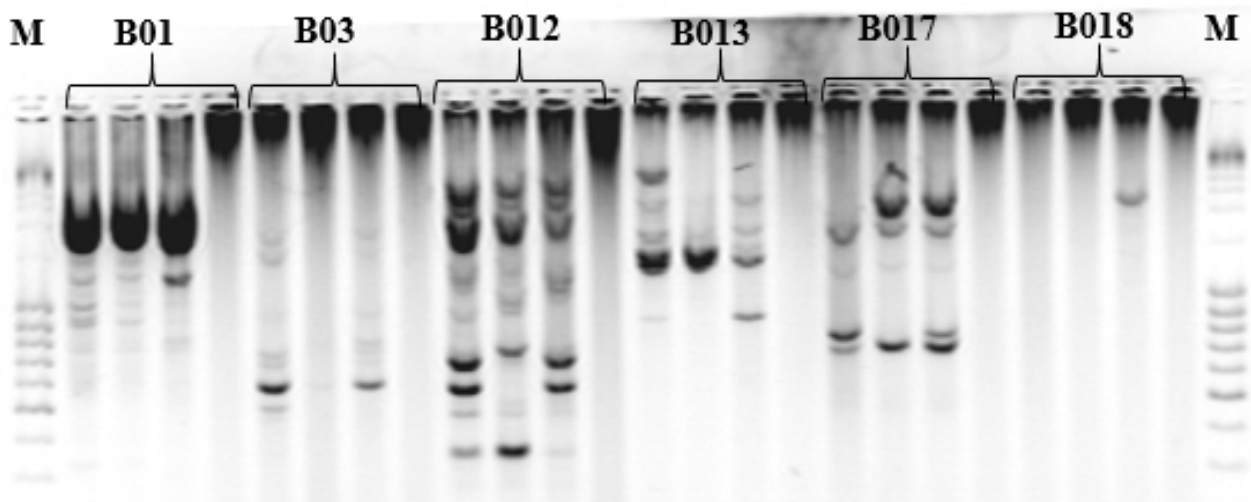
DNR mėginiai	Koncentracija, $\mu\text{g/ml}$	Grynumas, 260/280 nm	DNR mėginiai	Koncentracija, $\mu\text{g/ml}$	Grynumas, 260/280 nm
Nr.1	141,1	1,83	Nr.33	68	1,69
Nr.2	89,7	1,90	Nr.34	35,7	1,76
Nr.3	299,6	1,80	Nr.35	81,8	1,76
Nr.4	134,2	1,71	Nr.36	-	-
Nr.5	157,3	1,65	Nr.37	13,4	1,80
Nr.6	87,6	1,65	Nr.38	8,93	1,64
Nr.7	145,4	1,70	Nr.39	8,43	1,70
Nr.9	92,6	1,75	Nr.40	80,9	1,83
Nr.10	76,6	1,77	Nr.41	17,9	1,76
Nr.11	96,7	1,67	Nr.42	36,2	1,76
Nr.13	9,43	1,27	Nr.43	12,4	1,79
Nr.14	179	1,72	Nr.44	63	1,76
Nr.16	581	1,77	Nr.45	66,5	1,85
Nr.17	426	1,82	Nr.46	17,4	1,71
Nr.18	93,8	1,75	Nr.47	17,9	1,68
Nr.19	49,6	1,74	Nr.48	-	-
Nr.20	243	1,84	Nr.49	17,4	1,75
Nr.21	37,7	1,70	Nr.50	16,4	1,74
Nr.22	42,2	1,73	Nr.52	65,5	1,89
Nr.23	41,2	1,83	Nr.53	34,7	1,75
Nr.24	30,3	1,77	Nr.54	9,43	1,73
Nr.25	162	1,85	Nr.55	11,4	1,77
Nr.26	31,2	1,65	Nr.56	9,92	1,67
Nr.27	7,44	1,60	Nr.57	385	1,94
Nr.28	104	1,80	Nr.58	15,9	1,60
Nr.29	62	1,69	Nr.59	-	-
Nr.30	92,3	1,77	Nr.60	5,95	1,44
Nr.31	13,4	1,80	Nr.61	22,3	1,73
Nr.32	102	1,80	Nr.62	41,2	1,71

Gauta DNR koncentracija svyravo nuo 5,95 iki 581 $\mu\text{g/ml}$. Tokį didelį koncentracijų skirtumą galėjo įtakoti paimtų DNR išskyrimui lapų mėginių kiekis. Mėginių Nr.36, Nr.48 ir Nr.59 koncentracija

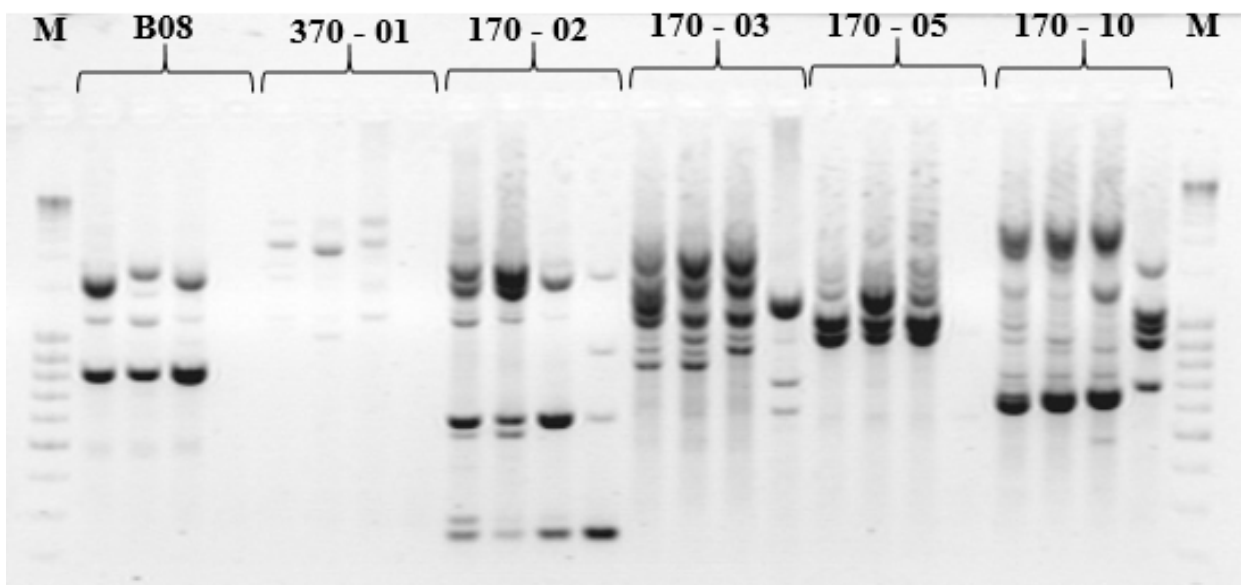
nebuvo išmatuota. Hibridų DNR koncentracija ir grynumas buvo tinkami PGR atlikti. 1,8 – 2 sugertis 260/280 nm reiškia, kad DNR mėginys neturi priemaišų.

3.2.2. Elektroforegramų analizė

Atsitiktinių parinktų drebulės hibridų genotipų DNR pagausinimo produktai buvo atskirti agarozės gelyje, išryškinti UV šviesoje ir nufotografuoti (3.8., 3.9.pav.).



3.8 pav. Drebulės hibridų DNR pagausinimo spektrai gauti su pradmenimis B01, B03, B012, B017, B018. M raide pažymėtas DNR ilgio standartas



3.8 pav. Drebulės hibridų DNR pagausinimo spektrai gauti su pradmenimis B08, 370 - 01, 170 - 02, 170 - 03, 170 - 05, 170 - 10. M raide pažymėtas DNR ilgio standartas

Iš pateiktų elektroforezės rezultatų nuotraukų matoma, kad su skirtingais pradmenimis amplifikacijos kokybė buvo gauta taip pat skirtinga. Labiausiai išsiskiriantys ir daugiausiai informacijos suteikiantys buvo Roth B012 ir Roth 170 – 02 pradmenys. Taip pat aukšta DNR amplifikacijos kokybė buvo gauta su Roth B017, Roth 170 – 03 ir Roth 170 – 10 pradmenimis. Naudojant šiuos 5 pradmenis DNR fragmentai gauti panašaus dydžio ir juos lengva atskirti, fragmentai atkuriami ir lengvai sugrupuojami, taip pat matomi aiškūs polimorfiniai DNR fragmentai. Visų iširtų oligonukleotidinių pradmenų vertinimai pagal kriterijus pateikti 3.6. lentelėje.

3.6.lentelė. Oligonukleotidinių pradmenų įvertinimas pagal kriterijus

Pradmuo	Pradmenų sekos 5'-3'	Polimorfinių fragmentų amplifikacija	DNR fragmentų dydžio skirtumai	DNR fragmentų atkuriamumas	Bendra DNR amplifikacijos kokybė
Roth A01	CAGGCCCTTC	■	*	●	+
Roth A02	TGCCGAGCTG	■■	*	●	++
Roth A03	AGTCAGCCAC	■■	*	●	++
Roth A04	AATCGGGCTG	■	*	●	+
Roth A05	AGGGGTCTTG	■	*	●	+
Roth A06	GGTCCCTGAC	■	*	●	+
Roth A07	GAAACGGGTG	■■	**	●●●	++
Roth A08	GTGACGTAGG	■	**	●●●	++
Roth A010	GTGATCGCAG	■	*	●	++
Roth A011	CAATCGCCGT	■	*	●	++
Roth A012	TCGGCGATAG	■	*	●	+
Roth A013	CAGCACCCAC	■	*	●	+
Roth A014	TCTGTGCTGG	■	*	●	+
Roth A015	TTCCGAACCC	■	*	●	+
Roth A016	AGCCAGCGAA	■	*	●	+
Roth A017	GACCGCTTGT	■	*	●	+
Roth A018	AGGTGACCGT	■	*	●	+
Roth A019	CAAACGTCGG	■	*	●	+
Roth A020	GTTGCGATCC	■	*	●	+
Roth B01	GTTTCGCTCC	■■	**	●●	++
Roth B02	TGATCCCTGG	■	*	●	+
Roth B03	CATCCCCCTG	■■	**	●●	++
Roth B04	GGACTGGAGT	■■	**	●●	++
Roth B05	TGCGCCCTTC	■	*	●	+
Roth B06	TGCTCTGCC	■	*	●	+
Roth B07	GGTGACGCAG	■■	**	●●	++
Roth B08	GTCCACACGG	■	**	●●●	+++
Roth B09	TGGGGGACTC	■	*	●	+
Roth B010	CTGCTGGGAC	■	*	●	+
Roth B011	GTAGACCCGT	■■	**	●●	++
Roth B012	CCTTGACGCA	■■■	***	●●●	+++
Roth B013	TTCCCCGCT	■■	**	●●	+++
Roth B014	TCCGCTCTGG	■	*	●	+
Roth B015	GGAGGGTGTT	■■	**	●●	++
Roth B016	TTTGCCCGGA	■	*	●	+
Roth B017	AGGGAACGAG	■■	**	●●●	+++
Roth B018	CCACAGCAGT	■	*	●	+
Roth B019	ACCCCCGAAG	■	*	●	+
Roth B020	GGACCCTTAC	■	*	●	+
Roth 170-01	CATCCCGAAC	■■	**	●●	++
Roth 170-02	CAGGGTCGAA	■■■	***	●●●	+++
Roth 170-03	ACGGTGCCTG	■■	***	●●	+++
Roth 170-04	CGCATTCCGC	■■	**	●●	++
Roth 170-05	GAGATCCGCG	■■	**	●●	++
Roth 170-06	GGACTCCACG	■	*	●	+
Roth 170-07	ATCTCCCGGG	■	*	●	+
Roth 170-08	CTGTACCCCC	■	*	●	+
Roth 170-09	TGCAGCACCG	■■	**	●●	++
Roth 170-10	CAGACACGGC	■■■	***	●●●	+++
Roth 370-01	TCCCTGTGCC	■■	**	●	++
Roth 370-04	GTATGCCGCG	■	*	●	+
Roth 370-10	CTGTCCGGTC	■	*	●	+

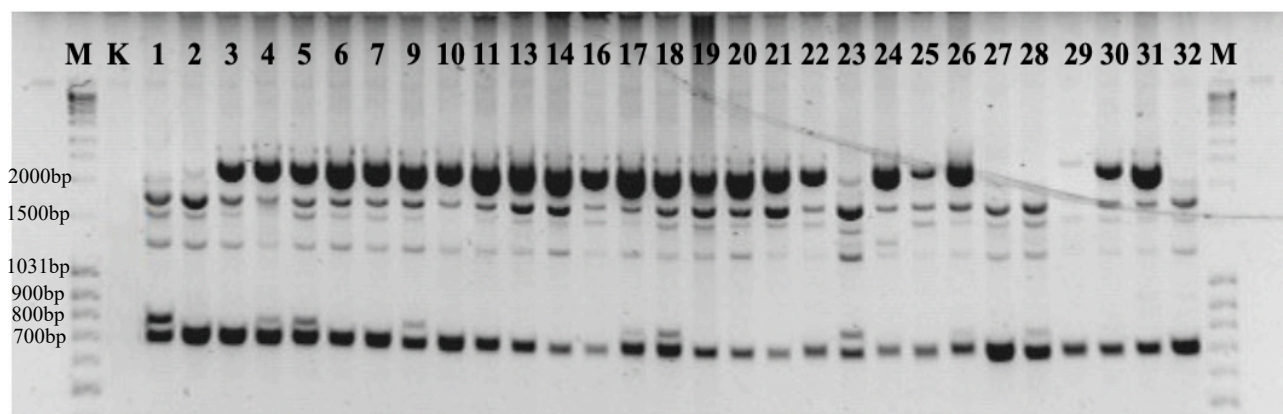
3.3. Hibridinės drebulės palikuonių DNR polimorfizmo nustatymas

Hibridinės drebulės palikuonių genetinė įvairovė buvo nustatyta APPD (atsitiktinai pagausintos polimorfinės DNR) metodu. Tyrimai atlikti naudojant Roth B012, Roth 170 – 02, Roth B017, Roth 170 – 03 ir Roth 170 – 10 pradmenis.

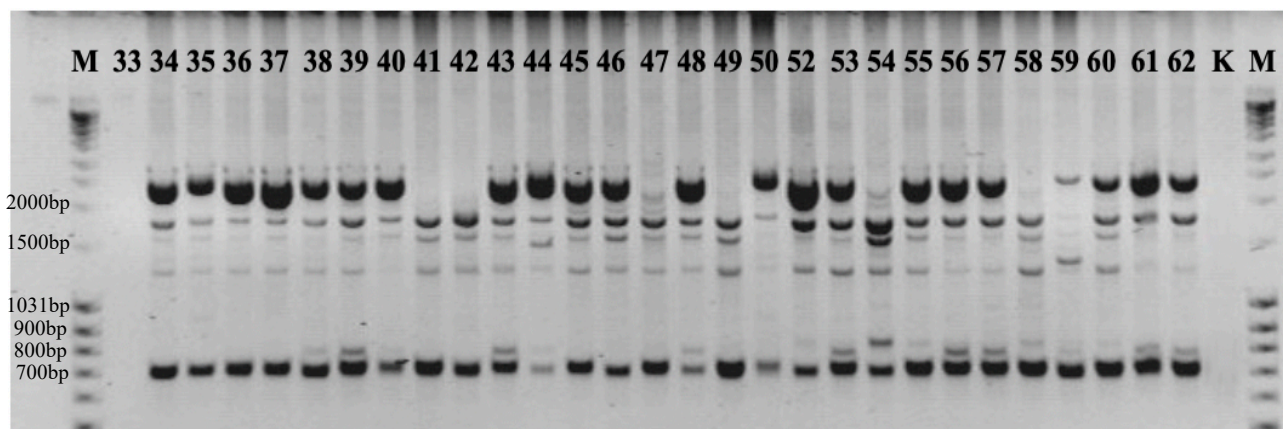
3.3.1. DNR genetinės įvairovės nustatymas, panaudojant informatyviausius pradmenis

Tyrimo metu hibridinės drebulės APPD rezultatai buvo nustatyti atlikus elektroforezę, kurios metu DNR fragmentai išsidėstė agarozės gelyje pagal jų ilgį. Tirti visi 58 hibridai, įskaitant Nr.36, Nr.48, Nr.59, nors jų DNR koncentracija nebuvo išmatuota, tačiau PGR atlikti pakanka labai mažos koncentracijos. Mėginys Nr.33 neparodė jokių rezultatų, įtakos tam galėjo turėti nekokybiška DNR.

Atlikus skirtingų drebulės hibridų DNR pagausinimą su Roth B017 pradmeniu, gauti elektroforezės rezultatai parodė, kad hibridai buvo nevienodi (3.9., 3.10.pav). Pagausintų fragmentų dydžiai svyravo nuo 700 – 2500 bp (bazių poros). Visi genotipai turėjo 700, 1250 ir 1800 bp ilgio DNR fragmentus.

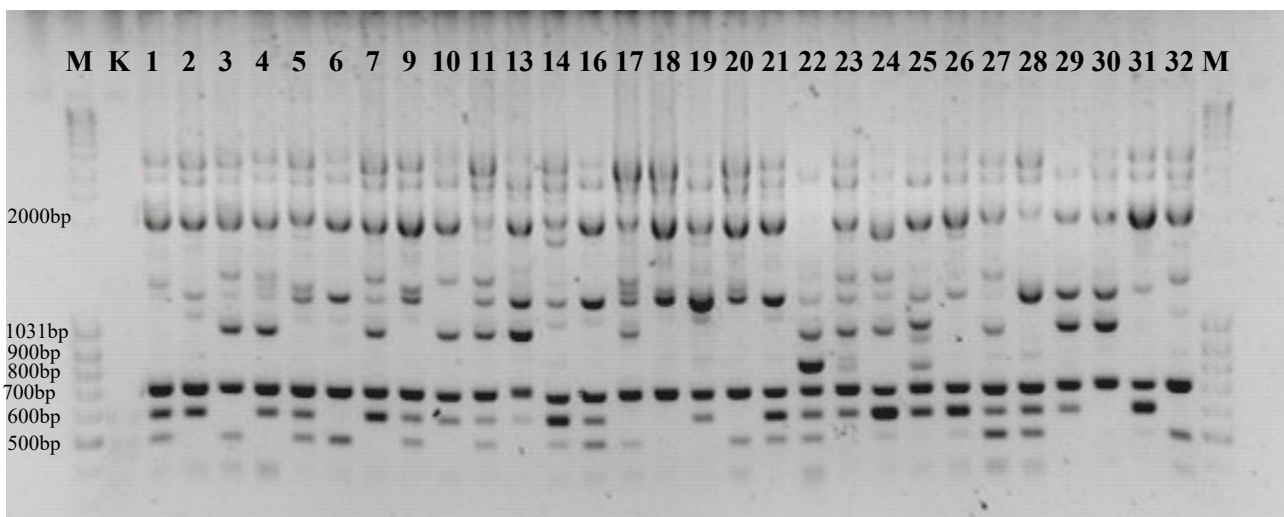


3.9.pav Hibridinių drebulių DNR pagausinimo spektrai gauti su Roth B017 pradmeniu. Skaitmenimis 1 – 32 pažymėti hibridai, M – DNR ilgio standartas, K – kontrolė

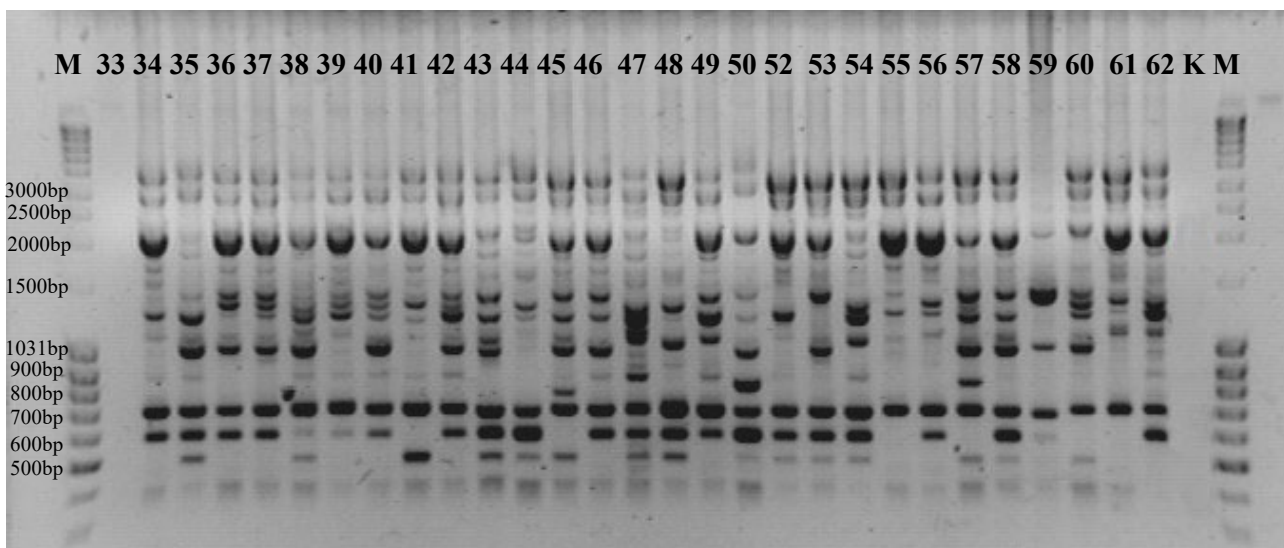


3.10.pav. Hibridinių drebulių DNR pagausinimo spektrai gauti su Roth B017 pradmeniu. Skaitmenimis 33 – 62 pažymėti hibridai, M – DNR ilgio standartas, K – kontrolė

Atlikus drebulės hibridų DNR tyrimą su Roth B012 pradmeniu, gauti rezultatai parodė didelį pradmens informatyvumą bei aukštos kokybės amplifikaciją (3.11., 3.12.pav). Pagausintų fragmentų dydžių intervalas buvo labai platus, svyravo nuo 400 – 4000 bp. Visi genotipai turėjo 700 bp ilgio DNR fragmentus. Visi kiti hibridų DNR fragmentai gauti skirtingų dydžių.



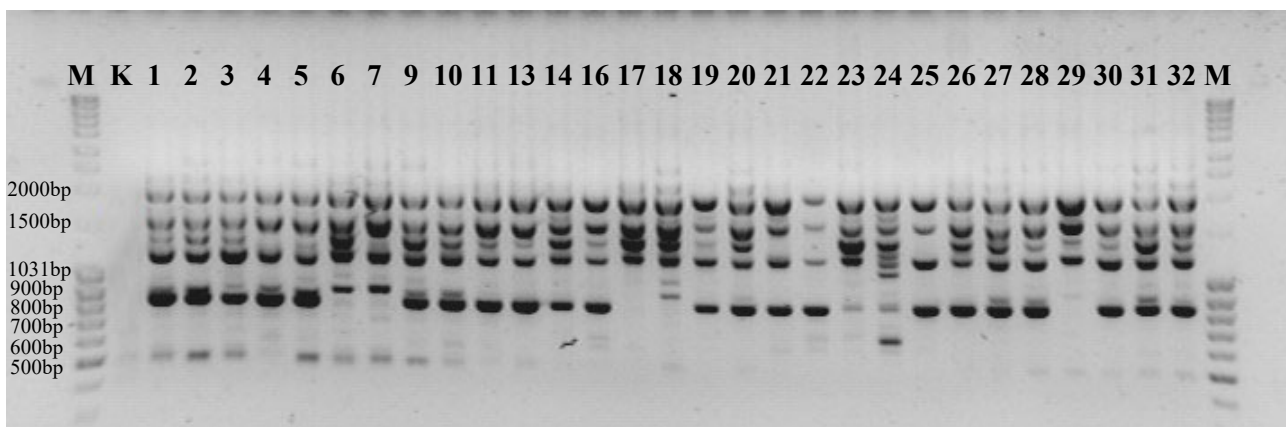
3.11.pav Hibridinių drebulių DNR pagausinimo spektrai gauti su Roth B012 pradmeniu. Skaitmenimis 1 – 32 pažymėti hibridai, M – DNR ilgio standartas, K – kontrolė



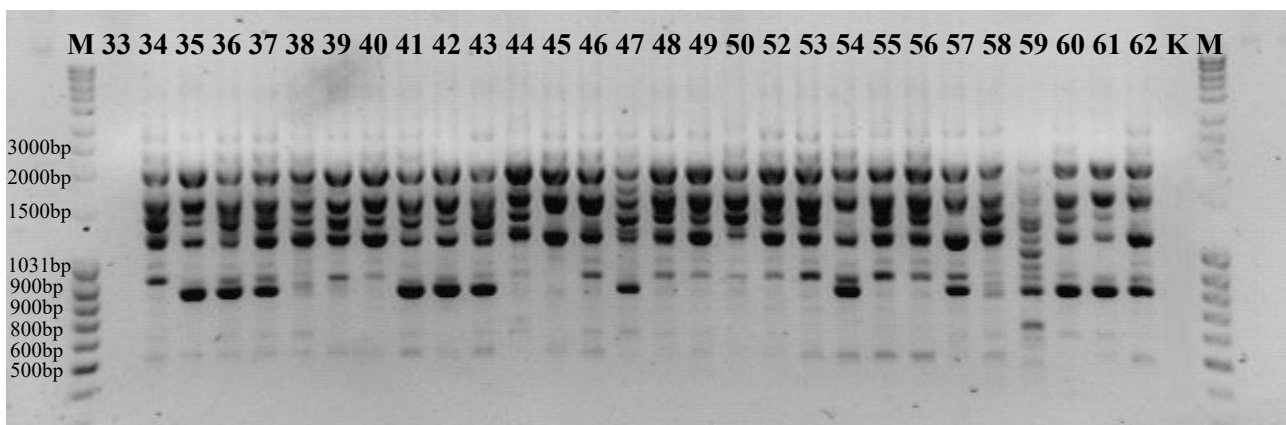
3.12.pav Hibridinių drebulių DNR pagausinimo spektrai gauti su Roth B012 pradmeniu. Skaitmenimis 33 – 62 pažymėti hibridai, M – DNR ilgio standartas, K – kontrolė

Pagauginus skirtingų drebulės hibridų DNR su Roth 170 – 03 pradmeniu ir atlikus elektroforezę, gauti rezultatai parodė gana aukštos kokybės amplifikaciją (3.13.pav.), tačiau DNR fragmentai, esantys tarp 1031 ir 2000 bp ilgio nebuvo pilnai atskirti (3.14.pav.), todėl buvo sudėtingiau juos suskirstyti pagal dydžius. Pagauginių DNR fragmentų dydžiai svyravo nuo 500 iki 2000 bp. Visi hibridai turėjo 1200, 1500 ir 2000 bp DNR fragmentus.

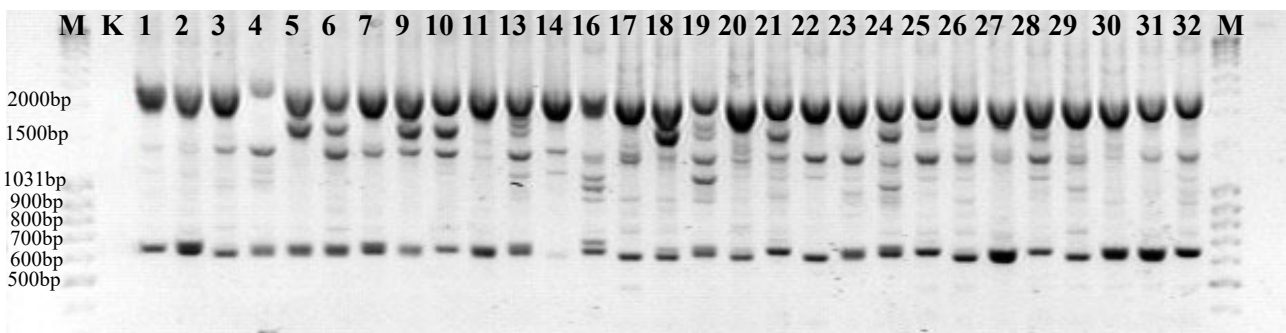
Naudojant pradmenį Roth 170 – 10 gauta geros kokybės amplifikacija, tačiau buvo DNR fragmentų, kurie gauti nelabai aiškūs ar ryškūs, todėl buvo sunkiau juos atskirti pagal dydį vienas nuo kito (3.15., 3.16. pav.). Pagauginių DNR fragmentų dydžiai svyravo 600 – 2000 bp. Visi hibridai turėjo 600 bp ilgio DNR fragmentus.



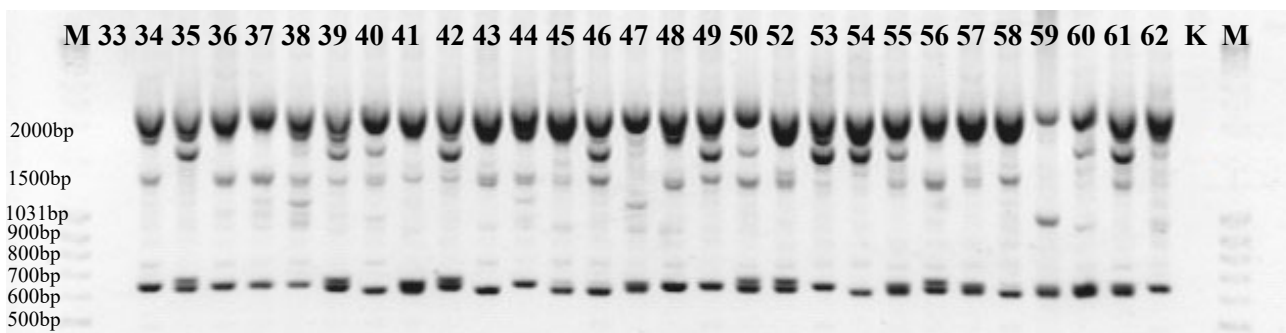
3.13.pav Hibridinių drebulių DNR pagausinimo spektrai gauti su Roth 170 – 03 pradmeniu. Skaitmenimis 1 – 32 pažymėti hibridai, M – DNR ilgio standartas, K – kontrolė



3.14.pav Hibridinių drebulių DNR pagausinimo spektrai gauti su Roth 170 – 03 pradmeniu. Skaitmenimis 33 – 62 pažymėti hibridai, M – DNR ilgio standartas, K – kontrolė

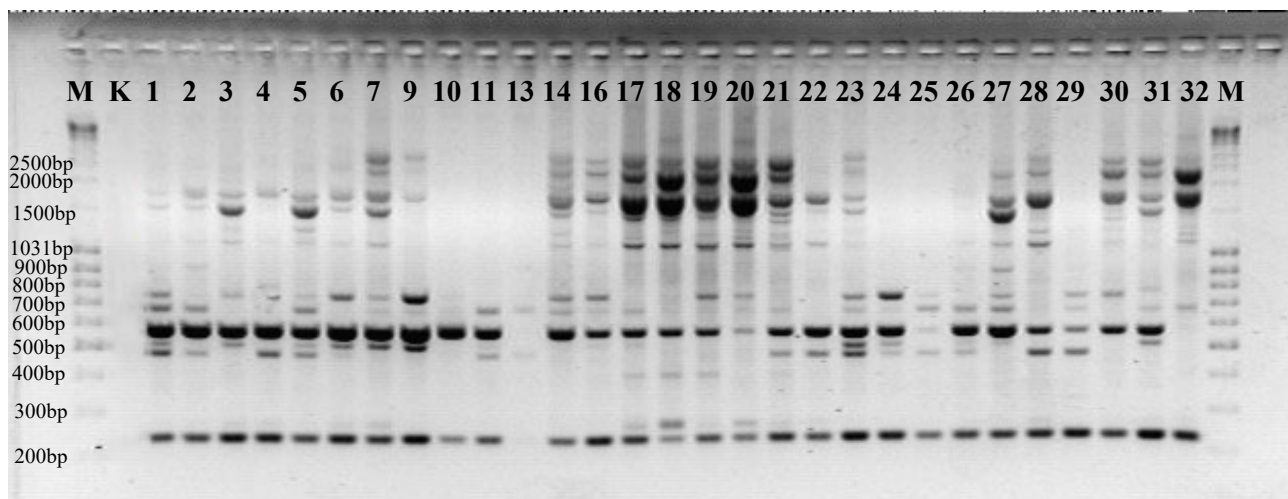


3.15.pav Hibridinių drebulių DNR pagausinimo spektrai gauti su Roth 170 – 10 pradmeniu. Skaitmenimis 1 – 32 pažymėti hibridai, M – DNR ilgio standartas, K – kontrolė

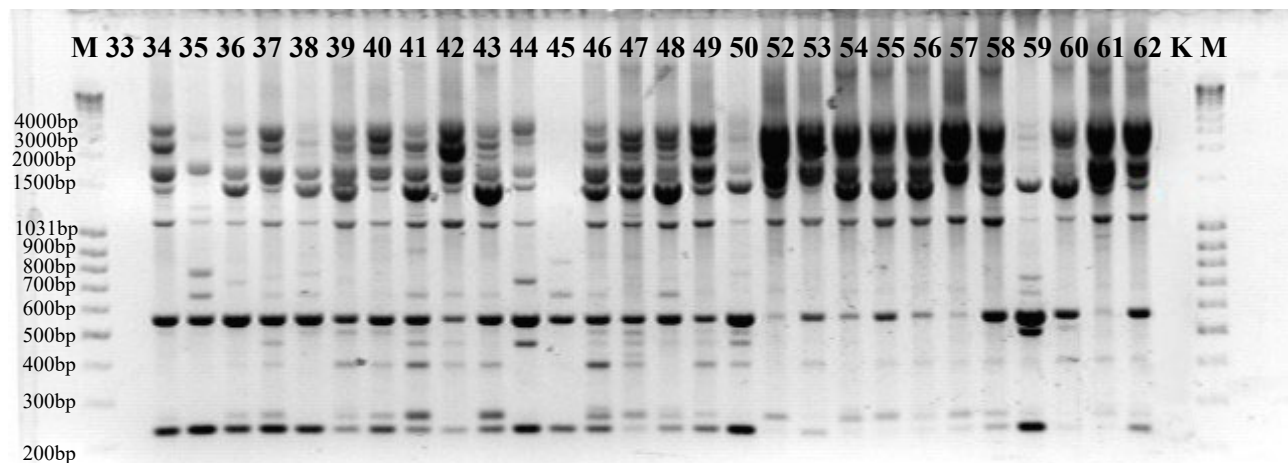


3.16.pav Hibridinių drebulių DNR pagausinimo spektrai gauti su Roth 170 – 10 pradmeniu. Skaitmenimis 33 – 62 pažymėti hibridai, M – DNR ilgio standartas, K – kontrolė

Hibridinės drebulės genetinės įvairovės nustatymui panaudojus Roth 170 – 02 pradmenį buvo gauta geros kokybės amplifikacija, dauguma fragmentų lengvai atskiriami bei sugrupuojami pagal dydį (3.17., 3.18.pav.). Mėginių 52 – 62 tarp 1500 ir 2000 bp pagausintų DNR fragmentai gauti neaiškūs ir sudėtinga juo atskirti, tačiau tam galėjo turėti įtakos nekokybiškai supilstyti reagentai. DNR fragmentai nuo 200 iki 1500 bp buvo gauti kokybiškai atsiskyre, panašaus dydžio ir lengvai atskiriami. Pagausintų DNR fragmentų dydžiai svyravo 220 – 2000 bp, visi hibridai turėjo 220 bp ilgio DNR fragmentus.



3.17.pav Hibridinių drebulių DNR pagausinimo spektrai gauti su Roth 170 – 10 pradmeniu. Skaitmenimis 1 – 32 pažymėti hibridai, M – DNR ilgio standartas, K – kontrolė



3.18.pav Hibridinių drebulių DNR pagausinimo spektrai gauti su Roth 170 – 10 pradmeniu. Skaitmenimis 33 – 62 pažymėti hibridai, M – DNR ilgio standartas, K – kontrolė

Gauti elektroforezės rezultatai buvo paversti binarinių požymių matrica. APPD amplifikacijos apibendrinti rezultatai pateikti 3.7.lentelėje. Iš duomenų matoma, kad pagausintų drebulės hibridų DNR fragmentų dydžiai svyravo 220 – 4000 bp intervale. Iš 61 skirtingo dyžio DNR amplifikuotos juostos 52 buvo gautos polimorfinės, o tai sudarė 85,24 % visų gautų juostų. Vidutiniškai su kiekvienu pradmeniu gauta 12,2 amplifikuotų ir 10,4 polimorfinių DNR juostų. Iš apibendrintų duomenų (3.7.lentelė) matyti, kad labiausiai informatyvūs pradmenys buvo Roth B012 ir Roth 170 –

02. Panaudojus šiuos pradmenis gauta po 15 DNR juostų, iš kurių 14 buvo polimorfinės, o tai sudarė 93,33 %. Vienas iš informatyviausių pradmenų buvo Roth 170 – 03, kurį panaudojus gauta 12 skirtingo dydžio juostų, 9 juostos buvo polimorfinės, o tai sudarė 75 %. Mažiausiai informatyvūs pradmenys buvo Roth B017 ir Roth 170 – 10. Atlikus tyrimą su Roth B017 gauta 8 polimorfinės DNR juostos iš 11 amplifikuotų – tai sudarė 72,72 %. Panaudojant Roth 170 – 10 pradmenį gauta mažiausiai DNR juostų – 8 amplifikuotos juostos, iš kurių 7 buvo polimorfinės (87,5 %).

3.7. lentelė. Oligonukleotidinių pradmenų APPD rezultatai

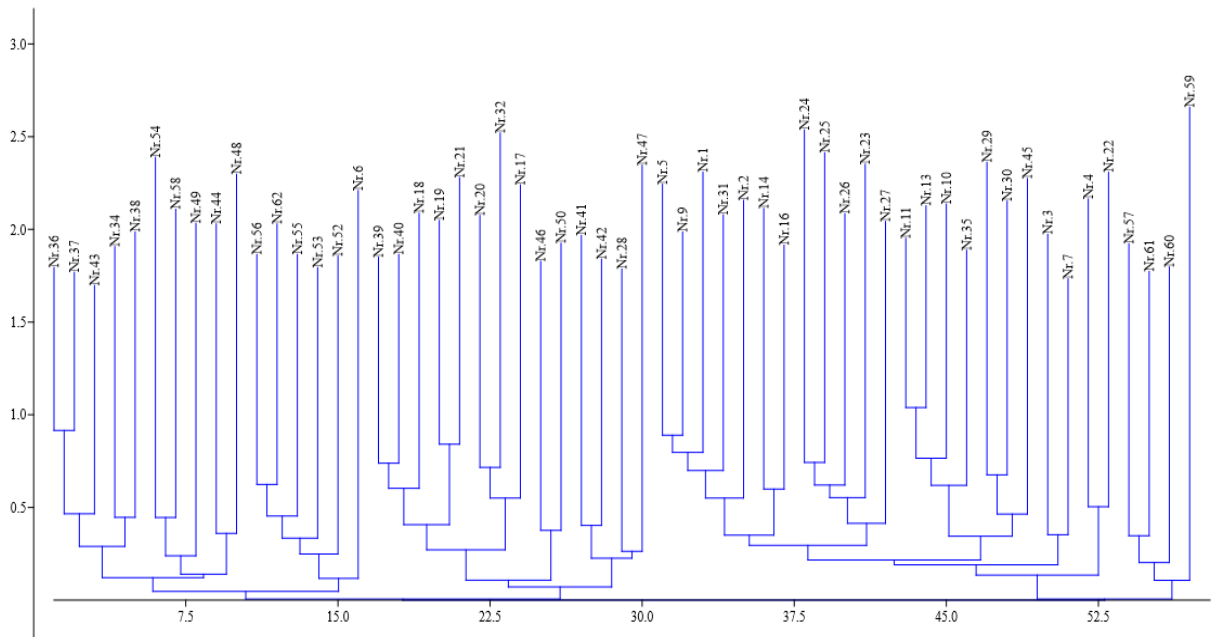
Pradmens pavadinimas	Amplifikuotų juostų skaičius	Polimorfinių juostų skaičius	Polimorfizmas, %	Amplifikuotų fragmentų dydžio intervalai
Roth B012	15	14	93,33	400 – 4000 bp
Roth B017	11	8	72,72	700 – 2500 bp
Roth 170 – 02	15	14	93,33	220 – 2000 bp
Roth 170 – 03	12	9	75	500 – 2000 bp
Roth 170 – 10	8	7	87,5	600 – 2000 bp
Iš viso	61	52	-	-
Vidutiniškai	12,2	10,4	85,24	-

3.3.2. Drebulės hibridų giminingumo nustatymas

Remiantis APPD duomenimis (gauta binarine duomenų matrica), genetiniai atstumai tarp drebulės hibridų buvo apskaičiuoti panaudojant GenAlEx 6.5 programą. Apskaičiuotas genetinis atstumas yra lygus gautų amplifikuotų skirtingo dydžio juostų kiekio skirtumui tarp skirtingų hibridų. Panaudojus genetinių atstumų reikšmes Past 3 kompiuterinės programos pagalba buvo nubraižyta NJ (*angl., Neighbour – Joining*) dendograma, parodanti tirtų hibridų giminingumą (3.19.pav). Taip pat palyginimui nubraižyta dendograma UPGMA (*angl., Unweighted Pair - Group Method of arithmetic Averages*) metodu (3.20.pav).

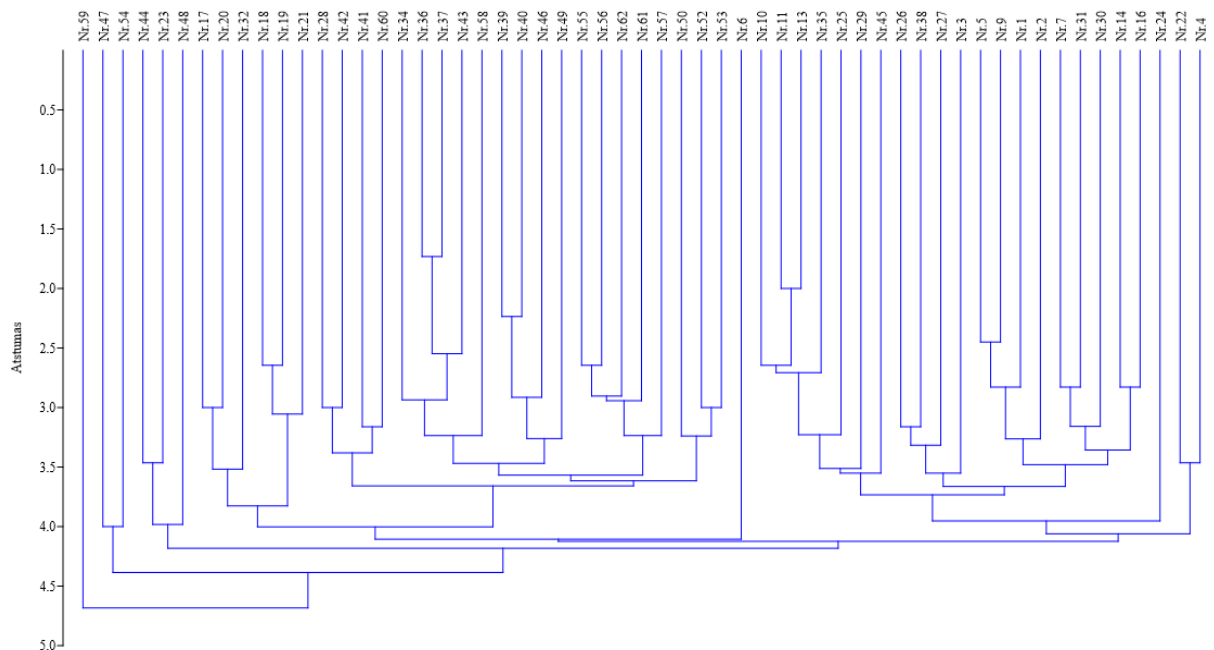
Visi drebulės hibridai buvo suskirstyti į poras pagal mažiausią genetinį atstumą. Didžiausias genetinis atstumas buvo įvertintas tarp hibridų Nr.59 ir Nr.25 bei Nr.24 ir Nr.54, tarp šių individų buvo gauta po 29 skirtingus lokusus. Genetiškai panašiausi hibridai gauti Nr.36 ir Nr.37, kurie turėjo tik 3 skirtingus lokusus. Tarp individų Nr.13 ir Nr.11 genetinis atstumas taip pat gautas vienas iš mažiausių, hibridai turėjo tik 4 skirtingus lokusus. Tik penkiomis skirtingo dydžio DNR juostomis skyrėsi hibridai Nr. 39 ir Nr.40, o Nr.5 ir Nr.9 – šešiomis. Šios išvardintos mažiausią genetinį atstumą turinčios drebulės hibridų poros tiek NJ tiek UPGMA metodu buvo suporuotos genetiniame medyje.

NJ metodu sudarytoje dendogramoje buvo gautos keturios aiškios šakos, kurios išskiria tirtus genetiškai artimesnius drebulės hibridus. Į vieną šaką pateko hibridai Nr.59, 60, 61 ir 57. Į antrą šaką pateko Nr.22, 4, 7, 3, 45, 30, 29, 35, 10, 3, 11, 27, 23, 26, 25, 24, 16, 14, 2, 31, 1, 9, 5 hibridai. Dar į atskirą šaką pateko Nr.47, 28, 42, 41, 50, 46, 17, 32, 20, 21, 19, 18, 40 ir 39 hibridai. Į ketvirtą šaką pateko hibridai Nr. 6, 52, 53, 55, 62, 56, 48, 44, 49, 58, 54, 38, 34, 43, 37 ir 36.



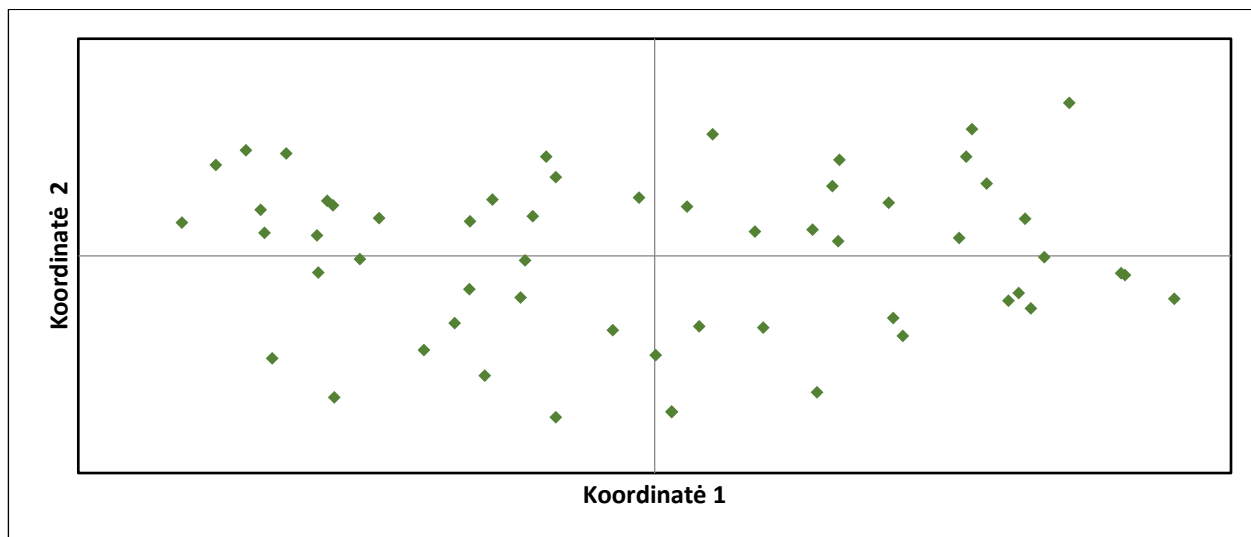
3.19.pav. Tirtų drebulės hibridų dendograma, sudaryta NJ metodu

UPGMA metodu sudaryta dendograma panaši į gautą NJ metodu. Kaip ir pirmuoju atveju išsiskiria keturios šakos, kuriuose hibridai pasiskirsto gana panašiai. Kai kurių hibridų poros skiriasi, tačiau tie patys individai pasiskirstymo šakose beveik vienoda tvarka kaip ir NJ metodu. Šie duomenys tik patvirtina hibridinės drebulės palikuonių genetinę įvairovę.



3.20.pav. Tirtų drebulės hibridų dendograma, sudaryta UPGMA metodu

Gautuose dendogramose matyti, kad visi hibridai genetiškai skiriasi. Šią išvadą taip patvirtina ir hibridinės drebulės individų pasiskirstymo pagal genetinį atstumą analizė atlikta pagrindinių kordinačių metodu (3.21.pav). Trys koordinatės dalys apibūdina didžiąją tirtų hibridų genetinės įvairovės dalį. Pirmoji ašis – 30,99%, antroji – 48,34%, trečioji – 14,67%, kuri paveiksle nepavaizduota. Šios trys ašys aprašo 63% tirtų hibridų.



3.21.pav. Drebulės hibridų išsidėstymas dvimatėje erdvėje

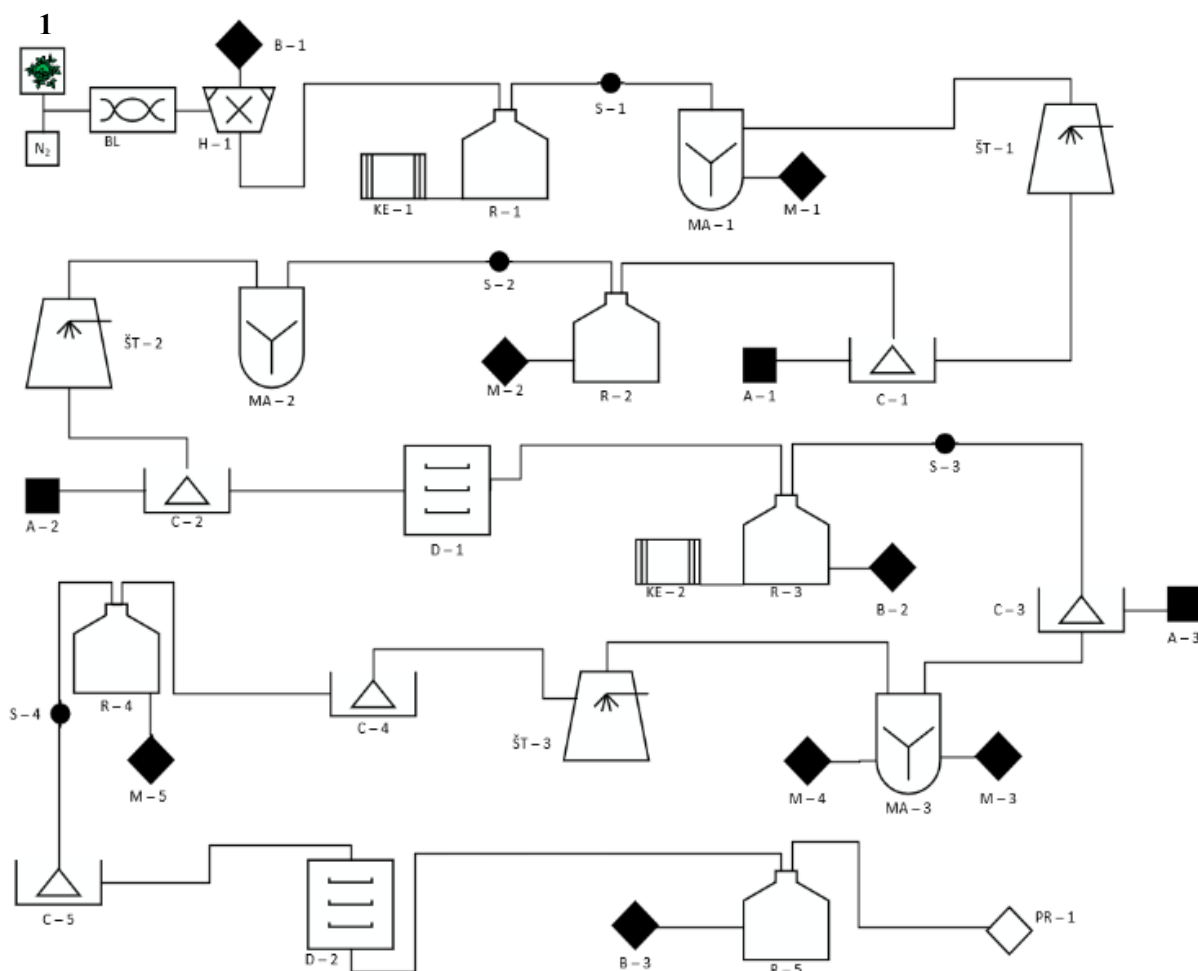
Iš drebulės hibridų išsidėstymo erdvėje matoma, kad labiau giminigų ir visiškai skirtingų individų. Tai rodo, kad genetinis panašumas tarp klonų yra mažas, vyrauja didelė genetinė įvairovė.

4. Rekomendacijų dalis

Kasmet didėjant biomsės poreikiui, vis aktualesnė tampa problema – kaip padidinti išauginamos medienos biomasės kiekį. Viena iš sunkiausių trumpos apyvartos želdinių veiklų yra atrinkti perspektyviausias medžių rūšis, kurios užtikrintų didelį medienos biomasės kiekį per trumpą rotacijos laiką bei užtikrintų aukštą jos kokybę.

Magistro baigiamojo projekto darbe buvo atlikti pilotiniai tyrimai, norint nustatyti hibridinės drebulės perspektyvas jas panaudoti trumpos apyvartos želdiniams. Buvo siekiama iširti drebulės hibridų genetinę įvairovę *in vitro* sąlygomis. Tam tikslui buvo naudojamas molekulinis žymenų metodas, paremtas atsiktinai amplifikuotų polimorfinės DNR pagausinimu. Remiantis gautais duomenimis, tiriant hibridinės drebulės DNR įvairovę APPD metodu, patartina naudoti Roth 170 – 02 ir Roth B012 pradmenis DNR grandinių pagausinimui.

Tyrimo DNR išskyrimas atliktas modifikuotu CTAB metodu, gautos DNR koncentracijos grynumas varijavo 1,60 – 1,94 ribose. Kad galima būtų atlikti PGR užtenka, kad 260/280 nm santykis būtų nuo 1,6. Tačiau norint, kad DNR mėginys neturėtų jokių priemaišų ir būtų visiškai grynas, santykis turi būti nuo 1,8 iki 2,0. Atliekant tolimesnius tyrimus su dviem atrinktais oligonukleotidiniais pradmenimis, patartina DNR išskyrimui naudoti baltymų nusodinimo metodą, kuriuo gaunama grynesnė DNR [50, 51]. Tolimesniems tyrimams siūloma DNR išskyrimo principinė schema pavaizduota 4.1.pav.



4.1.pav. DNR išskyrimo baltymų nusodinimo metodu principinė schema

Pradžioje surenkama žaliava į talpyklą **1**. Toliau žaliava su skystu azotu N_2 atšaldoma ir susmulkinama blenderyje **BL**. Į paruošta susmulkintą žaliavą įpilamas ekstrakcijos buferis **B – 1** ir mišinys homogenizuojamas **H – 1**. Mišinys perpilamas į rezervuarą **R – 1**, kuriame kaitinimo elementu **KE – 1** palaikoma 65 °C temperatūroje. Mišinys inkubuojamas 20 min. Mišinys toliau siurbliu **S – 2** tiekimas į maišyklę **MA – 1**, įpilamas kalio acetatas **M – 1**, intensyviai maišoma ir inkubuojama šaldymo talpoje **ŠT – 1**, užpildytoje ledu. Toliau po inkubacijos lede išsiskyrusios nuosėdos **A – 1** nusodinamos centrifugoje **C – 1** ir pašalinamos kaip atliekos. Į gautą supernantą rezervuare **R – 2** įpilama izopropanolio **M – 2**. Mišinys siurbliu tiekimas į maišyklę **MA – 2**, maišomas 1 val ir inkubuojamas 4 °C temperatūroje šaldymo talpoje **ŠT – 2**. Toliau mišinys centrifuguojamas centrifugoje **C – 2**, kaip atliekos pašalinamas supernantas **A – 2**. Nusėdusi DNR džiovinama džiovyklėje **D – 1**. Perkeliama į rezervuarą **R – 3**, į kurią įpilama buferio **B – 2** ir kaitinimo elementu **KE – 2** palaikoma 65 °C temperatūra. Mišinys inkubuojamas 30 min. Siurbliu **S – 3** tiekimas į centrifugą **C – 3** ir centrifuguojama 5 min, netirpios nuosėdos pašalinamos kaip atliekos **A – 3**, o gautas supernantas perpilamas į maišyklę **MA – 1**. Į maišyklę įpilama natrio acetato **M – 3** ir šalto izopropanolio **M – 4**. Toliau gautas mišinys inkubuojamas šaldymo talpoje **ŠT – 3** 4 °C temperatūroje 1 val. Išsiskyrusi DNR centrifuguojama centrifugoje **C – 4**. Nusėdusi DNR rezervuare **R – 4** praplaunama šaltu 80 % etanoliumi **M – 5**. Toliau DNR siurbliu tiekiamas į centrifugą **C – 5** ir centrifuguojama 1 min. Toliau nupylus etanolį DNR 10 min džiovinama džiovinimo kameroje **D – 2**, kad išgaruotų etanolio likutis. Pabaigoje gauta DNR rezervuare **R – 5** ištirpinama buferyje **B – 1**. Gautas produktas **PR – 1** toliau gali būti iš karto naudojamas arba laikomas šaldiklyje.

4.1.lentelė. DNR išskyrimo baltymų nusodinimo metodu principinės schemos įrenginių žymėjimai

Žymėjimas	Įrenginys
BL	Blenderis
H – 1	Homogenizatorius
KE – 1, KE – 2	Kaitinimo elementas
R – 1, R – 2, R – 3, R – 4, R – 5	Rezervuaras
S – 1, S – 2, S – 3	Siurblys
MA – 1, MA – 2, MA – 3	Maišyklė
ŠT – 1, ŠT – 2, ŠT – 3	Šaldymo talpa
C – 1, C – 2, C – 3, C – 4, C – 5	Centrifuga
D – 1, D – 2	Džiovinimo kamera

Išvados

1. Įvertinus hibridinės drebulės individų fenotipinius požymius nustatyta, kad hibridų augimo greitis ir išorės būklė skyrėsi. Po dviejų vertinimų didžiausia dalis drebulės hibridų abiem atvejais pateko į II grupę pagal aukštį. Būklės vertinimas turėjo panašią tendenciją – daugiau nei pusės mikroūglių būklė buvo puiki. Iš 160 drebulės hibridų 58 pasižymėjo geriausiais fenotipiniais požymiais.
2. Atlikus oligonukleotidinių pradmenų įvertinimą pagal kriterijus atrinkti 5 informatyviausi: Roth B012, Roth B07, Roth 170 – 02, Roth 170 – 03 ir Roth 170 – 10. Daugiausiai informacijos apie hibridų genetinę įvairovę suteikė ir aukščiausia amplifikacijos kokybe pasižymėjo Roth B012 ir Roth 170 – 02 pradmenys, naudojant šiuos pradmenis gautas didžiausias amplifikuotų fragmentų dydžio intervalas. Mažiausias amplifikuotų juostų skaičius gautas naudojant Roth 170 – 10.
3. Tarp hibridinės drebulės (*Populus tremula* × *Populus tremuloides* Michx.) bendrų palikuonių nustatytas didelis polimorfizmas, kuris siekė 85, 24%.

Literatūros sąrašas

1. NOYES, P. D., et al. The toxicology of climate change: environmental contaminants in a warming world. *Environment international*. 2009, 35(6), 971-986.
2. TULLUS, A., et al. Above-ground biomass characteristics of young hybrid aspen (*Populus tremula* L. x *P. tremuloides* Michx.) plantations on former agricultural land in Estonia. *Biomass and Bioenergy*. 2009, 33(11), 1617-1625.
3. NEALE, D. B. and KREMER, A. Forest tree genomics: growing resources and applications. *Nature Reviews Genetics*. 2011, 12(2), 111- 122.
4. TULLUS, H., TULLUS, A. and RYTTER, L. Short-rotation forestry for supplying biomass for energy production. In: *Forest BioEnergy Production*. 2013, 39-56. ISBN 978-1-4614-8391-5.
5. TULLUS, A., et al. Short-rotation forestry with hybrid aspen (*Populus tremula* L. x *P. tremuloides* Michx.) in Northern Europe. *Scandinavian Journal of Forest Research*. 2012, 27(1), 10-29.
6. GAUR, A., et al. In vitro plant regeneration studies and their potential applications in *Populus* spp.: a review. *Israel journal of plant sciences*. 2016, 63(2), 77-84.
7. AVISE, J. C. Molecular markers, natural history and evolution. Springer Science & Business Media, 2012, 44-91. ISBN 978-0-412-03781-8.
8. MOCK, K. E.; RICHARDSON, B. A.; WOLF, P. G. Molecular tools and aspen management: A primer and prospectus. *Forest ecology and management*. 2013, 299, 6-13.
9. BAUM, S., et al. The impact of short rotation coppice plantations on phytodiversity. *Landbauforschung vTI Agriculture and Forestry Research*. 2009, 3(59), 163-170. ISSN 0458 – 6859.
10. ALCANTARA, C., et al. Mapping abandoned agriculture with multi-temporal MODIS satellite data. *Remote Sensing of Environment*. 2012, 124, 334-347
11. HJELM, K. and RYTTER, L. The demand of hybrid aspen (*Populus tremula* x *P. tremuloides*) on site conditions for a successful establishment on forest land. *SILVA FENNICA*. 2018, 52(5), 1-14
12. SCHROEDER, H. and FLADUNG, M. SSR and SNP markers for the identification of clones, hybrids and species within the genus *Populus*. *Silvae Genetica*. 2010, 59(1-6). 257-263.
13. TULLUS, A., et al. Economics of hybrid aspen (*Populus tremula* L. x *P. tremuloides* Michx.) and silver birch (*Betula pendula* Roth.) plantations on abandoned agricultural lands in Estonia. *Baltic Forestry*. 2012, 18(2), 288-298. ISSN 2029 – 9230
14. KHATTAB, S. Effect of different media and growth regulators on the in vitro shoot proliferation of aspen, hybrid aspen and white poplar male tree and molecular analysis of variants in micropropagated plants. *Life science journal*. 2011, 8(1), 177-184. ISSN 1097–8135.
15. EL SHERIF, F. and KHATTAB, S. Direct shoot regeneration from leaf, root and stem internode segments of male poplar trees and the molecular analysis of variant regenerated plants. *Journal of American Science*. 2011, 7(8), 200-206. ISSN 1545-1003.
16. WINKLER, S., et al. PCR-based detection of single sequence variants from a natural collection of the non-model tree species European Aspen *Populus tremula* (L.). *Silvae Genetica*. 2015, 64(1-6), 259-269.
17. TAKATA, N. and ERIKSSON, M. E. A simple and efficient transient transformation for hybrid aspen (*Populus tremula* x *P. tremuloides*). *Plant methods*. 2012, 8(1), 30. ISSN: 1746-4811.

18. ZHIGUNOV, A. V., et al. Development of F1 hybrid population and the high-density linkage map for European aspen (*Populus tremula* L.) using RADseq technology. *BMC plant biology*. 2017, 17(1), 180.
19. PAKULL, B., et al. Genetic linkage mapping in aspen (*Populus tremula* L. and *Populus tremuloides* Michx.). *Tree Genetics & Genomes*. 2009, 5(3), 505-515.
20. PLIŪRA, A. Sveikų drebulynų veisimas. *Miškininko žinynas*. Vilnius, 1991.
21. HYTÖNEN, J. Biomass, nutrient content and energy yield of short-rotation hybrid aspen (*P. tremula* x *P. tremuloides*) coppice. *Forest Ecology and Management*. 2018, 413, 21-31.
22. PLIŪRA, A. and SUCHOCKAS, V. Application and dissemination of innovative technologies and scientific knowledge on hybrid aspen propagation for establishing of very productive plantations in field of plantational forestry. Rep. No. 7, 2010.
23. PLIŪRA, A., et al. R. Research and preparation of recommendations on cloning of hybrid aspen by root cuttings and on establishing of plantation for vegetative propagation. Project report. No. 1PM-KK-07- 10011586. Kaunas: The Lithuanian Forest Research Institute., 2010.
24. BURBULIS, Natalija ir kt. *Augalų genetinės įvairovės kūrimas somatinių audinių kultūroje*. Akademija, 2009.
25. SUCHOCKAS, V. Influence of parent trees characteristics on propagation of hybrid aspen by root cuttings. *Baltic Forestry*. 2010, 16(1), 2-7. ISSN 1392 – 1355.
26. ZONTIKOV, D. N., et al. (2014). Micropropagation of highly productive forms of diploid and triploid aspen. In *Advanced Materials Research*. 2014, 962, 681 – 690.
27. ŽIAUKA, J. and S. Kuusienė. Multiplication and growth of hybrid poplar (*Populus alba* × *P. tremula*) shoots on a hormone-free medium. *Acta Biologica Hungarica*. 2014, 65(3), 346-354.
28. BAIRU, M. W., et al. Factors contributing to in vitro shoot-tip necrosis and their physiological interactions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2009, 98(3), 239-248.
29. XU, M., et al. Isolation of high quality RNA and molecular manipulations with various tissues of *Populus*. *Russian journal of plant physiology*. 2009, 56(5), 716-719.
30. STAATS, M., et al. (2011). DNA damage in plant herbarium tissue. *PLoS one*. 2011, 6(12), e28448.
31. DEMEKE, T. and G. R. JENKINS. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2010, 396(6), 1977-1990.
32. HEALEY, A., et al. Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. *Plant methods*. 2014, 10(1), 21.
33. AMANI, J., et al. (2011). A simple and rapid leaf genomic DNA extraction method for polymerase chain reaction analysis. *Iranian Journal of Biotechnology*. 2011, 9(1), 69-71.
34. POLITOV, D. V., et al. Application of microsatellite loci for molecular identification of elite genotypes, analysis of clonality, and genetic diversity in aspen *populus tremula* L.(Salicaceae). *International journal of plant genomics*. 2015.
35. KUMAR, P., et al. Potential of molecular markers in plant biotechnology. *Plant Omics*. 2009, 2(4), 141. ISSN 1836 – 3644.
36. CLARK, Melody S., ed. *Plant molecular biology—a laboratory manual*. Springer Science & Business Media, 2013. ISBN 978-3-642-49144-3.

37. MONDINI, L., et al. Assessing plant genetic diversity by molecular tools. *Diversity*. 2009, 1(1), 19-35.
38. COLLARD, B. C., et al. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*. 2005, 142(1-2), 169-196
39. KUUSIENĖ, S. Mokomoji knyga: *In vitro* technologijų taikymas greitai augančių medžiagų mikroklonavimui: augalų-regeneratų tapatumo nustatymas AAPD meetodu. Girionys, 2006, 4 – 8 p.
40. BABU, K. N., et al. (2014). Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and derived techniques. In *Molecular Plant Taxonomy*. 2014, 191-209.
41. WANG, M. L., et al. Microsatellite markers in plants and insects. Part I: Applications of biotechnology. *Genes, Genomes and Genomics*. 2009, 3(1), 54-67.
42. KOVIURANTA, L., et al. The effect of temperature on seed quality and quantity in crosses between European (*Populus tremula*) and hybrid aspens (*P. tremula* x *P. tremuloides*). *Silva Fennica*. 2012, 46(1). ISSN 0037 – 5330.
43. MAMMADOV, J., et al. SNP markers and their impact on plant breeding. *International journal of plant genomics*. 2012.
44. SAHU, S. K., et al. DNA extraction protocol for plants with high levels of secondary metabolites and polysaccharides without using liquid nitrogen and phenol. *ISRN Molecular Biology*. 2012.
45. KHATTAB, S. Effect of different media and growth regulators on the in vitro shoot proliferation of aspen, hybrid aspen and white poplar male tree and molecular analysis of variants in micropropagated plants. *Life science journal*. 2011, 8(1), 177-184.
46. NAZNEEN, H., REDDY, P. V., and REDDY, S. K. (2016). Molecular analysis of genetic fidelity of *Stevia rebaudiana* Bert. using RAPD markers. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 5(4), 750-759.
47. TIETZ, D.(ed.). *Nucleic acid electrophoresis*. Springer Science & Business Media, 2012.
48. PIVORIENĖ, O. Paprastųjų pasikartojančių sekų intarpų (ISSR) identifikavimas ir charakterizavimas daugiametės svidrės genome. Daktaro disertacija, *Žemdirbystės institutas*, 2008.
49. LUTTER, R., et al. The impact of short-rotation hybrid aspen (*Populus tremula* L. x *P. tremuloides* Michx.) plantations on nutritional status of former arable soils. *Forest ecology and management*. 2016, 362, 184-193.
50. FANG, G., HAMMAR, S. and GRUMET, R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *Biotechniques*, 1992, 13(1). 52-4, 56.
51. DELLAPORTA, S. L., WOOD, J. and HICKS, J. B. A plant DNA minipreparation: version II. *Plant molecular biology reporter*, 1983, 1(4) 19-21.