

## Paupių kai kurių žolinių augalų rūšių molekulinį tyrimų metodinės paieškos

Erika Juškaitytė, Edvina Krokaitė, Lina Jocienė, Algimantas Paulauskas,  
Eugenija Kupčinskienė

Vytauto Didžiojo universitetas

Nemaža dalis į sausumą išmestų teršalų yra išplaunami ir nunešami į ežerus bei upes. Akivaizdu, kad upių ir jų pakrančių augalija patiria nepalankų cheminį poveikį, kurį sustiprina fizinė žmogaus skvarba. Duomenys apie Lietuvos vandens augalų būklę nėra gausūs. Šiuolaikiniuose augalų įvairovės tyrimuose greta morfologija, fiziologija pagrįstų vertinimo būdų plačiai taikomi molekulinės biologijos metodai, naudojant DNR žymenis. Pirmas žingsnis taikant šiuos žymenis, yra kokybiškos DNR išskyrimas. Žemės ūkio auginamų augalų rūšių DNR išskyrimo metodai yra labai išbulinti ir nuodugniai aprašyti. Natūraliai augančių augalų rūšių populiacijų genetinės įvairovės tyrimai nėra gausūs ir juose aprašomi metodai dažniausiai pateikiami labai apibendrintai, be tikslesnių, išsamesnių aprašų. Tarp augalų DNR išskyrimui naudojamų būdų dažnai minimi metodai, kuriuose panaudojamas cetiltrimetilamonio bromidas (CTAB), natrio dodecilsulfatas, įvairūs paruošti gamykliniai, nežinomos sudėties rinkiniai. Darbo tikslu buvo atrinkti tinkamiausius DNR išskyrimo metodus kai kuriems Lietuvoje augantiems *Cucurbitaceae*, *Lythraceae* šeimų bei *Poaceae* šeimos *Aveneae* tribos augalams, paplitusiems Nemuno paupiuose. Pasirinktiems, neretai greta augantiems augalams, atrinkti DNR išskyrimo būdai buvo labai skirtingi.

DNR išskyrimas, *Cucurbitaceae*, *Lythraceae*, *Poaceae*

### Įvadas

Populiaciniai tyrimai yra vieni iš pastaraisiais dešimtmečiais labiausiai plėtojamų biologijos mokslo kryptių. Dažnai populiacijos lyginamos pagal jų individų DNR polimorfizmo dydį (Sharma et al., 2008; Jones et al., 2009; Ward, Jasieniuk, 2009). Vertinant genetinę įvairovę galima nagrinėti kai kurias ekologines problemas. Per praėjusius kelis dešimtmečius augalų populiacijos buvo tiriamos pagal atsitiktinai pagausintos polimorfines DNR (APPD, angl. *Random Amplified Polymorphic DNA*, RAPD Williams et al., 1990), restrikcinių fragmentų ilgio polimorfizmo (RFIP, angl. *Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP Botstein et al. 1980), paprastųjų kartotinių sekų intarpų (PKSI, angl. *inter-simple sequence repeats*, ISSR; Zietkiewicz et al., 1994; Nelson et al., 2014), mikrosatelitų / paprastų kartotinių sekų (PKS, angl. *simple sequence repeats*, SSR, Jakubowski et al., 2011; 2013), pagausintų fragmentų ilgio polimorfizmo (PFIP, angl. *Amplified Fragment Length Polymorphism*, AFLP; Beismann, 1997; McGregor et al., 2000) žymenis bei pavienių nukleotidų polimorfizmą (PNP, angl. *single nucleotide polymorphism*, SNP; Arif et al., 2010). Dabartiniu metu populiacijų genetiniai duomenys labai gausėja, taikant chloroplastų, mitochondrijų ir branduolių DNR sekoskaitą (Sharma et al., 2008). Įvardintų DNR žymenų analizė remiasi polimerazės grandininė reakcija (PGR, angl. *polymerase chain reaction*, PCR; Saiki et al., 1985). Žymenų analizės būtina atlikimo sąlyga – aukštos kokybės DNR. Skirtingoms augalų rūšims taikomi nevienodi DNR išskyrimo būdai. Tai sąlygoja labai įvairūs kokybiniai ir kiekybiniai požiriai augalų pirminiai bei antriniai metabolitai, kurie gali trikdyti DNR polimerazės grandininės reakcijos eigą. Esminės junginių grupės, kurias reikia pašalinti išskiriant DNR, yra baltymai, polisacharidai, RNR ir polifenoliniai junginiai. Idealiausiuoju metodu laikomas tas, kuris yra ne tik tikslus, bet ir pigus, paprastas bei greitas.

Atrenkant produktyvesnes žemės ūkio augalų rūšis, auginamas platesniais mastais, buvo sukurti ir plačiai aprašyti toms rūšims, jų veislėms taikomi DNR išskyrimo metodai (Brazauskas et al., 2004, Ruginienis et al., 2015), tačiau natūraliai augančių augalų jie mažiau žinomi (Strefeler et al., 1996; Xu et al., 2002; Jakubowski et al., 2011; 2013). Vienas iš pirmųjų DNR išskyrimo iš augalų būdų, naudojant

izoliuotus branduolius, buvo ilgas, brangus, mažos DNR išeigos ir nuodingas tyrėjui (Murry, Thompson, 1980). Netrukus buvo pasiūlytas ir taikomas iki šiol, augalų DNR išskyrimo būdas (Dellaporta et al., 1983), baltymus ir polisacharidus pašalinant detergentu – natrio dodecilsulfatu (SDS; Rogers, Bendich, 1988). Saghai-Marooof ir kt. (1984) supaprastino Murry ir Thompson metodą, išskirdami DNR iš liofilizuotų augalų kitu detergentu – cetiltrimetilamonio bromidu (CTAB), pasirinktinai išsodinančiu DNR, o polisacharidams liekant tirpale. Po to, Doyle ir Doyle (1987), padvigubino naudojamų reagentų koncentracijas, kad galėtų dirbti su vandeninga augalų žaliąja mase, be liofilizatoriaus panaudojimo. Šis metodas tapo populiariausiu, ypač kai tiriamos augalinės medžiagos yra nedaug. Jobses ir kt. (1995) fenolinių junginių pašalinimui pasiūlė naudoti polivinilpirolidoną (PVP). Pastaruoju metu be minėtų Doyle ir Doyle bei Dellaporta metodų DNR išskyrimui plačiai naudojami įvairūs gamykliniai rinkiniai: „Genomic DNA purification kit“ (Thermo Scientific), „Dneasy Plant Mini kit“ (Qiagen), „MasterPure™ Plant Leaf DNA Purification Kit“ (Epicentre), „DNA Clean and Concentrator™ 25 kit“ (Zymo Research) ir kt. (Demeke, Jenkins, 2010), kurių tikslu sudėtis nėra žinoma vartotojui.

Molekuliniiais žymenimis buvo tiriami kai kurie *Poaceae*, *Cucurbitaceae*, *Lythraceae* šeimų augalai, tačiau nepateikiant išsamių duomenų apie jų DNR išskyrimą (Paris et al., 2003; Chun et al., 2009; Jakubowski et al., 2011; 2013; Nelson et al., 2014). Išskirtos DNR kiekis ir kokybė priklauso nuo augalinės medžiagos kiekio, DNR išskyrimui bei valymui naudotų reagentų. Todėl šio darbo tikslu buvo pasirinkti vieną iš aprašytų DNR išskyrimo būdų – CTAB arba gamyklinius rinkinius, juos pritaikant kai kurioms *Poaceae*, *Cucurbitaceae*, *Lythraceae* šeimų rūšims, natūraliai augančioms permirkusiame dirvožemyje.

### Tyrimų metodika

Kiekvienos rūšies augalai buvo surinkti iš kelių populiacijų. DNR išskyrimui naudoti sveiki – ligų, kenkėjų ar mechaniškai nepažeisti lapai. Augalų lapai skysto azoto pagalba buvo smulkinami iki miltelių pavidalo masės. Kiekvienam bandymo atvejui imta po 5–10 augalų.

DNR išskyrimo būdas *Poaceae*, *Cucurbitaceae*, *Lythraceae* šeimos augalams parinktas iš 3 galimų metodų: CTAB metodo (Doyle, Doyle (1990), universalus genomines DNR išskyrimo rinkinio „Genomic DNA purification kit“ K0512 (Thermo Scientific, Lietuva), papildomai DNR priemaišas valant sorbitoliu (Russell et al., 2010) ar kolonėlėmis (OneStep™ PCR Inhibitor Removal Kit, Zymo Research; JAV). DNR gryninimas buvo stebima ir DNR išeiga.

DNR išskyrimui CTAB metodu, sutrinta augalinė masė (masė pateikta 1–3 lentelėse) suberiama į 2 ml tūrio mėgintuvėlius su 800 µl DNR išskyrimo buferio (sudaryto iš: 0,4 ml 0,5 M EDTA, 1 ml 1 M Tris-HCl, 2,75 ml 5 M NaCl, 2 ml 10 % CTAB tirpalo, 0,1 g PVP, 0,02 ml 0,2 % β-merkaptotanolio, 3,73 ml H<sub>2</sub>O, tirpalo pH 8). Mėgintuvėliai buvo purtomi 30 min, laikant 65 °C termostate. Po inkubacijos į mėgintuvėlius pilama 800 µl chloroformo-izoamilio alkoholio (24:1) ir lengvai sumaišius centrifuguojama 5 min 10000 aps./min greičiu 20 °C temperatūroje. Gautas supernatantas atsargiai perkeliamas į švartus mėgintuvėlius. Valymas chloroformo-izoamilio alkoholiu atliktas pakartotinai. Išmatuojamas į naujus mėgintuvėlius perkeltas supernatanto tūris ir pridėjama pusė jo tūrio 5 M NaCl bei toks pat tūris šalto 96 % etanolio, sumaišoma ir valandą arba per naktį laikoma –20 °C temperatūroje. Mėginiai centrifuguojami 5 min 10000 aps./min greičiu 20 °C temperatūroje, atsargiai nupilamas supernatantas, ant nuosėdų pilama 200 µl šalto 70 % etanolio ir vėl centrifuguojama 5 min 10000 aps./min greičiu 20 °C temperatūroje. DNR išdžiovinama ir ištirpinama 100 µl Tris-EDTA buferiu. RNR pašalinimui naudojama 1 µl 10 mg/ml RNazės A (Thermo Scientific, Lietuva), mėginiai inkubuojami 30 min 37 °C termostate. Gautos DNR koncentracijos ir švarumo rodikliai įvertinami UV spindulių BioSpec-Nano (Shimadzu, JAV) spektrofotometru. DNR tirpalo optinis tankis nustatytas esant 260/280 nm, 260/230 nm bangų ilgiams. DNR koncentracija ir kokybė papildomai įvertinta elektroforezės būdu ištirpintą 0,5×TBE buferyje DNR frakcionuojant 1,5 % agarozės gelyje su etidžio bromidu. DNR gelyje buvo fotografuota UV šviesoje, naudojant transliuminatorių. Išbandytas papildytas CTAB metodas, kuomet prieš DNR skyrimą naudojamas sorbitolio buferis (sudarytas iš: 3,5 ml 1M sorbitolio, 1 ml 1M Tris-HCl, 0,1 ml 0,5 M EDTA, 0,1 g PVP, 0,11 ml ≥ 99 % β-merkaptotanolio) polisacharidų išvalymui. Kadangi CTAB metodas nebuvo tinkamas visoms tiriamoms rūšims, todėl buvo išbandytas DNR gryninimas, naudojant gamyklinį DNR išskyrimo rinkinį „Genomic DNA purification kit“ K0512 (Thermo Scientific, Lietuva), pagal gamintojų darbo eigos aprašą. Aukščiau nurodytais metodais išskirta DNR buvo papildomai valyta OneStep™ PCR Inhibitor Removal Kit kolonėlėmis, skirtomis polifenolių ir kitų priemaišų likučių pašalinimui iš DNR tirpalo.

## Rezultatai ir aptarimas

Išskyrinėjant DNR, jos išeigai bei kokybei svarbūs keletas veiksnių, dėl šios priežasties tyrimai visada yra daugiaveiksniai, ir tinkamiausio metodo paieška yra sudėtinga.

Išbandžius skirtingus DNR išskyrimo metodus buvo gauti rezultatai, kuriuos palyginus, kiekvienai augalų rūšiai buvo parinktas tinkamiausias DNR išskyrimo būdas. Pagal naudotą skirtingą tiriamų rūšių augalų sausosios masės (s. m.) kiekį, įvertinta išskirtos DNR koncentracija ir jos grynumas (1–3 lentelės).

**1 lentelė.** *Echinocystis lobata* DNR koncentracija ir švarumas panaudojant skirtingus DNR gryninimo metodus

**Table 1.** *Echinocystis lobata* DNA concentration and optical density using different DNA purification methods

Augalo s.m., mg	DNR konc., ng/µl	260/280 nm <sup>***</sup>	260/230 nm <sup>***</sup>
1. CTAB* metodas			
30–170	672–1501	1,71–1,86	1,20–1,40
50	201–1979	1,98–2,13	1,91–2,16
Sorbitolis + CTAB			
150	1300–2662	2,02–2,05	1,91–1,99
300	1567–3795	1,41–2,02	1,27–1,88
2. Thermo Scientific DNR išskyrimo rinkinys K0512			
40–90	517–2223	2,02–2,09	2,47–2,52
50	615–2328	2,03–2,23	1,98–2,34
100	3492–4176	1,82–2,12	1,94–2,32
200	804–4149	1,46–2,12	1,44–2,28
Thermo Scientific rinkinys K0512 + kolonėlės**			
100	510–2299	1,91–2,02	2,49–3,54

\*CTAB metodas pagal Doyle ir Doyle (1990)

\*\* OneStep™ PCR Inhibitor Removal Kit kolonėlės

\*\*\* Sugertis prie 260/280 nm ir 260/230 nm bangų ilgiu

Papildomai naudotas sorbitolis ir po to CTAB metodas nebuvo tinkamas *Echinocystis lobata* DNR išskyrimui dėl gautų nutolusių nuo normos švarumo verčių (1 lentelė). Švariausia ir reikiamo kiekio *Echinocystis lobata* DNR išskirta naudojant gamyklinį DNR gryninimo Thermo Scientific rinkinį. Papildomai išvalius DNR OneStep™ PCR Inhibitor Removal Kit kolonėlėmis sumažėjo DNR koncentracija, o švarumas (vertės esant 260/230 nm bangos ilgiu), nepasiekė reikiamo lygmens. Bandymo metu buvo imti labai skirtingi šio augalo sausosios masės kiekiai, buvo nustatyta, kad tinkamiausia yra 100 mg augalo lapų sausosios masės.

**2 lentelė.** *Lythrum salicaria* DNR koncentracija ir švarumas panaudojant skirtingus DNR gryninimo metodus

**Table 2.** *Lythrum salicaria* DNA concentration and optical density using different DNA purification methods

Augalo s.m., mg	DNR konc., ng/µl	260/280 nm <sup>***</sup>	260/230 nm <sup>***</sup>
1. CTAB* metodas			
40–90	433–1024	1,80–2,02	0,92–1,46
Sorbitolis + CTAB			
100	558–1230	1,77–2,07	1,49–2,40
2. Thermo Scientific DNR išskyrimo rinkinys K0512			
40–100	22–955	2,04–3,25	1,79–3,51
Thermo Scientific rinkinys K0512 + kolonėlės**			
100	108–925	1,76–2,02	0,03–3,27

\*CTAB metodas pagal Doyle ir Doyle (1990)

\*\* OneStep™ PCR Inhibitor Removal Kit kolonėlės

\*\*\* Sugertis esant 260/280 nm ir 260/230 nm bangų ilgiams

Naudojant CTAB metodą *Lythrum salicaria* DNR išskyrimui, optinio tankio vertės esant 260/230 nm bangos

ilgiui buvo mažos, tuo tarpu DNR kokybė po valymo sorbitoliu pagerėjo, nes gauti optinio tankio rodikliai buvo artimiausi normai (2 lentelė). Valymas kolonėlėmis stipriai sumažino DNR koncentraciją, kartu sumažėjo ir optinio tankio vertės esant 260/230 nm bangos ilgiui. Remiantis šiais duomenimis DNR išskyrimui iš *Lythrum salicaria* buvo pasirinktas valymas sorbitoliu ir DNR išskyrimas CTAB metodu.

**3 lentelė.** *Phalaris arundinacea* DNR koncentracija ir švarumas panaudojant skirtingus DNR gryninimo metodus

**Table 3.** *Phalaris arundinacea* DNA concentration and optical density using different DNA purification methods

Augalo s. m., mg	DNR konc., ng/μl	260/280 nm***	260/230 nm***
1. CTAB* metodas			
50	329–1062	1.83–2.08	1.53–2.20
100–200	860–2308	1.32–2.00	1.18–1.70
Sorbitolis + CTAB			
50	44–78	1.88–2.07	1.23–1.56
2. CTAB + kolonėlės**			
50	304–373	1.88–1.96	4.83–10.2
2. Thermo Scientific DNR išskyrimo rinkinys K0512			
100–200	763–2196	2.02–2.06	2.40–2.52

\*CTAB – metodas pagal Doyle ir Doyle (1990)

\*\* OneStep™ PCR Inhibitor Removal Kit kolonėlės

\*\*\* Optinis tankis prie 260/280 nm ir 260/230 nm bangų ilgių

Išskiriant DNR CTAB metodu iš *Phalaris arundinacea* buvo gauti geriausi DNR švarumo ir koncentracijos rodikliai, o papildomai valant sorbitoliu, DNR koncentracija labai ženkliai sumažėjo (3 lentelė). Panaudojus OneStep™ PCR Inhibitor Removal Kit kolonėlės optinio tankio rodiklį, esant 260/230 nm bangų ilgiui, vertės nebeatitiko reikalavimų, todėl papildomas *Phalaris arundinacea* DNR valymas sorbitoliu ar kolonėlėmis buvo atmetas. Gamyklinis DNR išskyrimo rinkinys *Phalaris arundinacea* ir *Lythrum salicaria* netiko. Nors DNR koncentracijos buvo didelės, tačiau DNR mėginiai blogai atsiskirdavo atliekant agarozės gelio elektroforezę. Dėl šių priežasčių *Phalaris arundinacea* DNR išskyrimui buvo pasirinkta naudoti CTAB metodą be papildomo valymo.

## Išvados

Remiantis atliktais tyrimais nustatyta:

1. Trijų šeimų kai kurių natūraliai Lietuvos paupiuose augančių augalų rūšių DNR išskyrimui labiausiai tinkami metodai buvo skirtingi. *Phalaris arundinacea* DNR išskyrimui tinkamiausias buvo CTAB metodas. Gryniausia ir didelės koncentracijos *Echinocystis lobata* DNR gauta naudojant universalų gamyklinį Thermo Scientific rinkinį „Genomic DNA purification kit“ K0512. *Lythrum salicaria* DNR išskyrimui geriausia naudoti CTAB metodą, prieš tai valant sorbitolio buferiu.

2. DNR valymas kolonėlėmis (OneStep™ PCR Inhibitor Removal Kit) pagerino *Echinocystis lobata* DNR kokybę ir DNR kiekis išliko pakankamai didelis, tačiau *Lythrum salicaria* ir *Phalaris arundinacea* DNR valymas kolonėlėmis ženkliai sumažino išskirtos augalų DNR kiekį.

3. Optimaliausia DNR išskyrimui imti tiriamosios medžiagos kiekį, kuris siektų apie 50 mg *Phalaris arundinacea*, tuo tarpu *Echinocystis lobata* ir *Lythrum salicaria* – 100 mg.

## Padėka

LMT programos „Agro-, miško ir vandens ekosistemų tvarumas“ remiamas projektas „Antropogeninis poveikis kai kurių Lietuvos upių ekosistemų augalijos komponento stabilumui“ (SIT-02/2015).

## Literatūra

- ARIF, I. A., BAKIR, M. A., KHAN, A. H., AL FARHAN, H. A., AL HOMAIDAN, A. A., BAHKALI, A. H., AL SADOON, M., SHOBRAK, M. A Brief Review of Molecular Techniques to Assess Plant Diversity. *International Journal of Molecular Sciences*, 2010, Vol. 11, Iss. 5, p. 2079–2096.
- BEISMANN, H. AFLP analysis sheds light on distribution of two *Salix* species and their hybrid along a natural gradient. *Molecular Ecology*, 1997, Vol. 6, Iss. 10, p. 989–993.
- BOTSTEIN, D., WHITE R. L., SKOLNICK, M., DAVIS R. W. Construction of a genetic-linkage map in man using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *The American Journal of Human Genetics*, 1980, Vol. 32, Iss. 3, 314–331.
- BRAZAUSKAS, G., PASAKINSKIENE, I., JAHOOOR, A. AFLP analysis indicates no introgression of maize DNA in wheat x maize crosses. *Plant Breeding*, 2004, Vol. 123, Iss. 2, p. 117–121.
- CHUN, Y. J., NASON, J. D., MOLONEY, K. A. Comparison of quantitative and molecular genetic variation of native vs. invasive populations of purple loosestrife (*Lythrum salicaria* L., Lythraceae) *Molecular Ecology*, 2009, Vol. 18, Iss. 14, p. 3020–3035.
- DELLAPORTA, S. L., WOOD, J., HICKS, J. B. A Plant DNA Miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1983, Vol. 1, Iss. 4, p. 19–21.
- DEMEKE, T., JENKINS, R. G. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, Vol. 396, Iss. 6, p. 1977–1990.
- DOYLE, J. J., DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 1987, Vol. 19, Iss. 1, p. 11–15.
- DOYLE, J. J., DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 1990, Vol. 12, p. 3–15.
- JAKUBOWSKI, A. R., CASLER, M. D., JACKSON, R. D. Has selection for improved agronomic traits made reed canarygrass invasive? *PLoS ONE*, 2011, 6:e25757.
- JAKUBOWSKI, A. R., CASLER, M. D., JACKSON, R. D. Genetic evidence suggests a widespread distribution of native North American populations of reed canarygrass. *Biological Invasions*, 2013, Vol. 15, Iss. 2, p. 261–268.
- JOBES, D. V., HURLEY, D. L., THIEN, L. B. Plant DNA isolation: A Method to Efficiently Remove Polyphenolics, Polysaccharides, and RNA. *Taxon*, 1995, Vol. 44, Iss. 3, p. 379–386.
- JONES, N., OUGHAM, H., THOMAS, H., PAŠAKINSKIENĖ, I. Markers and mapping revisited: finding your gene. *New Phytologist*, 2009, Vol. 183, Iss. 4, p. 935–966.
- MCGREGOR, C. E., LAMBERT, C. A., GREYLING, M. M., LOUW, J. H., WARNICH, L. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. *Euphytica*, 2000, Vol. 113, Iss. 2, p. 135–144.
- NELSON, F. M., ANDERSON, O. N., CASLER, D. M., JAKUBOWSKI, R. A. Population genetic structure of N. American and European *Phalaris arundinacea* L. as inferred from inter-simple sequence repeat markers. *Biological Invasions*, 2014, Vol. 16, Iss. 2, p. 353–363.
- PARIS, H. S., YONASH, N., PORTNOY, V. Assessment of genetic relationships in *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae) using DNA markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, Vol. 106, Iss. 6, p. 971–978.

17. ROGERS, S. O., BENDICH, A. J. Extraction of DNA from plant tissues. *Plant Molecular Biology Manual*, 1988, p. 1–10.
18. RUGIENIUS, R., ŠIKŠNIANIENĖ, J. B., FRERCKS, B., STANIENĖ, G., STEPULAITIENĖ, I., HAIMI, P., STANYS, V. Characterization of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) cultivars and hybrid clones using SSR and AFLP markers. *Agriculture*, 2015, Vol. 102, Iss. 2, p. 177–184.
19. RUSSELL, A., SAMUEL, R., RUPP, B., BARFUSS, M. H. J. Phylogenetics and cytology of a pantropical orchid genus *Polystachya* (Polystachyinae, Vandaeae, Orchidaceae): Evidence from plastid DNA sequence data. *Taxon*, 2010, Vol. 59, Iss. 2, p. 389–404.
20. SAGHAI-MAROOF, M. A., SOLIMAN, K. M., JORGENSEN, R. A., ALLARD, R. W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1984, Vol. 81, Iss. 24, p. 8014–8018.
21. SAIKI, R. K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K. B., HORN, G. T., ERLICH, H. A., ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 1985, Vol. 230, Iss. 4732, p. 1350–1354.
22. SHARMA, A., NAMDEO, A. G., MAHADIK, K. R. Molecular Markers: New Prospects in Plant Genome Analysis. *Pharmacognosy Reviews*, 2008, Vol. 2, Iss. 3, p. 23–34.
23. STREFELER, M. S., DARMO, E., BECKER, R. L., KATOVICH, E. J. Isozyme Characterization of Genetic Diversity in Minnesota Populations of Purple Loosestrife, *Lythrum salicaria* (Lythraceae). *American Journal of Botany*, 1996, Vol. 83, Iss. 3, p. 265–273.
24. WARD, S. M., JASIENIUK, M. Review: sampling weedy and invasive plant populations for genetic diversity analysis. *Weed Science*, 2009, Vol. 57, Iss. 6, p. 593–602.
25. WILLIAMS, G. K., KUBELIK, A. R., LIVAK, J., RAFALSKI, J. A., TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 1990, Vol. 18, Iss. 22, p. 6531–6535.
26. XU, D., ABE, J., GAI, J., SHIMAMOTO, Y. Diversity of chloroplast DNA SSR in wild and cultivated soybeans: evidence for multiple origins of cultivated soybean. *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, Vol. 105, Iss. 5, p. 645–653.
27. ZIETKIEWICZ, E., RAFALSKI, A., LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 1994, Vol. 20, Iss. 2, p. 176–183.

Erika Juškaitytė, Edvina Krokaitė, Lina Jocienė, Algimantas Paulauskas, Eugenija Kupčinskienė

#### Methodical aspects of molecular studies of some riparian plant species

##### Summary

A large part of the land falling within a range of several pollutants are washed away and finally carried to lakes, streams and rivers. In addition to chemical pollution riparian vegetation is affected by severe human physical penetration. Data concerning health of aquatic plants are not abundant in Lithuania. In addition to traditional assessment based on morphology, physiology, modern plant diversity studies include molecular genetics techniques, where markers of the nucleus, chloroplast or mitochondrial DNA are employed. The first step in the application of these markers is extraction of high quality DNA. DNA extraction methods are perfectly developed and thoroughly described for cultivated plant species, their varieties. Population studies concerning genetic diversity of naturally growing plant species are not numerous. In many cases DNA extraction methods for these plants are presented in very general way, without more detailed methodological descriptions. The most frequently mentioned methods for plant DNA extraction are techniques employing cetyltrimethylammonium bromide, sodium dodecyl sulfate and big variety of ready-use DNA extraction kits of unknown composition. Our study is aimed at selection of DNA extraction methods for some naturally growing riparian plant species of *Cucurbitaceae*, *Lythraceae* and *Poaceae* (*Aveneae* tribe) spread in Nemunas basin. For several species selected the most efficient DNA extraction methods were different despite close vicinity of habitats.

*DNA, CTAB, Cucurbitaceae, Lythraceae, Poaceae*

*Gauta 2016 m. kovo mėn., atiduota spaudai 2016 m. balandžio mėn.*

---

**Erika JUŠKAITYTĖ.** Vytauto Didžiojo universiteto Gamtos mokslų fakulteto Biologijos katedra, biologijos bakalaurė studentė. Adresas: Vileikos g. 8, LT-44404, Kaunas. Tel. 865811801, El. Paštas: erikajuskaityte@gmail.com  
**Erika JUŠKAITYTĖ.** Vytautas Magnus University Faculty of Nature Sciences, Department of Biology, BSc. student in Biology. Address: Vileikos g. 8, LT-44404, Kaunas. Tel. (+370) 65811801, e-mail: erikajuskaityte@gmail.com  
**Edvina KROKAITĖ.** Vytauto Didžiojo universiteto Gamtos mokslų fakulteto, Biologijos katedros specialistė, bakalaurė, magistrantūros studentė. Adresas: Vileikos g. 8, LT-44404, Kaunas. Tel. 868541426, El. Paštas: edvina.krokaite@gmail.com  
**Edvina KROKAITĖ.** Vytautas Magnus University Faculty of Nature Sciences Department of Biology, BSc. in Biology, MSc student. Address: Vileikos g. 8, LT-44404, Kaunas. Tel. (+370) 68541426, e-mail: edvina.krokaite@gmail.com  
**Lina JOCIENĖ.** Didžiojo universiteto Gamtos mokslų fakulteto Biologijos katedros biomedicinos mokslų daktarė. Adresas: Vileikos g. 8, LT-44404, Kaunas. Tel. 861590789, El. Paštas: lina.zybartaitė@gmail.com  
**Lina JOCIENĖ.** Vytautas Magnus University Faculty of Nature Sciences Department of Biology, dr. Address: Vileikos g. 8, LT-44404, Kaunas. Tel. (+370) 61590789, e-mail: lina.zybartaitė@gmail.com  
**Algimantas PAULAUSKAS.** Vytauto Didžiojo universiteto Gamtos mokslų fakulteto Biologijos katedros profesorius, biomedicinos mokslų daktaras. Adresas: Vileikos g. 8, LT-44404, Kaunas. Tel. 861461805, El. Paštas: a.paulauskas@gmf.vdu.lt  
**Algimantas PAULAUSKAS.** Vytautas Magnus University Faculty of Nature Sciences Department of Biology sciences, professor, dr. of biomedical sciences. Address: Vileikos g. 8, LT-44404, Kaunas. Tel. (+370) 61461805, e-mail: a.paulauskas@gmf.vdu.lt  
**Eugenija KUPČINSKIENĖ.** Vytauto Didžiojo universiteto Gamtos mokslų fakulteto Biologijos katedros profesorė, habil. dr. biomedicinos mokslų daktarė. Adresas: Vileikos g. 8, LT-44404, Kaunas. Tel. 861223391, El. Paštas: e.kupcinskiene@gmail.com  
**Eugenija KUPČINSKIENĖ.** Vytautas Magnus University Faculty of Nature Sciences Department of Biology, professor, dr. habil. Address: Vileikos g. 8, LT-44404, Kaunas. Tel. (+370) 61223391, e-mail: e.kupcinskiene@gmail.com