

Kur slepiasi reliktnių 11 000 tūkstančių metų senumo rytinės Baltijos jūros pakrantės paprastosios pušies populiacijų palikuonys?

**Akad. Darius Danusevičius¹, akad. Vladas Žulkus²,
dr. Jurata Buchovska¹**

¹Vytauto Didžiojo universitetas, ²Klaipėdos universitetas

Išvadas

Šis tyrimas – tai puikus kelių universitetų archeologų ir genetikų tarpdalykinio bendradarbiavimo pavyzdys. Klaipėdos universiteto archeologai, vadovaujami akad. Vlado Žulkaus, Baltijos jūroje apie 12 km nuo Juodkrantės kranto aptiko pušies medžių stiebus ir kelmus (1 pav.). Anglies izotopo irimo datavimo metodu nustatyta, kad šie jūroje rasti pušies medžiai augo apie 9 000 m. pr. Kr. Todėl tikėtina, kad jie yra vieni pirmųjų paprastosios pušies (*Pinus sylvestris* L.) poledynmetinės migracijos genofondo atstovų, genetiškai artimi pirmosiomis į rytinį Baltijos jūros ir pietų Skandinavijos regioną išplitusiomis paprastosios pušies populiacijoms ir miško genetikams prilygstantys dinozaurų atradimui! Taigi, koks įvairus yra istorinių-reliktnių pušų dinozaurų – genofondas, kokie jų giminystės ryšiai, šeimų dydžiai, poravimosi dėsningumai ir, svarbiausia, kurios dabartinės Lietuvos paprastosios pušies populiacijos ir kaip stipriai išlaikę šį senąjį genofondą (2–4 pav.). Ar dabartinės Juodkrantės sengirės pušys išsaugojo senųjų pušų genofondą? Pavykus ištirti šias genetines sąsajas su dabartinėmis paprastosios pušies populiacijomis, nieko nereikėtų atkūrinėti kaip fantastiniame trileryje „Jūros periodo parkas“ – turėtumėme gyvus senovinių pušų giminaičius. Šios idėjos pradėjo suktis Vytauto Didžiojo universiteto Miškų ir ekologijos fakulteto Miško medžių genetikos tyrėjų grupės vadovo akad. Dariaus Danusevičiaus galvoje.

Ši mokslininkų grupė turi nemažos patirties tiriant medžių evoliucinę genetiką ir medžių genetinę įvairovę DNR lygmeniu, pagal DNR žymenis yra ištyrę Lietuvos ir užsienio šalių papr. pušies populiacijas ir sukūrę plačią jų kilmės DNR duomenų bazę, pagal kurią galima nustatyti rastos pušies medienos kilmės regioną. DNR žymenys, ypač genominiai mikrosatelitai, yra galingas DNR lygmeniu genetines sąsajas nustatantis įrankis. Po diskusijų su Klaipėdos universiteto kolegomis, buvo suformuluotos tyrimų idėjos – ištirti jūroje rastų pušų poledynmetinės kilmės šaltinius ir sąsajas su dabartinėmis papr. pušies populiacijomis. Tai labai svarbūs tyrimai evoliucinės genetikos specialistams, siekiantiems ištirti, kaip plito ir kaip genetiškai skiriasi mūsų miško medžių genofondas, nustatyti genetiškai vertingas populiacijas.



1 pav. Baltijos jūros dugne rastas pušies medžio keltas (V. Žulkaus nuotr.). Skaitykite daugiau: <https://www.delfi.lt/mokslas/mokslas/archeologas-lietuvos-praeiti-bando-isnarplioti-nerdamas-po-vandeniui-baltijos-juros-dugne-slypi-salies-paslaptys.d?id=81980399>

Jūrinės pušies DNR išskyrimė iš medienos pagal specialiai tam mūsų adaptuotus DNR išskyrimo protokolus. Registravome DNR koncentraciją, PGR fragmentų aukščius, kiekvienam pavyzdžiui atlikome po 5 pakartojimus, kiekvieną individą analizavome atskiroje PGR reakcijoje specialioje nuo aplinkos gerai izoliuotoje PGR kameroje ir izoliuotoje patalpoje, kurioje nėra atliekami genetiniai tyrimai. PGR kartu leidome tuščius mėginius, kad būtų galima testuoti amplifikuotų fragmentų patikimumą ir į duomenų analizę buvo paimti tik patikimi aleliai (amplifikacijos stiprumas reikšmingai didesnis nei atsitiktinis, sukeltas foninių amplikonų) ir tik patvirtinti pakartojimais. Siekiant ištirti jūroje netoli Juodkrantės rastų pušų genetinį panašumą su dabartiniu metu augančiomis papr. pušies populiacijomis pagal DNR žymenis buvo naudojamas Bajeso genetinio priskyrimo algoritmas specialia genetinių tyrimų programa GeneClass2 (Rannala and Mountain 1997). Genetinio priskyrimo tikimybės testuotos 10 000 Monte Karlo randomizacijų pagal Paetkau ir kt. (2004) algoritmą. Atlikta dviejų jūroje rastų papr. pušies individų RF_IB_OK2A ir RF_IB_OK2B genetinio priskyrimo dabartinėms Lietuvos populiacijoms analizė. Palyginimui pagal DNR ištirtos 25 Lietuvos papr. pušies populiacijos po 25–50 medžių iš populiacijos, iš viso 657 medžiai (1 lent., 2–4 pav.). Tais pačiais DNR žymenimis genotipuoti anksčiau minėti du jūroje rasti papr. pušies individai. Priskyrimo tyrimui naudoti genominiai mikrosatelitų DNR žymenis. Lokusų skaičius – 10.



2 pav. Žievės morfotipu išsiskiriančios papr. pušys kerpinėje augavietėje Marcinkonių papr. pušies genetiniame draustinyje



3 pav. Kairėje – savitu žievės morfotipu pasižyminčios ilgaamžės Punios Nemuno kilpos populiacijų p. pušys (amžius 200–300 metų). Dešinėje – kitokios „vėžlio kiaušto“ žievės formos p. pušys Juodrantės sengirėje (amžius apie 200–300 metų).

Papildomai testavome hipotezę, kad pirmųjų holoceno pušies populiacijų genofondas galėjo didesne apimtimi išlikti mažiau ūkinei veiklai patraukliuose augavietėse, pvz., pelkėse ar savituose, ar būti sukauptas ūkine prasme menkaverčiuose morfotipuose – kreivi, daugiastiebiai, bet gyvybingi medžiai, kurių morfotipinis ypatumas nėra lemtas pažeidimų ar ligų (6 pav.). Mūsų neseniai atlikti tyrimai parodė, kad pelkėse formuojasi savitas papr. pušies genofondas dėl silpnos ūkinės veiklos įtakos ir fenologinių skirtumų. Iš viso genotipavome 53 tokius daugiastiebius medžius ir 50 šalia augančių tiesių vienastiebių morfotipų Dzūkijos NP teritorijoje. Jūroje rastų pušų sąsajoms su pelkėje augančiu papr. pušų genofonu testuoti, genotipavome po 50 pelkėje augančių papr. pušies medžių ir 50 netoliese nuo atitinkamos pelkės augančių normalaus drėkinimo augavietėje papr. pušies individų trijose Lietuvos pelkėse Čepkeliai (pietų Lietuva), Bargailiai (centrinė Lietuva) ir Kamanos (šiaurinė Lietuva). Be to, Čepkelių pelkėje aptikome savitus pušies morfotipus pelkėje esančioje saloje, todėl atrinkome DNR žymenų tyrimui ir genotipavome 25 Čepkelių salos papr. pušies individus.



4 pav. Kairėje – savitos Žemaitijai „egležievio“ morfotipo p. pušys Plungės girininkijoje. Dešinėje – Veisėjų Ančios genetinio draustinio p. pušis, viena iš genetiškai stipriausiai susijusių su jūroje rastomis pušimis.

1 lentelė. Genetiniam priskyrimui naudotų Lietuvos papr. pušies populiacijų kilmės vietos ir medžių skaičius

Populiacija	Long.	Lat.	Medžių skaičius	Jūrinės pušies individo RFIB2OKA priskyrimo tikimybė
ANCI	23,66721	54,08405	19	0,472
AZVI	26,03584	55,46754	20	0,191
BARG	23,45353	55,49002	47	0,104
BRAZ	23,43601	54,76620	50	0,425
CIAP	24,45519	54,02410	50	0,494
DARB	21,42073	56,01161	17	0,276
GEГУ	24,51172	55,80243	20	0,279
JUOD	21,11488	55,52645	19	0,239
KAMA	22,58897	56,27021	50	0,372
LABA	25,85967	55,19655	21	0,081
MIKE	25,18647	55,67154	20	0,490
MOCI	22,23994	55,10132	4	0,054
NORK	21,53281	55,44790	3	0,001
PAGE	21,90091	55,14596	20	0,281
PLUN	21,67079	56,01509	20	0,274
PUNI	24,07702	54,53224	19	0,553
SALA	26,21100	55,82984	20	0,513
SVEK	21,44141	55,51897	20	0,187
TRAK	24,83398	54,55192	19	0,046
TRYS	22,60041	55,99533	19	0,059
VAIS	24,10089	54,82318	20	0,116
VARN	22,49134	55,71269	21	0,161
VEIS	23,84428	54,07806	20	0,698
VIES	22,41296	55,08369	3	0,001



5 pav. Prof. D. Danusevicius, dokt. R. Kembrytė ir dr. J. Buchovska ties Čepkelių pelke, kur tolumoje matyti sala, su išsiskiriančiais apr. pušies morfotipais.

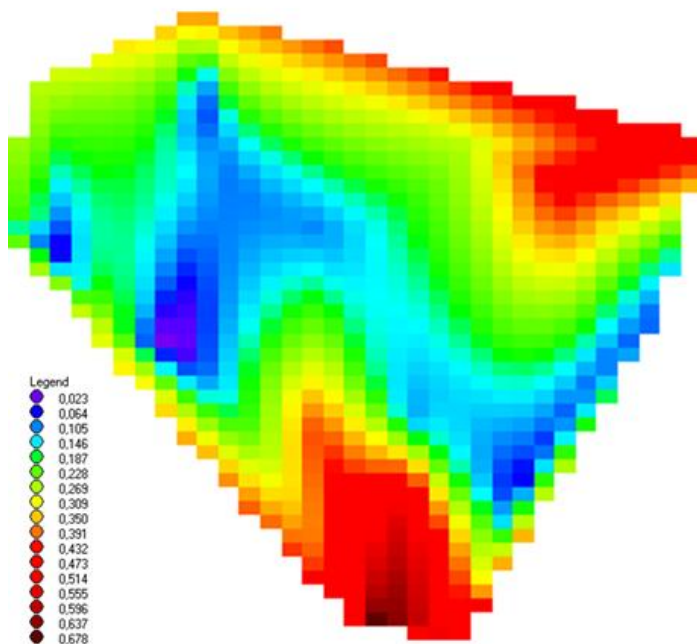
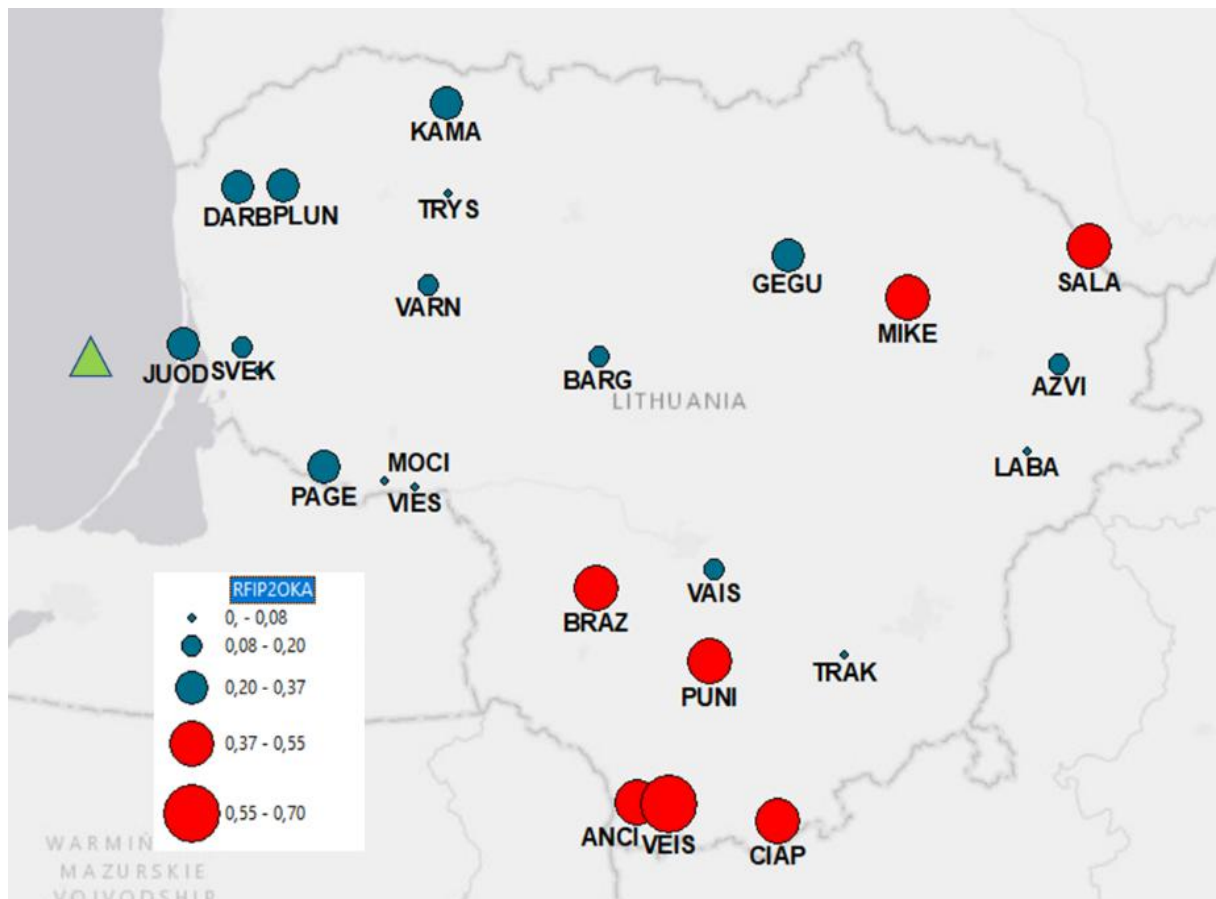


6 pav. Daugiastiebiai apr. pušies morfotipai Dzūkijos miškuose, tirti siekiant testuoti hipotezę, kad pirmųjų holoceno pušies populiacijų genofondas galėjo didesne apimtimi išlikti mažiau ūkinei veiklai patraukliuose augavietėse, pvz., pelkėse ar savituose, ar būti sukauptas ūkine prasme menkaverčiuose morfotipuose – kreivi, daugiastiebiai, bet gyvybingi medžiai.

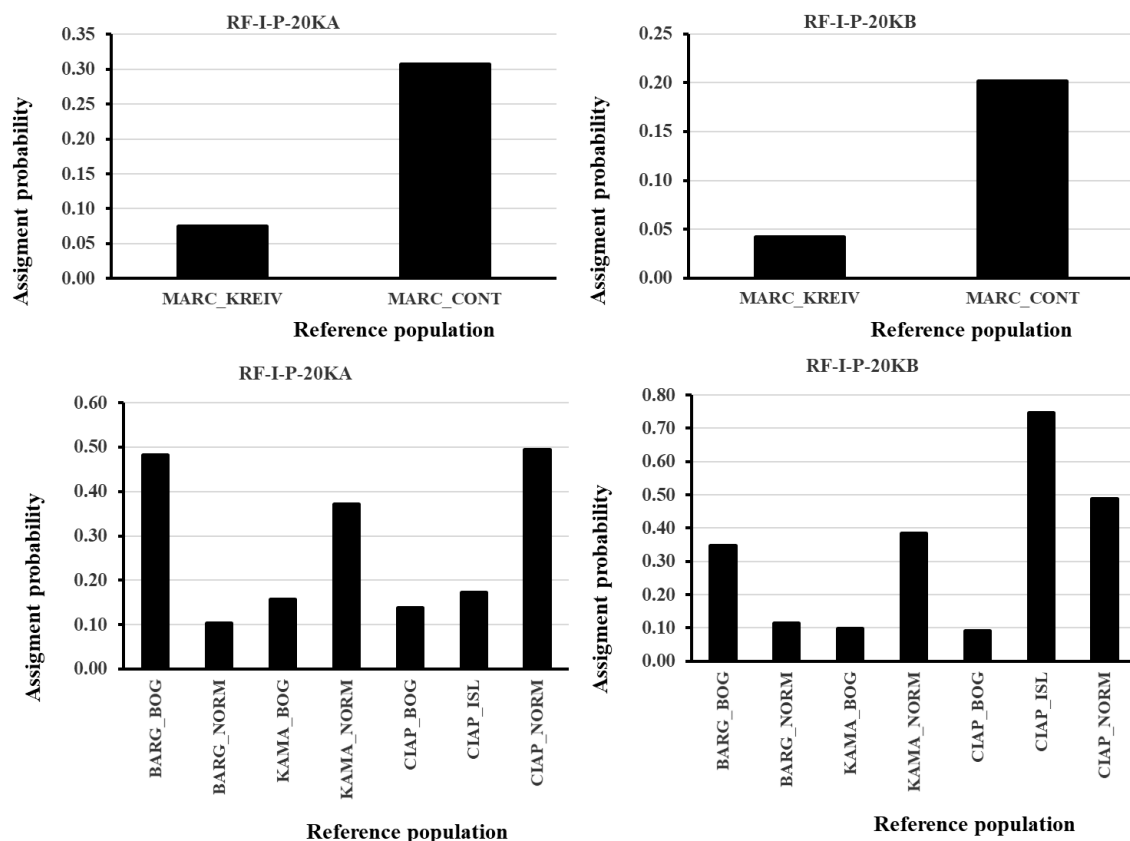
Rezultatai

Motininio paveldėjimo mitochondrinės DNR tyrimas parodė, kad jūroje rastos pušys yra vadinamojo A mtDNR tipo, t. y. išplito iš pietuose esančių LGM prieglobsčio šaltinių, kas sutampa su visuotinai priimtina pirminio papr. pušies plitimo bangos iš Pietų Europos versija. Po to sekė migracijos bangos B mtDNR tipo pušų iš dabartinės Ukrainos rytinės dalies ir aplinkinių regionų.

Bajeso genetinio priskyrimo analizė parodė, kad jūroje rasti pušies individai RF_I_BOK2A ir RF_I_BOK2B stipriausiai genetiškai siejosi su pietų Lietuvos papr. pušies populiacijomis (7 pav.). Svarbu pažymėti, kad šios sąsajos dėsningos, nes aukštos genetinio priskyrimo tikimybės ($>0,5$) buvo visoms penkioms pietų Lietuvos populiacijoms, o Veisėjų populiacijai genetinio priskyrimo tikimybė net viršijo 0,7 (7 pav.). Kiekvienai referencinei pietų Lietuvos papr. pušies populiacijai atstovavo 25–50 medžių grupė, kas padidina priskyrimo statistinį patikimumą. Dzūkijoje vyrauja nederlingos Nae augavietės ir kerpsilio pušynai, prisitaikę augti nederlinguose priesmėlio dirvožemiuose. Čia galima ieškoti šių asociacijų priežastingumo, nes holoceno periodo metu temperatūra buvo aukštesnė, o pajūryje taip pat vyravo smėlio-priesmėlio dirvožemiai. Taip pat santykinai aukštesnės priskyrimo tikimybės rastos Mikėrių ir Salako populiacijoms.



7 pav. Viršuje – Baltijos jūroje rastos 11 000 metų amžiaus pušies individo RF_IP_20KA genetinio priskyrimo dabartinėms Lietuvos papr. pušies populiacijoms tikimybių geografinis pasiskirstymas. Daugumai Lietuvos populiacijų atstovavo 25–50 medžių. Genetinė priskyrimo tikimybė svyruoja nuo 0 iki 1. Raudonai pažymėtos genetinės priskyrimo tikimybės aukštesnės nei 0,5, kas rodo reikšmingas genetines asociacijas. Kairėje – genetinių priskyrimo tikimybių interpoliuotų erdvinių reikšmių kontūrinis žemėlapis.



8 pav. Jūroje rastų pušies individų RF_IP_20KA (kairėje) ir RF_IP_20KB (dešinėje) Bajeso genetinio priskyrimo tikimybės daugiastiebiams papr. pušies morfotipams ir šalia augančiai kontrolei (Dzūkija, viršuje) ir pelkinėms populiacijoms (apačioje). Kiekvienai Lietuvos populiacijai atstovavo 25–50 medžių. Priskyrimo tikimybės maksimali reikšmė yra 1, o tikimybė, viršijanti 0,5, rodo reikšmingas genetines sąsajas. X ašyje BOG – pelkė, NORM – normalaus drėkinimo režimo augavietės medžių grupė. BARG – Bargaliai, KAMA – Kamanos, CIAP – Čepkeliai.

Įdomu, kad Juodkrantės sengirės populiacijos panašumas su jūroje rastais pušies medienos pavydžiais buvo mažesnis. Interpoliuotų genetinio priskyrimo tikimybių erdvinis kontūrinis žemėlapis leidžia daryti hipotetines prielaidas, kad pirmo poledynmetiniu plitimo bangos populiacijos buvo atskirtos vėlesnių migracijos bangų tarpais ir išliko specifinėse adaptacinėse aplinkose, tokiose kaip Dzūkijos smėlynai. Ištyrėme tik du jūroje rastus pušies individus, todėl rezultatus pristatome kaip pirminius.

Palyginus jūrinės medienos ir pelkinių papr. pušies populiacijų genetines sąsajas gautirezultatai parodė, kad jūrinės pušies genetinio priskyrimo tikimybės pelkinės pušies populiacijoms buvo reikšmingai mažesnės nei gretimai augančioms normalus drėkinimo režimo augaviečių populiacijoms visose trijose Lietuvos pelkėse (8 pav.). Panašiai ir dėl Dzūkijoje rastų daugiastiebių papr. pušies morfotipų – genetinės priskyrimo tikimybės daugiastiebiams papr. pušies morfotipams buvo žymiai mažesnės nei gretimoms vienastiebių papr. pušies medžių grupėms (8 pav.). Todėl darome išvadą, kad jūrinė pušis genetiškai nesisieja nei su pelkine, nei su daugiastiebe pušimi. Tačiau buvo viena įdomi išimtis – Čepkelių pelkės saloje auganti

nedidelė ilgaamžių pušų grupė, kuriai vienas iš jūroje rastų individų buvo priskirtas net su 0,7 tikimybe (8 pav.).



8 pav. Kairėje – Čepkelių salos papr. pušies medžių grupė, turinti stiprias genetines asociacijas su jūroje rastu 11 000 metų amžiaus papr. pušies individų (genetinio priskyrimo tikimybė $>0,7$). Įdomu, kad aplinkui salą augančios pelkinio morfotipo papr. pušys, priešingai nuo saloje augančių, nebuvo labai susijusios su jūroje rastomis pušimis (dešinėje).

Literatūros sąrašas

1. Rannala, B. and J. L. Mountain (1997) Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 9197-9221.
2. Paetkau, D. et al. (2004) Direct, real-time estimation of migration rate using assignment methods: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Mol. Ecol.* 13:55-65.