



Fizioloģiskie un ģenētiskie aspekti Igaunijas rūgtlapes (*Saussurea esthonica*) saglabāšanā

**Promocijas darbs
bioloģijas doktora zinātniskā grāda iegūšanai
augu fizioloģijas apakšnozarē**

Darba autors: Agnese Gailīte
Darba vadītājs: *Dr. hab. biol.*, prof. Ģederts Ieviņš
Zinātniskie konsultanti: *Dr. biol.* Dace Kļaviņa
Dr. biol. Dainis Ruņģis

Rīga 2012



EIROPAS SAVIENĪBA



LATVIJAS
UNIVERSITĀTE
ANNO 1919

IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ

Šis darbs izstrādāts ar Eiropas Sociālā fonda atbalstu projektā «Atbalsts doktora studijām Latvijas Universitātē»

KOPSAVILKUMS

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Valsts mežzinātnes institūtā „Silava”. Darba mērķis bija veikt kompleksu pētījumu par Igaunijas rūgtlapes (*Saussurea esthonica* Baer ex Rupr.) bioloģiju, kas ietver *in vitro* kultūru, fizioloģiju, reprodukciju, ģenētisko izpēti, tā rezultātā iegūstot izpratni par aizsargājamo sugu saglabāšanai nepieciešamo bioloģiskās informācijas apjomu un izmantojamām pieejām. Lai netraucētu dabīgo populāciju, reto sugu izpētei ir svarīgi izmantot nedestruktīvās analīzes metodes. Reto augu sugu saglabāšanai paralēli saglabāšanai *in situ* nepieciešama arī *ex situ* saglabāšanas metožu optimāla izvēle un izmantošana. Augus eksperimentiem iespējams izaudzēt *in vitro* un pēc tam tos izmantot turpmākajos pētījumos, tādējādi neapdraudot dabisko populāciju. Pētot citokinīnu ietekmi uz Igaunijas rūgtlapes proliferāciju un rizoģenēzi *in vitro* konstatēts, ka BAP ir optimāls proliferācijas inducēšanai, savukārt 2-iP veicina sakņu veidošanos. Lai izprastu sugas pastāvēšanu apdraudošos faktorus, ar nedestruktīvām metodēm dabiskos apstākļos pētīta vides ietekme uz fotosintēzi raksturojošajiem parametriem. Tā kā Igaunijas rūgtlape aug kaļķainos zāļu purvos vai pļāvās, tad kontrolētos apstākļos analizēta substrāta sastāva un mitruma ietekme uz fotosintēzes fotoķīmiju, tādējādi izslēdzot pārējo vides faktoru ietekmi. Reprodukcija ir viens no galvenajiem faktoriem, kas nodrošina sugas pastāvēšanu. Igaunijas rūgtlapei raksturīga gan ģeneratīvā, gan veģetatīvā vairošanās, pie kam viens augs var veidot vairākus jaunus dzinumus, kas ir svarīgi sugas pastāvēšanai, tā kā sēklu kvalitāte ir zema. Apstrāde ar GA_3 vai KNO_3 uzlabo sēklu dīgtspēju. Lai prognozētu sugas spēju pielāgoties mainīgiem vides apstākļiem un līdz ar to izdzīvot ilglaicīgi, pētīta ģenētiskā daudzveidība starp Latvijas populācijām un populācijām Latvijā un Igaunijā. Abās Latvijas populācijās ģenētiskā daudzveidība ir nedaudz augstāka nekā pētītajās populācijās Igaunijā, lielākā daudzveidība bija vērojama populāciju iekšienē. Igaunijas rūgtlapei salīdzināja ar astoņām citām *Saussurea* sugām, t.sk., trim Eiropas sugām – *S. alpina*, *S. pygmaea* un *S. discolor*, izmantojot divas molekulāro marķieru tehnikas, un konstatēja, ka *S. esthonica* veido klasteri ar *S. discolor* un *S. alpina*, tādējādi norādot uz radniecību starp šīm sugām.

ABSTRACT

The research described in the doctoral thesis has been carried out at the Latvian State Forest Research Institute „Silava”. The aim of the research was to undertake a comprehensive study on the biology of Estonian saw-wort (*Saussurea esthonica* Baer ex Rupr.) in order to obtain biological information and to elucidate approaches for conservation of this endangered species. It is important to use nondestructive methods of analysis for investigation of rare plant species in natural conditions. The research examined *in vitro* culture, physiology, reproduction and genetic analyses. Parallel to *in situ* protection, development and application of *ex situ* conservation strategies should be undertaken. It is possible to propagate plants *in vitro* for use in experimental research to avoid damaging natural populations. *In vitro* culture experimental results showed that BAP is the optimal cytokinin for proliferation *in vitro*, however 2-iP promotes root formation. For determining the main factors which affect species survival in natural populations, research about the influence of environmental factors on photosynthesis related parameters was performed with non-destructive methods. Estonian saw-wort is a species found in calcareous wet meadows and fens, therefore changes in growth and photochemistry of photosynthesis with respect to mineral nutrition and soil moisture in controlled conditions were investigated. Reproductive success is one of the factors which affects species and population viability. Estonian saw-wort can propagate both generatively and vegetatively and may produce several new shoots per plant promoting vegetative propagation. This is important for species survival because seed quality is low. Treatment with GA_3 or KNO_3 promoted germination. To estimate the ability of this species to adapt to changing environmental conditions and to maintain long term viability, genetic diversity among and within populations in Latvia and Estonia was estimated. Latvian populations have a relatively high level of genetic diversity and most of genetic variation was found within populations. Investigation of the phylogenetic relationship of *S. esthonica* with eight other *Saussurea* species, including three European species: *S. alpina*, *S. pygmaea* and *S. discolor*, utilising two different molecular marker techniques showed that *S. discolor* and *S. alpina* formed one cluster with *S. esthonica*. The results from this investigation support a close relationship between these species.

SATURS

DARBĀ IZMANTOTIE SAĪSINĀJUMI	6
IEVADS	7
1. LITERATŪRAS APSKATS	9
1.1. Sugas vispārīgais raksturojums un stāvoklis Latvijā	9
1.2. Populāciju izmēra saistība ar ģenētisko daudzveidību, demogrāfiskajiem un vides procesiem	10
1.3. <i>In vitro</i> kultūras apdraudēto sugu saglabāšanai <i>ex situ</i>	12
1.4. Fotosintēzes pigmenti un fotoķīmiskās reakcijas	15
1.4.1. Augu fotosintēzes pigmenti	15
1.4.2. Fotosintēzes fotoķīmiskās reakcijas	15
1.5. Ar fotosintēzi saistītās pazīmes kā indikatori sugas atbildei uz vides faktoriem	18
1.5.1. Hlorofila satura izmaiņas	18
1.5.2. Hlorofila <i>a</i> fluorescences rādītāji un to izmaiņas	19
1.6. Vides faktoru ietekme uz savvaļas augu augšanu un attīstību	20
1.6.1. Augsnes sastāva (minerālelementu) ietekme	21
1.6.1.1. Augiem nepieciešamie minerālelementi	21
1.6.1.2. Minerālelementu nepietiekamība un pārbagātība	23
1.6.1.3. Kalcifilo augu adaptācija videi	24
1.6.2. Sausuma ietekme uz fotosintēzi raksturojošajiem parametriem	24
1.6.3. Mitruma ietekme uz fotosintēzi raksturojošajiem parametriem	25
1.7. Savvaļas augu sēklu dīgšana un to noteicošie faktori	26
1.7.1. Sēklu kvalitāte un izmērs	26
1.7.2. Sēklu miera periods	27
1.8. Veģetatīvā vairošanās	30
1.9. Molekulāro marķieru tehnikas un to pielietojums augu bioloģijas pētījumos	30
1.9.1. Amplificēto fragmentu garuma polimorfisms (AFLP)	31
1.9.2. Starppraimeru piesaistes rajoni (iPBS)	32
1.9.3. Iekšējie transkribētie rajoni (ITS)	32
2. MATERIĀLS UN METODEDES	33
2.1. <i>Saussurea esthonica</i> bioloģijas raksturošanā ietvertie pētījumi	33
2.2. Pētījumu vietas un apstākļi	33
2.3. Pētījumi <i>in vitro</i> kultūrā	36
2.3.1. Dažādu <i>Saussurea</i> sugu dīgšanas spēja	36
2.3.2. Citokinīnu ietekme uz <i>S. esthonica</i> proliferāciju un rizoģenēzi	37
2.4. Ekofizioloģiskie pētījumi	37
2.4.1. Izmantotie mēraparāti un noteiktie parametri	37
2.4.2. Pētījumi dabiskos apstākļos	38
2.4.3. Eksperimenti kontrolētos apstākļos	38
2.4.3.1. Minerālvielu sastāva ietekme	38
2.4.3.2. Mitruma režīma ietekme	39
2.5. Reprodukcija	40
2.5.1. Dīgšanas spējas pētījumi	40

2.5.2. Veģetatīvās vairošanās izvērtējums	41
2.6. Ģenētiskās daudzveidības salīdzinājums un <i>Saussurea</i> ģints filoģenētiskā analīze	41
2.6.1. <i>S. esthonica</i> Latvijas populāciju ģenētiskā daudzveidība	41
2.6.2. Latvijas un Igaunijas populāciju ģenētiskās daudzveidības salīdzināšana	42
2.6.3. Vairāku <i>Saussurea</i> ģints sugu filoģenētiskais salīdzinājums	42
3. REZULTĀTI	44
3.1. <i>In vitro</i> kultūras sugas saglabāšanai un izpētei	44
3.1.1. <i>Saussurea</i> sugu dīgtspēja <i>in vitro</i>	44
3.1.2. Dažādu citokinīnu ietekme uz augu kultivēšanu <i>in vitro</i>	44
3.2. Ar fotosintēzi saistīto rādītāju izmantošana fizioloģiskajos pētījumos	47
3.2.1. Pētījumi dabiskos apstākļos	47
3.2.2. Augsnes minerālelementu satura ietekme uz fotosintēzes rādītājiem	51
3.2.3. Mitruma ietekme uz fotosintēzes rādītājiem	53
3.3. Sēklu dīgtspēja	56
3.4. Veģetatīvās vairošanās potenciāls	59
3.5. Molekulāri ģenētiskā izpēte	60
3.5.1. Daudzveidība Latvijas populācijās	60
3.5.2. Daudzveidība starp populācijām Latvijā un Igaunijā	61
3.5.3. Dažādu <i>Saussurea</i> sugu salīdzinājums	63
3.5.3.1. ITS sekvenēšana	63
3.5.3.2. iPBS marķieru analīze	65
3.5.3.3. <i>S. esthonica</i> taksonomiskā radniecība ar <i>S. alpina</i> un <i>S. discolor</i>	65
4. DISKUSIJA	67
4.1. <i>In vitro</i> kultūras sugu saglabāšanai <i>ex situ</i>	67
4.2. Ekofizioloģiskie pētījumi dabiskajos apstākļos	68
4.3. Minerālelementu sastāva ietekme kontrolētos apstākļos	70
4.4. Mitruma ietekme kontrolētos apstākļos	72
4.5. Vairošanās potenciāls	74
4.6. Molekulāri ģenētiskā izpēte	76
4.7. Sugas ilgtermiņa saglabāšana un citu apdraudēto sugu stratēģijas izstrāde	78
SECINĀJUMI	80
AIZSTĀVĒŠANAI IZVIRZĪTĀS TĒZES	81
PATEICĪBAS	82
LITERATŪRAS SARAKSTS	83

DARBĀ IZMANTOTIE SAĪSINĀJUMI

ABS – abscīzskābe

AFLP – amplificēto fragmentu garuma polimorfisms (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)

BAP – 6-benzilaminopurīns (BA, benziladenīns)

BD – botāniskais dārzs

CF – hlorofila fluorescences (*chlorophyll fluorescence*)

HBU – universitātes botāniskais dārzs (*Hortus Botanicus Universitatis*)

GA₃ – giberelskābe

KNO₃ – kālija nitrāts

IES – indol-3-etilkskābe

iPBS – starp-praīmeru piesaistes rajoni (*inter-Primer Binding Sites*)

ITS – iekšējie transkribētie rajoni (*internal transcribed spacer*)

MD – morfoloģiskais sēklu miera periods (*morphological dormancy*)

MPD – morfofizioloģiskais sēklu miera periods (*morpho-physiological dormancy*)

MgCl₂ – magnija hlorīds

NES – α-naftiletilkskābe

PCR – polimerāzes ķēdes reakcija (*Polymerase Chain Reaction*)

PD – fizioloģiskais sēklu miera periods (*physiological dormancy*)

PI – *Performance Index*

PS I – fotosistēma I (*photosystem I*)

PS II – fotosistēma II (*photosystem II*)

PY – fiziskais sēklu miera periods (*physical dormancy*)

rDNS – ribosomālā DNS

2-iP – N6-(delta 2-izopentenil)-adenīns

U – vienība (*unit*)

Ievads

Pastāv viedoklis, ka globālo klimata izmaiņu gaitā pasaulē var pazust 20 līdz 30% no šobrīd zināmajām sugām un iespējama vietējo sugu biotopu samazināšanās. Līdz ar to, rodas ģenētiskās erozijas draudi. Lai tos novērstu, nepieciešami pētījumi, kas palīdzētu izprast notiekošos procesus dabā un veikt nepieciešamos pasākumus bioloģiskās daudzveidības saglabāšanai gan ekosistēmas, gan starpsugu, gan populāciju līmenī. Starptautiski atzītā un Latvijas Republikā ar likumu pieņemtā Konvencija „Par bioloģisko daudzveidību”, „Sugu un biotopu aizsardzības likums” un „Bioloģiskās daudzveidības nacionālā programma” ir galvenie dokumenti bioloģiskās daudzveidības saglabāšanas plānošanai, kas nosaka nepieciešamību saglabāt savvaļas sugas, un viens no tajos noteiktajiem pamatuzdevumiem ir globālās bioloģiskās daudzveidības saglabāšana, izpēte un izmantošana.

Lai izprastu ģenētiskos un ekoloģiskos faktorus, kas apdraud reto sugu pastāvēšanu, ir svarīgi noteikt populāciju ģenētisko daudzveidību, sugas reprodukcijas spēju, kā arī vides ietekmi uz populācijas saglabāšanos ilgtermiņā. Jāņem vērā, ka lielai daļai vaskulāro augu atkarībā no sugas ir iespējama gan ģeneratīvā, gan veģetatīvā vairošanās.

Savvaļas augu īpatņu saglabāšanai ir divi galvenie veidi – aizsardzība to dabiskajās augšanas vietās (*in situ*) un saglabāšana ārpus tām (*ex situ*). Aizsardzība *in situ* ir galvenais saglabāšanas veids, taču īpašos gadījumos var būt nepieciešami arī sugu aizsardzības un saglabāšanas pasākumi *ex situ* un reto un izzūdošo augu kolekciju un sēkļu banku izveide. Lai nodrošinātu bioloģiskās un ģenētiskās daudzveidības saglabāšanu *ex situ*, sugas saglabā vai nu audu kultūrā (*in vitro*), sēkļu bankās vai lauka kolekcijās (botāniskajos dārzos). *In vitro* metodes lieto augu banku veidošanai, parasti sugām ar vāju reprodukcijas spēju, līdz ar to, šādām sugām svarīgi ir *in vitro* pavairošanas pētījumi optimālu metožu izstrādei.

Daudzos gadījumos zināšanām par augu bioloģijas īpatnībām var būt izšķiroša nozīme, izstrādājot konkrēto sugu *in situ* aizsardzības plānus. Tāpēc nepieciešami padziļināti reto augu bioloģijas pētījumi, jo šāda veida informācija Latvijā pašlaik gandrīz nav pieejama. Kā pētījuma objektu izvēlējamies Igaunijas rūgtlapi (*Saussurea esthonica* Baer ex Rupr.), jo tā ir izzūdoša suga, kurai nav izstrādāts sugas aizsardzības plāns. Arī literatūrā tikpat kā nav informācijas par šo sugu. Tās biotops ir kaļķains zāļu purvs vai pļava, kas arī Latvijā ir reti sastopams. Līdz ar to, iegūtie rezultāti varētu kļūt par pamatu ne tikai konkrētās sugas aizsardzības plāna izstrādē, bet arī palīdzēt noskaidrot nepieciešamās informācijas apjomu un riskus citu sugu saglabāšanai.

Darba mērķis bija veikt kompleksu pētījumu par *Saussurea esthonica* bioloģiju – *in vitro* kultūru, fizioloģiju, ģenētiku un vairošanos, tā rezultātā iegūstot izpratni par reto sugu saglabāšanai nepieciešamo bioloģiskās informācijas apjomu un izmantojamām pieejām.

Mērķa sasniegšanai izvirzīti sekojoši uzdevumi:

- 1) veikt sugas saglabāšanas *in vitro* pētījumus, īpašu uzmanību pievēršot citokinīnu ietekmei uz proliferāciju un rizoģenēzi;
- 2) trīs sezonu garumā veikt fizioloģiskos pētījumus dabiskos augšanas apstākļos, izmantojot nedestruktīvās analīzes metodes;
- 3) vadoties no pētījumu rezultātiem, realizēt fizioloģiskos eksperimentus kontrolētos apstākļos;
- 4) analizēt izvēlētās sugas vairošanās potenciālu, veicot sēklu dīgspējas pētījumus, sēklu kvalitātes un nepieciešamos apstākļus, kas nodrošina optimālu dīgspēju, noteikšanai, kā arī, analizēt veģetatīvo reprodukciju;
- 5) analizēt sugas populāciju ģenētisko daudzveidību un veikt vairāku *Saussurea* ģints sugu salīdzinošo ģenētisko analīzi.

1. Literatūras apskats

1.1. Sugas vispārīgais raksturojums un stāvoklis Latvijā

Igaunijas rūgtlape (*Saussurea esthonica* Baer ex Rupr., *Saussurea alpina* (L.) DC. subsp. *esthonica* (Baer ex Rupr.) Kupffer, *S. alpina* auct.) ir daudzgadīgs kurvjziežu (*Compositae*) dzimtas lakstaugs. Ziedi ir divdzimumu stobrziedi, sakārtoti kurvīšos (Andrušaitis 2003). *Saussurea* ģintī ir ap 400 sugu un ģints izcelsmes centrs ir centrālā un austrumu Āzija, izplatības rietumu spārns ir Rietumeiropa un austrumu spārns – Ziemeļamerika (Lipschitz 1979). Ģinti iedala 6 apakšģintīs, 20 sekcijās (Lipschitz 1979). *Saussurea* apakšģints sastāv no 10 sekcijām. Viena no tām ir sekcija *Saussurea*, kurā ir ap 160 sugu, starp tām, arī *S. esthonica*, *S. discolor*, *S. alpina* un *S. riederi* (Lipschitz 1979). Sekcijas *Saussurea* sugas aug galvenokārt augstu kalnos no boreālajiem līdz arktiskajiem apgabaliem Āzijā, Eiropā, rietumu un ziemeļu Amerikā; 83 no šīm sugām sastopamas Ķīnā (Shi *et al.* 2011). Daudzas *Saussurea* sugas Himalajos ir endēmas, apdraudētas un tās plaši izmanto medicīnā (Butola, Samant 2010).

Dažādos literatūras avotos minētais Eiropā sastopamo ģints pārstāvju skaits ir atšķirīgs. Tiek atzīmētas 3 līdz 9 vai vairāk sugas (Narits *et al.* 2000), 9 līdz 10 sugas (5 no tām Krievijā) (Dickore 2001), vai 9 sugas (*S. alpina*, *S. amara*, *S. controversa*, *S. discolor*, *S. parviflora*, *S. porcii*, *S. pygmaea*, *S. salsa*, *S. turgaiensis*) (<http://ww2.bgbm.org/EuroPlusMed/>).

Igaunijas rūgtlape sastopama Baltijas reģionā – Latvijā, Sanktpēterburgas apkārtnē un Igaunijā (iekļauta Baltijas reģiona Sarkanajā grāmatā), endēma (Ingelög *et al.* 1993). Suga iekļauta Latvijas Sarkanajā grāmatā (1. kategorija, statuss – izzūdoša suga), Eiropas Savienības direktīvas „Par dabisko biotopu, savvaļas augu un dzīvnieku sugu aizsardzību” (92/43 EEC) II pielikumā un Nacionālās vides monitoringa programmā (Kļaviņa *et al.* 2004). No 1930. līdz 1991. gadam tika uzskatīts, ka *S. esthonica* populācija Latvijā ir izzudusi. Tomēr 1991. gadā izdevās atrast 1884. gadā konstatēto atradni, kā arī atrast jaunu augšanas vietu (Andrušaitis 2003). Šobrīd Latvijā zināmas divas atradnes – Apšuciema un Popes apkārtnē (Andrušaitis 2003). Abas ir *Natura 2000* teritorijas (http://www.daba.gov.lv/public/lat/ipasi_aizsargajamas_dabas_teritorijas/; http://www.rpr.gov.lv/uploads/filedir/Ter_plaanojumi/Novadi%20un%20pagasti/Smarde/Vides%20parskats2.pdf). Suga iekļauta Nacionālā Botāniskā dārza reto un apdraudēto augu kolekcijā (gan audu kultūru, gan lauka kolekcijā) (Kļaviņa, Šmite 2009). Eiropas vaskulāro augu Sarkanajā sarakstā suga apzīmēta kā taksons, par kuru nav pietiekoši daudz datu (Bilz *et al.* 2011).

Daži autori Igaunijas rūgtlapi neizdala kā atsevišķu sugu, bet gan kā Alpu rūgtlapes pasugu [S.

alpina subsp. *esthonica* (Baer ex Rupr.) Kupff.] (Narits *et al.* 2000; Kell *et al.* 2005). Alpu rūgtlape ir arkto-alpīnais augs (Stevanović *et al.* 2009) ar plašu izplatības areālu – no Ķīnas līdz Centrālajai un Ziemeļeiropai, aug alpīnajās stepēs, klinšainās un akmeņainās nogāzēs (Lipschitz 1979; Shi *et al.* 2011). Kultūraugu savvaļas radnieku informatīvajā sistēmā alpu rūgtlapei izdala četras pasugas – *S. alpina* subsp. *alpina*, *S. alpina* subsp. *depressa*, *S. alpina* subsp. *macrophylla* un *S. alpina* subsp. *esthonica* (Kell *et al.* 2005).

S. alpina putekšņi atrasti jau Ledus laikmeta depoziēs (veidojušies pirms 18000 līdz 11500 gadiem) Ziemeļu un Centrāleiropā (Birks, Willis 2008). Uzska, ka augi, kas auga tuvu ledāja malām, ledājiem atkāpjoties izplatījās un kolonizēja brīvās vietas atkarībā no ledāja atkāpšanās ātruma. Ir divas pamatteorijas par alpīno augu sugu izplatību pēcdeduslaikmetā. Pirmā uzskata, ka leduslaikmetā tās izzuda un pēc tam imigrēja; atbilstoši otrai, daži taksoni izdzīvoja un tad pārvietojās uz vietām ar piemērotiem apstākļiem (Ingelög *et al.* 1993). Daži alpīnie augi veiksmīgi piemērojušies dzīvei zemākās reljefa vietās. Tomēr šādās vietās ierobežojošie faktori varētu būt paaugstināta gaisa temperatūra, kā arī konkurence ar citām sugām (Birks, Willis 2008). Holocēna perioda sākumā, ledājiem atkāpjoties un mainoties klimatam, notika strauja mežu izplatība un samazinājās alpīno augu dzīvotņu platība. Sugas saglabājās un pārvietojās uz biotopiem ar piemērotām temperatūrām un tādās vietās, kur tās nenomāca koki un krūmi (Birks, Willis 2008).

Tipisks biotops Igaunijas rūgtlapei ir kaļķains zāļu purvs vai pļava (Ek *et al.* 2002; Pakalne 2008), kam raksturīga augsne ar augstu kalcijs saturu. Zāļu purvi veidojas gruntsūdeņu pieplūdes vietās, vietās, kur pieplūst minerālvielām bagāti avotu vai upju ūdeņi, kā arī, aizaugot ezeriem (Pakalne 2008). Raksturīgi, ka augi, kas aug šādos purvos, ūdeni un barības vielas saņem gan no gruntsūdeņiem, gan no lietus ūdeņiem, līdz ar to, hidroloģiskais režīms sezonas laikā var mainīties un augiem jāspēj tam pielāgoties.

1.2. Populāciju izmēra saistība ar ģenētisko daudzveidību, demogrāfiskajiem un vides procesiem

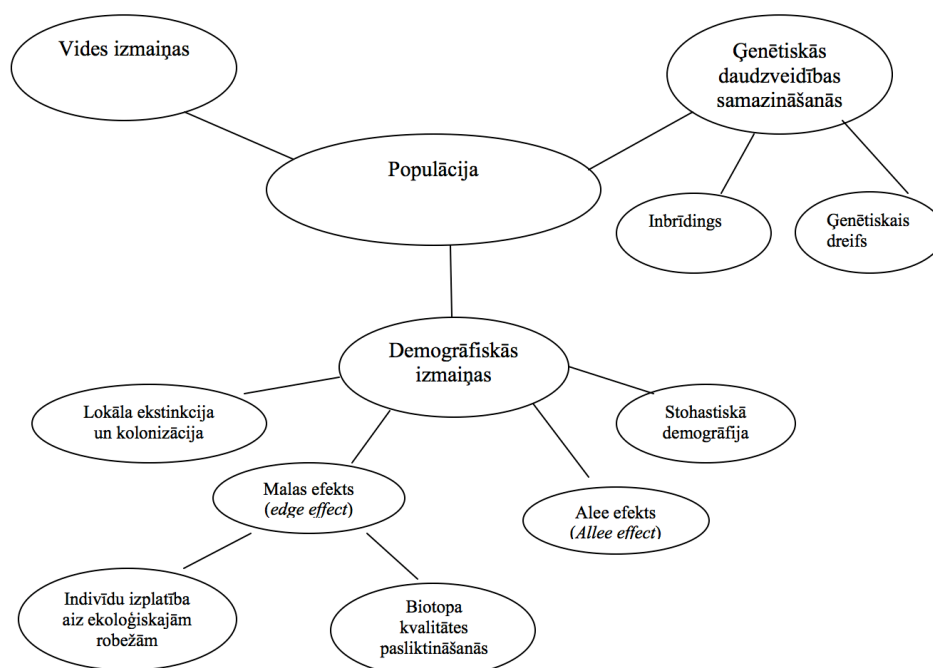
Augu populācijas dzīvotspēja ilgtermiņā un tās dinamika ir cieši saistīta ar populācijas izmēru un to ietekmējošajiem faktoriem. Lai saglabātu populācijas vitalitāti ilgtermiņā, tajā jābūt vismaz 2000 indivīdiem (Reed 2005). Noteikt augu populācijas izmēru ir samērā grūti, it sevišķi, ja augs vairojas gan veģetatīvi, gan ģeneratīvi. Augu populācijās, kurās grūti saskaitīt visus īpatņus, izmēru nosaka pēc ziedošo augu daudzuma (Schmidt, Jensen 2000; Jacquemyn *et al.* 2002; Hensen *et al.* 2005; Stöcklin *et al.* 2009; Tsaliki, Diekmann 2011) vai skaitot veģetatīvos dzinumus un ziedošos augus (Hensen, Oberprieler 2005; Hensen, Wesche 2006).

Sugu saglabāšanas kontekstā īpaša uzmanība tiek pievērsta mazām un izolētām populācijām. Tās ir apdraudētākas demogrāfiskās, ģenētiskās un apkārtējās vides neprognozējamās mainības dēļ (Lande 1988; Schemske *et al.* 1994; Luijten *et al.* 2000; Newman, Tallmon 2001; Oostermeijer *et al.* 2003) (1. attēls). Literatūrā trūkst datu, kas ļautu novērtēt sekas, kādas uz populāciju dzīvotspēju atstāj

mainīgie ģenētiskie procesi (Oostermeijer *et al.* 2003). Tomēr uzskata, ka ar ģenētiskajām izmaiņām vai populācijas izmēru var izskaidrot tikai 15 līdz 20% no to vitalitātes izmaiņām (Reed, Frankham 2002).

Ģenētiskās daudzveidības noteikšana starp populācijām un populāciju līmenī palīdz izvērtēt populāciju viendabīgumu, stabilitāti, kā arī to izcelsmi. Kā būtiskākās ģenētisko procesu izmaiņu sekas tiek uzskatīti ģenētiskais dreifs (alēļu zaudējums) un inbrīdings (alēles no heterozigotām pāriet homozigotās kombinācijās). Inbrīdīngā rezultātā veidojas vairāk neattīstītu sēkļu, ir zema sēkļu dīgspēja, augsta jauno dīgstu atmiršana un jauno augu vājāka augšana un ziedēšana (Oostermeijer *et al.* 2003). Ģenētiskā daudzveidība maz pētīta sugām, kas apdzīvo izolētas, fragmentētas sistēmas un par to literatūrā atrodami divi viedokļi: 1) kopumā tai ir tendence samazināties (Hensen *et al.* 2005, Šingliarova *et al.* 2008); 2) ne vienmēr mazās populācijās ģenētiskā daudzveidība ir samazināta, tā nav atkarīga no populācijas izmēra (Stöcklin *et al.* 2009). Tomēr jāņem vērā, ka tuvradnieciska krustošanās samazina augu pēcnācēju vitalitāti un sevišķi ietekmē reto sugu izdzīvošanu (Byers 1998).

Starp populācijas izmēru un augu vitalitāti (*fitness*) pastāv pozitīva korelācija (Reed 2005). Auga vitalitāte ietver sevī reprodukciju – dīgšanu, augšanu, ziedēšanu (Oostermeijer *et al.* 2003). Literatūrā sastopami dažādi viedokļi par izmaiņām reprodukcijā saistībā ar populācijas izmēru. Tā piemēram, uzskata, ka sēkļu skaits nav saistīts ar populācijas izmēru, taču lielākās populācijās vērojams lielāks augļu skaits un jauno dīgstu skaits (Schmidt, Jensen 2000). Savukārt citi autori konstatējuši, ka sēkļu daudzums pozitīvi korelē ar populācijas izmēru un mazās populācijās vērojamas atšķirības sēkļu daudzumos, bet lielākās populācijās šīs atšķirības ir mazākas (Luijten *et al.* 2000). Mazu populāciju augi ražo mazāk fertilu sēkļu un tās ir vieglākas (Hensen *et al.* 2005). Fragmentētās populācijās ziedu



1. attēls. Populācijas pastāvēšanu ietekmējošie faktori (pēc Lande 1988).

un sēklu skaits no auga, kā arī, sēklu skaits augļos samazinās, samazinoties populācijas izmēram, bet sēklu masa atbilstoši palielinās (Jacquemyn *et al.* 2002). Mazais sēklu skaits ne vienmēr skaidrojams ar inbredu depresiju, bet arī ar ierobežotu putekšņu vai apputeksnējamo augu daudzumu (Luijten *et al.* 2000). Samazinātais sēklu svars daļēji skaidrojams ar ģenētiskajiem faktoriem, bet lielā mērā – ar mainīgajiem vides faktoriem, tostarp, nepietiekamu apgaismojumu (Hensen, Oberprieler 2005).

Savvaļas populācijas dzīvotspēju ietekmē gan vides, gan ģenētiskie faktori (Schemske *et al.* 1994). Tas, kurš no faktoriem vairāk ietekmēs populācijas vitalitāti, ir lielā mērā atkarīgs no populācijas izmēra. Ja populācija lielāka par 100 indivīdiem, tad vides mainība dominē pār demogrāfisko mainību (Lande 1988). Tikai ļoti mazās populācijās (mazāk par 50 indivīdiem) vienīgās būtiskās ir nejausās demogrāfiskās izmaiņas (Oostermeijer *et al.* 2003).

Izmaiņas demogrāfiskajos procesos var notikt *Allee* vai malas efekta rezultātā (1. attēls). *Allee* efekts izpaužas kā samazināts sēklu daudzums – mazās populācijās apputeksnētāji ar grūtībām atrod tos dažus, citu starpā augošos interesējošos augus. Tā rezultātā, vai nu sēklu nav vispār, vai, ja augam iespējama pašappute, tad sēklas veidojas; līdz ar to, samazinās augu dzīvotspēja un reprodukcija (Oostermeijer *et al.* 2003; Law *et al.* 2010). Malas efekts izpaužas divos virzienos – kā biotopa kvalitātes pasliktināšanās tuvu pie ekoloģiskās robežas un indivīdu izplatība aiz ekoloģiskās robežas nepiemērotās vietās, kur tie iznīkst vai pārstāj vairoties (Lande 1988).

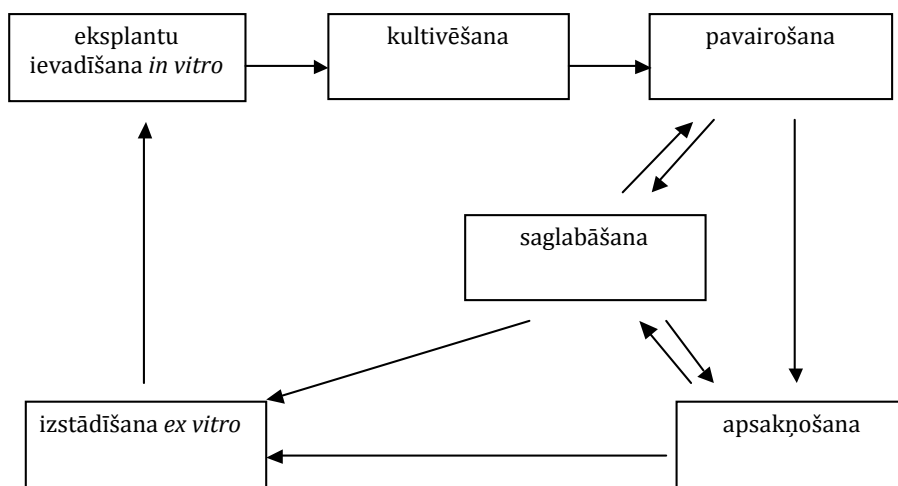
Mazas populācijas apdraud gan vides, gan sugas demogrāfiskās, gan ģenētiskās izmaiņas. Jo mazāka populācija, jo lielāka ģenētiskā dreifa un inbrīdinga iespējamība, kā arī citi iznīkšanu veicinošie procesi.

1.3. *In vitro* kultūras apdraudēto sugu saglabāšanai *ex situ*

Lai nodrošinātu augu bioloģiskās un ģenētiskās daudzveidības saglabāšanu ārpus to dabiskās izplatības vietām *ex situ*, sugas tiek saglabātas vai nu audu kultūrā *in vitro*, sēklu bankās vai lauka kolekcijās (botāniskajos dārzos) (Paunescu 2009). *In vitro* metodes izmanto gan augu banku veidošanai, gan arī augu pavairošanai sugām ar vāju reprodukcijas spēju, kā arī sugām, kam ir tikai daži indivīdi. Pielietojot saglabāšanu *in vitro* apstākļos, ir iespējams saglabāt daudz sugu mazā laukuma vienībā, izmantot tās pētniecībā, kā arī, izmantot kā materiālu dabisko populāciju atjaunošanai (Paunescu 2009).

In vitro kolekcijas izveidē izšķir sekojošs posmus: eksplanta dezinfekcija un ievadīšana *in vitro*, kultivēšana (uzturēšana) un pavairošana, kam seko ilgtermiņa saglabāšana (Paunescu 2009) (2. attēls). Ja augus izmanto reintrodukcijai vai ekspozīciju veidošanai botāniskajos dārzos, tad beigu posmi ir apsākņošana un izstādīšana *ex vitro*.

Katram no šiem posmiem ir vairāki būtiski priekšnoteikumi, lai uzturētu un attīstītu *in vitro* kultūru. Reto augu kolekciju veidošanai parasti iesaka par eksplantiem izmantot sēklas, tādējādi nodrošinot ģenētiskās daudzveidības saglabāšanos, tomēr dažām sugām sēklas var nebūt pieejamas un tad izmanto citas auga daļas (Fay 1992). Tomēr ir zināms, ka kultūras iniciācija no veģetatīvajiem



2. attēls. *In vitro* kultūras posmi.

dzinumiem ir problemātiska augstā infekcijas riska dēļ (Joshi, Dhar 2003). Retajiem augiem, lai neapdraudētu dabisko populāciju, potenciālo eksplantu daudzums ir neliels, līdz ar to ne vienmēr izdodas veiksmīga ievadišana *in vitro*. *In vitro* apdraudēto sugu kolekcija Latvijā atrodas Nacionālajā botāniskajā dārzā (Kļaviņa *et al.* 2004; Kļaviņa, Šmite 2009). Kultūras iniciācijai lieto gan sēklas, gan dzinumus (Kļaviņa *et al.* 2004).

Literatūrā ir dati par dažu *Saussurea* sugu pavairošanu ar audu kultūru metodi (Arora, Bhojwani 1989; Dhar, Joshi 2005; Guo *et al.* 2007), taču aprakstītā metode ietver augu pavairošanu, izmantojot kallusa kultūras, kuras nav ieteicamas reto sugu saglabāšanai (Fay 1992). Vienīgi Joshi, Dhar (2003) apraksta tiešu mikroklonālo pavairošanu no aseptiski diedzētām sēklām *Saussurea obvallata* augiem. Kallusa kultūras iesaka tikai tajos gadījumos, kad nepieciešams mākslīgi palielināt ģenētisko daudzveidību, veicinot somaklonālo variāciju, ja dabiskajā populācijā tā ir zudusi (Fay 1992). Saglabājot retos un aizsargājamus augus, tie jāsavairo no pietiekami liela parauga, kas pārstāv populācijas ģenētisko daudzveidību un izmaiņas gēnos vai gēnu ekspresijā nevajadzētu pieļaut, tātad, jālieto tiešās mikroklonēšanas metodes un zemas augšanas hormonu koncentrācijas barotnēs, lai veicinātu stabilu aksilāro augšanu bez kallusa veidošanas (Edson *et al.* 1997).

Kā pamatbarotni apdraudēto augu sugu kulivēšanai audu kultūrā galvenokārt lieto MS (Murashige, Skoog 1962) barotni (1. tabula) ar dažādām modifikācijām (Fay 1992; Kļaviņa *et al.* 2004; Sarasan *et al.* 2006; Holobiuc, Blindu 2007; Paunescu 2009).

Modificējot šo barotni, parasti maina makroelementu koncentrāciju, augšanas regulatorus (hormonus) un to daudzumu, saharozes daudzumu, agaru (atkarībā no ražotājfirmas), bet edamīnu nepievieno. Pievienoto fitohormonu daudzums un veids ir atkarīgs no nepieciešamā rezultāta. Kultūras iniciācijai par eksplantiem, izmantojot sēklas, lieto bezhormonu barotni ar samazinātu MS makroelementu koncentrāciju (Kļaviņa *et al.* 2006). Literatūrā atrodami pētījumi par citokinīnu ietekmi uz sēklu dīgšanu (Nikolić 2006), tomēr lietotās koncentrācijas ir salīdzinoši augstas.

No augšanas regulatoriem barotnēm galvenokārt pievieno augsīnu un/vai citokinīnu tipa

1. tabula. *Murashige, Skoog* (1962) MS barotnes makroelementu, mikroelementu sāļu un organisko savienojumu sastāvs

Viela	Daudzums (mg L ⁻¹)	Viela	Daudzums (mg L ⁻¹)
<i>Makroelementu sāļi</i>		<i>Organiskie savienojumi</i>	
NH ₄ NO ₃	1 650	nikotīnskābe	0.5
KNO ₃	1 900	piridoksīns × HCl	0.5
CaCl ₂ × 2H ₂ O	440	tiamīns × HCl	0.1
Mg SO ₄ × 7H ₂ O	370	glicīns	2
KH ₂ PO ₄	170	mezoinozīts	100
Na ₂ EDTA	37.3	edamīns	1 000
FeSO ₄ × 7H ₂ O	27.8	indoletīkskābe (IES)	1 – 30
<i>Mikroelementu sāļi</i>		kinetīns	0.01 – 10
H ₃ BO ₃	6.2	saharoze	30 000
MnSO ₄ × 4H ₂ O	22.3	agars	10 000
ZnSO ₄ × 4H ₂ O	8.6		
KI	0.83		
Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O	0.25		
CuSO ₄ × 5H ₂ O	0.025		
CoCl ₂ × 6H ₂ O	0.025		

savienojumus. Arī pārējie fitohormoni – abscīzskābe, etilēns un giberelīni ir būtiski audu kultūrās, tomēr daudzos gadījumos tos papildus nepievieno, jo tie sintezējas audos, kur ir aktīvi un netieši veic regulatoro lomu (Gaspar *et al.* 1996). Diferencētos audos auksīni galvenokārt nodrošina apikālo dominēšanu, veicina sakņu veidošanos, aizkavē lapu novecošanos. Citokinīnu tipa vielas plaši lieto audu kultūrās, lai stimulētu šūnu dališanos, adventīvo pumpuru un dzinumus veidošanos un sakņu morfoģenēzi (Gaspar *et al.* 1996; Subotić *et al.* 2009). Tie reducē primāro sakņu augšanu un laterālo sakņu daudzumu (Laplaze *et al.* 2007). Citokinīnu nozīme sakņu morfoģenēzē nav skaidri zināma, tomēr to klātbūtnē mainās sakņu struktūra (Kuroha, Satoh 2007). Sakņu garums un diametrs ir galvenie lielumi, lai aprakstītu un salīdzinātu sakņu sistēmas (Bouma *et al.* 2000), tāpēc tos var lietot dažādu augšanas regulatoru radītā efekta raksturošanai. Optimālākā katra augšanas regulatora koncentrācija ir atkarīga gan no auga, gan kultivēšanas apstākļiem, gan konkrētā regulatora. Citokinīni salīdzinoši augstās koncentrācijās var sekmēt somaklonālo izmaiņu rašanos (Chuenboonngarm *et al.* 2001), tāpēc reto augu kultivēšanai nepieciešams atrast optimāli zemas citokinīnu koncentrācijas. Pavairošanas barotnēs lieto galvenokārt citokinīnu tipa savienojumus – BAP, kinetīnu, tidiazuronu, auksīnus – naftiletīkskābi (NES), indol-3-etīkskābi (IES) (Arora, Bhojwani 1989; Johnson *et al.* 1997; Paunescu 2009). Arvien lielāku uzmanību pievērš arī kolekciju uzturēšanai ilgtermiņā. Lai to nodrošinātu, izmanto palēninātās augšanas apstākļus (parasti 4 līdz 5 °C) un kriosaglabāšanu (Fay 1992; Sarasan *et al.* 2006; Paunescu 2009).

Sakņu inducēšanai *in vitro* kultūrā lieto vai nu bezhormonu barotnes, vai arī pievieno auksīnus (Johnson *et al.* 1997; Benson *et al.* 2000). Tomēr ir gadījumi, kad apsākšana ir apgrūtināta, piemēram, dažiem kokaugiem, un tā uzlabojas, palielinoties gāzmaiņai, piemēram, lietojot agara aizstājēju florialītu (*Florialite*) (Sarasan *et al.* 2006).

1.4. Fotosintēzes pigmenti un fotoķīmiskās reakcijas

Fotosintēze ir process, kurā augs izmantojot saules gaismu oksidē ūdeni un rada skābekli, kā arī reducē CO₂ un sintezē oglekļa savienojumus. Fotosintēze notiek lapu mezofilā, kur izvietojušies hloroplasti, kuros atrodas fotosintēzes pigmenti – hlorofili un karotinoīdi. Pigmentu daudzums lapās ir saistīts ar auga fizioloģisko īpašību izmaiņām, tas mainās ontogēnēzē, lapām novecojot, mainoties apgaismojumam un slāpekļa daudzumam augā (Gamon, Surfus 1999). Pie kam, jaunās lapās gan hlorofila, gan ksantofila saturs ir zemāks nekā pieaugušās lapās (Gamon, Surfus 1999).

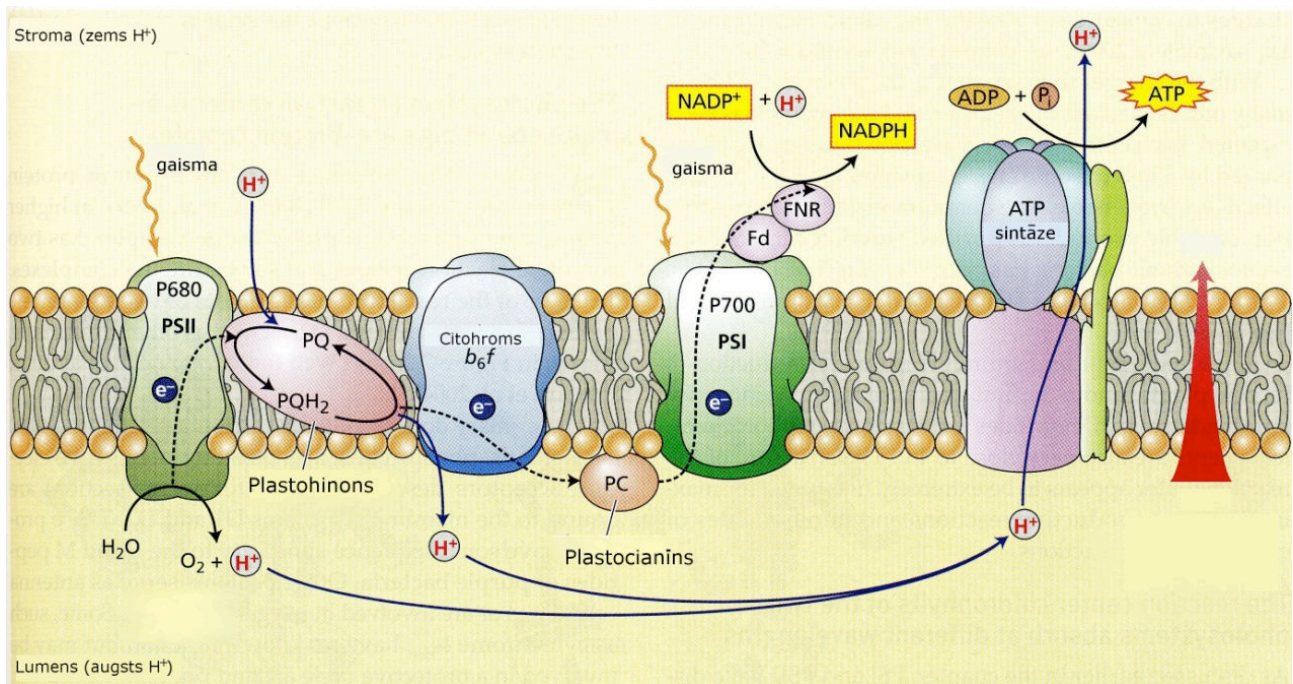
1.4.1. Augu fotosintēzes pigmenti

Pavisam sastopamas četras pigmentu grupas – hlorofili, karotinoīdi, fikobilīni un antociāni. Zaļajos augos sastopamie hlorofils *a* un *b* un karotenoīdi ir iesaistīti fotosintēzes reakcijās. Tie nodrošina gaismas absorbciju sarkanajā un zilajā gaismas spektra daļā (Nishio 2000). Hlorofila absorbcijas spektrs ir gaismas viļņu garumā 400-430 nm un 640-700 nm, savukārt, karotinoīdiem – 430-600 nm. Hlorofila molekulai raksturīgi četri pirola gredzeni, savienoti ar metīna tiltiņiem, izveidojot porfirīna ciklu ar magnija atomu centrā. Hlorofila molekula atrodas pamata singleta stāvoklī, ja π elektroni tajā atrodas uz vienas orbitāles un vērsti viens pret otru ar pretējiem spiniem. Absorbējot gaismas kvantu hlorofila molekula pāriet ierosinātā stāvoklī (singleta stāvoklī). Ja hlorofila molekula absorbē gaismas kvantu ar lielāku enerģiju, elektrons pāriet augstākā orbitā un, lai atgrieztos singleta stāvoklī, tas atdod daļu enerģijas siltuma veidā. Lai no singleta stāvokļa atgrieztos pamata singleta stāvoklī molekula var enerģiju izmantot fotoķīmiskajās reakcijās vai atdot enerģiju siltuma veidā, var izstarot gaismas kvantu ar garāku viļņu garumu (fluorescēt), var mainīties spini, molekula iegūst nestabilu tripleta stāvokli un daļu enerģijas iztērē siltuma veidā un daļu fosforescencē vai pārvērsē ķīmiskajā enerģijā.

Karotinoīdi ir dzeltenie, oranžie un sarkanie pigmenti. Galvenie karotinoīdi, kas atrodas augos, ir karotīns (β -karotīns), ksantofili (luteīns un neoksanīns, un ksantofila ciklā darbojošies - violaksantīns, anteraksantīns un zeaksantīns) (Demmig-Adams *et al.* 1996). Fotosistēmā I (PS I) ir daudz β -karotīna, savukārt fotosistēmā II (PS II) – luteīna. Karotinoīdiem ir divas svarīgas, taču atšķirīgas funkcijas fotosintēzē. Karotinoīdi nodod enerģiju hlorofilam fotosintētisko reakciju nodrošināšanai vai arī aizvirza enerģiju prom no hlorofila, darbojoties kā fotoprotektori (Demmig-Adams *et al.* 1996).

1.4.2. Fotosintēzes fotoķīmiskās reakcijas

Fotosintēzes fotoķīmiskās reakcijas ir gaismas reakcijas, kuru laikā notiek gaismas kvantu saistīšana hlorofila molekulās, gaismas enerģijas transformēšana ķīmiskajā enerģijā un ATP un NADPH veidošana. Šajā procesā iesaistītas PS I un PS II (3. attēls). PS II ir pigmentu-proteīnu komplekss un tās reakcijas centrs ar antenu hlorofilu un elektronu transporta proteīniem atrodas hloroplastu granu lamellās tilakoīdu membrānā. PS I reakcijas centrs ar antenu hlorofilu, elektronu transporta proteīniem un ATP sintēzes enzīmiem atrodas stromas lamellās un uz robežas ar granu lamellām (Taiz, Zeiger



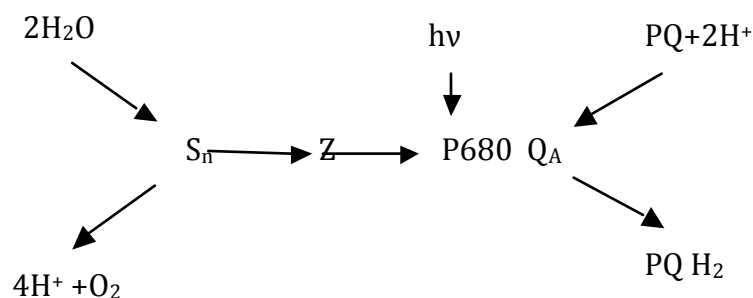
3. attēls. Fotosintēzes gaismas reakcijas – fotosistēma I (P SI) un fotosistēma II (PS II) (pēc Taiz, Zeiger 2006)

2006). Citohroma b_6f komplekss elektronu transporta ķēdē savieno abas fotosistēmas. Par elektronu nesējiem starp fotosistēmām kalpo plastocianīns un plastohinons.

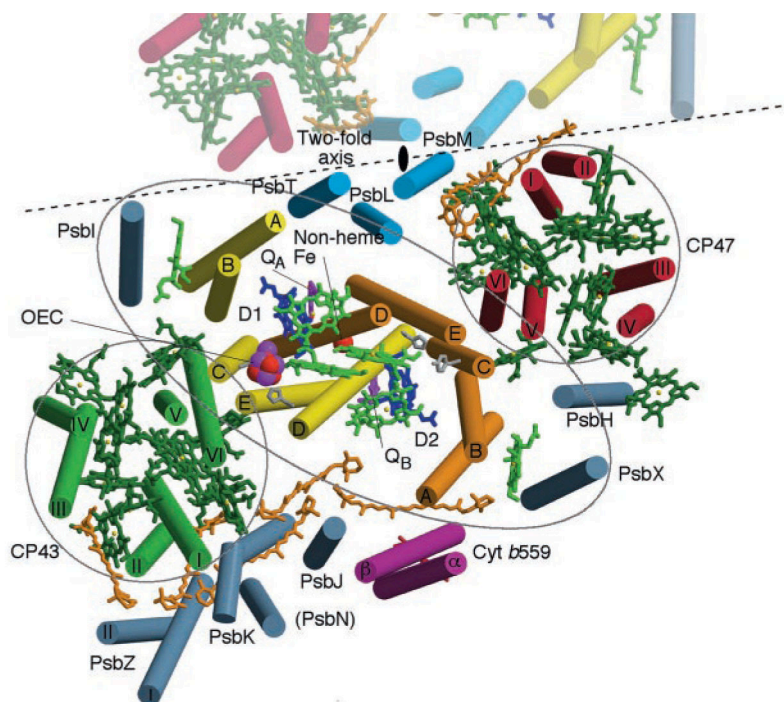
Primārais elektronu donors PSII ir P680 (hlorofils ar gaismas absorbcijas maksimumu 680 nm). Plastohinons tiek reducēts par plastohidrohīnolu. Uzskata, ka plastohinona A molekula, kas ir elektronu akceptors un darbojas starp oksidēto un semihinona stāvokli, ir fluorescences dzēsējs (Wrydzynski 2008). Vienkāršotā veidā elektronu transporta ķēde PS II pēc Wrydzynski (2008) redzama 4. attēlā, kur S ir skābekļa izdalošais komplekss un Z (elektronu donors, kas satur divus cieši saistītus Mn atomus), starposms starp S un P680.

Kopumā PSII sastāv no 17 iekšējām un 3 ārējām proteīnu apakšgrupām un satur 35 hlorofila, 2 feofitīna, 12 karotinoīdu, 2 hēma molekulas (Cyt c559 un Cyt c550), vienu nehēma dzelzs jonu, 2 kalcija jonus, 1-2 hlorīda jonus, 3 plastohinona un 4 magnija jonus un vairāk par 25 lipīdu molekulas (Williamson 2011) un redzama 5. attēlā.

Ūdens sadalīšanā PS II iesaistīti proteīni D1 un D2, kā arī antenās esošie proteīni CP43 un CP47.



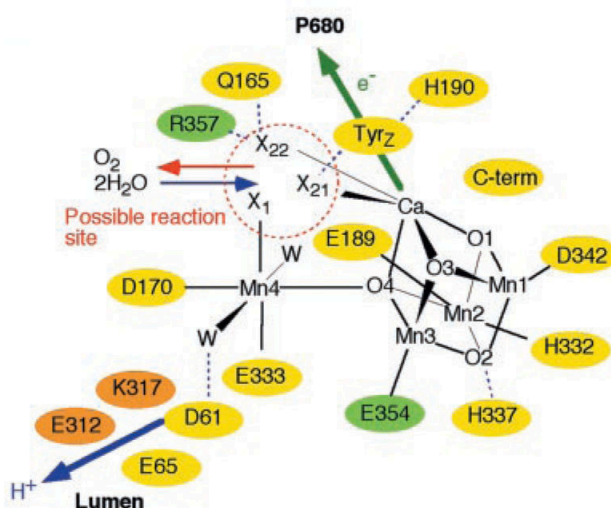
4. attēls. Elektronu transporta ķēde PSII (pēc Wrydzynski 2008).



5. attēls. PS II vispārējā struktūra. Attēls no *Ferreira et al.* (2004).

MSP proteīnu primārā funkcija ir aizsargāt Mn_4Ca klasteri (Wrydzynski 2008). Mn_4Ca klasteris, jeb skābekli izdalošais komplekss shematiski attēlots 6. attēlā.

Ja absorbētās gaismas enerģija palielinās, fotosintētiskajā aparātā sāk darboties vairāki fotoaizsardzības mehānismi – termiskā izkliede vai nefotoķīmiskā absorbētās enerģijas izkliede, kas saistīta ar protonu gradienta veidošanos (Carpentier 2005). PS II fotoinhibēšana ir atkarīga vai nu no sākotnējās bojājuma vietas vai arī bojājuma izraisītāja dabas. Akceptora pusē fotoinhibēšanu rada singleta skābekļa izveidošanās, kas veicina iekšējās izmaiņas PS II reakcijās. Šis process, kas ietver primāro elektronu donoru tripletu veidošanos, rodas pastiprinātas gaismas ietekmē, kad plastohinons ir reducēts, bet tas var rasties arī pie zemām gaismas intensitātēm, kad plastohinons B ir izveidots (zemās gaismas sindroms) (Nixon *et al.* 2010). Pretstatā donora puses fotoinhibēšana ir vērojama,



6. attēls. Skābekli izdalošais komplekss. Attēls no *Ferreira et al.* (2004).

ja elektronu atdošana PS II reakcijas centram ar ūdens oksidēšanu ir neiespējama. Un, līdz ar to, donora pusē oksidēšanās nenotiek un sakarā ar augsto oksidēšanas potenciālu un reaktivitāti var bojāt blakus esošas struktūras (Nixon *et al.* 2010). Rodoties reaktīvajām skābekļa molekulām, tās kavē PS II atjaunošanos pēc fotoboļājuma, inhibējot proteīnu sintēzi (Murata *et al.* 2007). Fotoinhibēšanas mehānisms vēl arvien nav skaidri zināms. Tomēr, tā kā ar katru gadu iegūto zināšanu apjoms šajā jomā paplašinās, tad viens no fotoinhibēšanas mehānismu salīdzinošajiem skaidrojumiem redzams 2. tabulā.

1.5. Ar fotosintēzi saistītās pazīmes kā indikatori augu atbildei uz vides faktoriem

Aizsargājamo sugu pētīšanai *in situ* svarīgi lietot nedestruktīvas metodes, lai, netraumējot augus, iegūtu informāciju par auga fizioloģisko stāvokli, kuru nosaka auga ģenētiskās, augšanas un attīstības īpatnības. Pie šādām metodēm pieder hlorofila satura un hlorofila *a* fluorescences analīze. Hlorofila *a* fluorescences un hlorofila satura mērīšana ir nozīmīga bioloģiskās daudzveidības izpētē, t.sk., savvaļas augu ekofizioloģijas pētīšanā *in situ* (Samsone *et al.* 2007), jo tādējādi iegūst informāciju par hlorofila saturu un izmaiņām fluorescencē un, līdz ar to, izmaiņām fotosintēzes fotoķīmiskajos procesos. Abas metodes ļauj atkārtoti, ilgākā laika periodā netraumējot augus, pētīt ar fotosintēzi saistītos procesus.

1.5.1. Hlorofila satura izmaiņas

Fotoķīmiskie procesi nosaka fotosintēzes efektivitāti un ir tieši saistīti ar hlorofila saturu lapās. Tas var mainīties apgaismojuma intensitātes, augsnes minerālelementu sastāva un lapu novecošanās rezultātā (Richardson *et al.* 2002), ūdens satura lapās un diennakts laika ietekmē (Samsone *et al.* 2007). Hlorofila samazinājumu lapās saista ar stresu un to uzskata par stresa indikatoru (Netto *et al.* 2005).

Ar nedestruktīvām metodēm, izmantojot hlorofilmetru, hlorofila daudzumu nosaka relatīvajās (SPAD) vienībās. Salīdzinot klasiskajā veidā spektrofotometriski noteiktu hlorofila saturu ar rezultātu, ko iegūst ar hlorofilmetru veiktiem mērījumiem, konstatēts, ka starp rezultātiem pastāv gandrīz lineāra sakarība (Samsone *et al.* 2007). Atkāpes no linearitātes saistītas ar hlorofila neviendabīgo izplatību lapā (Uddling *et al.* 2007). Hlorofilmetra mērījumi parāda salīdzinošo hlorofila daudzumu

2. tabula. Fotoinhibēšanas mehānismi PS II (pēc Murata *et al.* 2007)

Mehānisms	Jaunā shēma	Iepriekšējā shēma
Aktīvā skābekļa darbība	Darbības inhibēšana, proteīnu sintēzes inhibēšana (galvenokārt D1 proteīnu)	Tieša PS II reakcijas centru inaktivācija
Fotoboļājumi	Divpakāpju process: (1) skābekļa iesaistītā kompleksa bojājums (lēns), (2) reakcijas centru bojājums (ātrs)	Reakcijas centru fotoboļājums
Efektīva gaisma	Divpakāpju process: (1) gaismu absorbē Mn klasteris, (2) gaismu absorbē hlorofils	Gaismu absorbē hlorofils

(Richardson *et al.* 2002; Netto *et al.* 2005), līdz ar to, iegūtos rezultātus iespējams izmantot vienas sugas ekofizioloģiskajos pētījumos, jo atšķirības dažādu sugu lapu struktūrā var ietekmēt iegūto rezultātu, tāpēc dažādu sugu mērījumu salīdzināšana bez kalibrācijas ir apgrūtināta (Richardson *et al.* 2002). Ir konstatēts, ka *Coffea canephora* lapās hlorofilam samazinoties zem 40 SPAD vienībām, fotoķīmiskie procesi sāk pavājināties (Netto *et al.* 2005). Savukārt, hlorofila daudzumam samazinoties līdz pat 25% no kontroles, fotosistēmas II (PS II) fotoķīmiskā aktivitāte samazinās nedaudz – aptuveni par 6% (Morales *et al.* 1991). Hlorofila saturam samazinoties vēl vairāk, var novērot fotoinhibēšanu.

1.5.2. Hlorofila *a* fluorescences rādītāji un to izmaiņas

Gaismas enerģiju, kuru absorbē hlorofila molekulas lapā, var izmantot trīs veidos: fotosintēzē (fotoķīmiskajās reakcijās), siltuma veidošanai un izdalīšanai vai arī emisijai fluorescences veidā. Izmaiņas vienā no šiem rādītājiem rada izmaiņas arī divos pārējos (Maxwell, Johnson 2000). Hlorofila fluorescences (CF) ir sarkanā vai tālā sarkanā gaisma, kas fotosintētiskās radiācijas ietekmē tiek emitēta no zaļajiem augu audiem (Mohammed *et al.* 2003). Ap 95% no CF iznākuma nāk no hlorofila molekulām, kas darbojas PSII un mainās atbilstoši apstākļiem. Fotosistēmā I CF iznākums ir mazs un tas ir konstants, tādēļ pēc CF mērījumu rezultātiem var spriest par izmaiņām PS II. PS II ir ļoti jutīga pret dažādiem stresa faktoriem (Sayed 2003; Panda *et al.* 2006; Naumann *et al.* 2008). Tā, piemēram, hlorofila *a* fluorescences izmainās, palielinoties minerālelementu daudzumam augsnē un augos (Otronen, Rosenlund 2001).

Fluorescenci nosaka pigmentu absorbcija, enerģijas pārneses ierosināšana, fluorescējošo pigmentu daba un orientācija, reakcijas centru oksidēšanās-reducēšanās stāvoklis, kā arī PSII donori un akceptori, tomēr katrs no tiem fluorescenci ietekmē netieši (Strasser *et al.* 2000). Kopumā fluorescences parametri ļauj noteikt, kā vides un ģenētiskie faktori ietekmē noteiktus fotosintēzes procesus: 1) cik liela daļa no hlorofila molekulām nodod enerģiju reakcijas centram F_0 ; 2) kāda ir PS II maksimālā kvantu efektivitāte (F_v/F_m); 3) cik daudz (proporcionāli) reakcijas centri ir atvērti (oksidētais plastohinons) q_p .

F_v/F_m mainās tikai to faktoru ietekmē, kuri tieši iedarbojas uz PS II, un parāda PS II maksimālo fotoķīmisko aktivitāti, tāpēc bieži to izmanto kā PSII efektivitātes indikatoru (Thach *et al.* 2007). Uzskata, ka mērenās joslas koki, kam šo parametru mēra augšanas sezonas laikā saulainā dienā, jūtas „optimāli”, ja F_v/F_m ir no 0.83 līdz 0.70, vidēji – no 0.69 līdz 0.66 (Mohammed *et al.* 2003). Apstākļiem mainoties, šie lielumi var mainīties. Optimālā lieluma samazinājumu novēro palielinātā gaismas intensitātē, kā arī stresa apstākļos vai sākoties ziemas miera periodam.

Performance Index (PI) ir auga vitalitātes rādītājs, kas sastāv no trim neatkarīgiem parametriem un mainās, ja kāds no tiem izmainās. Šie parametri ir 1) reakciju centru blīvums, 2) varbūtība, ka absorbētais fotons piedalīsies gaismas reakcijās, 3) parametrs, kurš raksturo elektronu transportu (Pinior *et al.* 2005). PI ir jutīgāks pret vides izmaiņām nekā F_v/F_m (Hermans *et al.* 2003). Uzskata, ka tieši PI parāda tāda svarīga makroelementa kā slāpekļa piegādes ietekmi kultūraugiem un, palielinot

slāpekļa piegādi, palielinās auga vitalitāte, ko raksturo PI (Maļceva *et al.* 2011).

Parametrs F_v/F_0 kokaugiem strauji palielinās pavasarī un samazinās salnu ietekmē, pie kam zemākajām lapām vairāk nekā augšējām (Mohammed *et al.* 2003). F_0 ir nulles līmeņa (pamatlīmeņa) fluorescence, t.i., minimālā fluorescence tumsā adaptētiem augiem, kam visi PS II reakcijas centri ir pilnībā atvērti. Normālos apstākļos tās vērtība ir no 0.2 līdz 0.4, bet stresa situācijās lielāka par 0.7. F_v ir mainīgā fluoresce ($F_m - F_0$), savukārt, F_m – maksimālā fluorescence ($F_0 + F_v$) (norma ir 1.2 līdz 1.5) (Kooten, Snel 1990). F_v/F_0 lieto pētniecībā, lai labāk vizualizētu mazās izmaiņas, ko novēro F_v/F_m un dod iespēju viegli atklāt atšķirības, piemēram, starp dažādām šķirnēm, t.i., F_v/F_m samazināšanās no 0.8 līdz 0.6 atbilst F_v/F_0 samazinājumam no 4.0 līdz 1.5. Jāņem vērā, ka F_v/F_0 , atšķirībā no F_v/F_m , nav lineāri attiecināma uz PS II fotoķīmijas maksimālo kvantu iznākumu (Baker, Rosenqvist 2004).

Parametrs RC/ABS raksturo aktīvo reakcijas centru hlorofila attiecību pret antenu hlorofilu (Pinior *et al.* 2005) un parāda aktīvo reakcijas centru blīvumu (Thach *et al.* 2007).

Hlorofila fluorescence ir ļoti jutīga reakcija un to ietekmē lapu fizioloģiskais stāvoklis, līdz ar to, var ātri novērtēt individuālā auga stāvokli. Izmaiņas fluorescences rādītājos parādās karstuma, aukstuma, sausuma, applūšanas, minerālelementu, substrāta īpašību (sāļuma) ietekmē (Sayed 2003; Baker, Rosenqvist 2004). Fotoķīmiskos procesus ietekmē arī ektomikoriza un rezultāts ir atkarīgs gan no slāpekļa daudzuma, gan auga vecuma (Corrêa *et al.* 2006). Ēnmīļiem augiem labāk attīstīts pigmentu aparāts, kas ļauj aktīvāk izmantot zemākas intensitātes gaismu. Ļoti spēcīgs apgaismojums izjauc pigmentu biosintēzi, fotosintēzes reakcijas un augšanas procesus, rezultātā samazinās auga kopējā produktivitāte. Fotosintēzes produktivitāti ietekmē ārējās vides faktori – gaismas intensitāte un kvalitāte, CO₂ koncentrācija, temperatūra, ūdens režīms lapas audos, minerālā barošanās u.c. faktori. Maksimālā fotosintēze vērojama, ja ir neliels ūdens deficīts (5 līdz 20% no piesātināta) lapās un atvārsnītes atvērtas. *Glycine max* fotosintēze vislielākā ir laikā no 9:00 līdz 12:00 un no 16:00 līdz 17:00, zemākā 14:00, bet pēc 20:00 tā strauji samazinās (Aliyev, Mirzoyev 2010). Kopumā fotosintēzes intensitāte ir samazināta veģetācijas sezonas sākumā un beigās, taču, kaut arī hlorofila saturs lapās samazinās, fotosistēmas II fotoķīmiskā efektivitāte veģetācijas sezonas beigās saglabājas augsta (Adams *et al.* 1990).

1.6. Vides faktoru ietekme uz savvaļas augu augšanu un attīstību

Augu augšanu un attīstību ietekmē augu ģenētiski determinētās īpašības, kā arī dažādi vides faktori. Tā kā Igaunijas rūgtlape savvaļā aug kaļķainos zāļu purvos un pļavās, tad darbā tuvāk apskatīta augsnes īpašību, sausuma un mitruma ietekme.

1.6.1. Augsnes sastāva (minerālelementu) ietekme

1.6.1.1. Augiem nepieciešamie minerālelementi

Augsnes sastāva ietekme uz augu augšanu pārsvarā pētīta kultūraugiem (Riņķis, Ramane 1989;

Baligar *et al.* 2001; Cakmak 2002; Fageria *et al.* 2008). Minerālvielu pieejamība, uzņemšana un uzkrāšana augā ir atkarīga gan no vides, gan augsnes faktoriem (Osvalde 2011). Minerālelementu uzņemšana caur saknēm atkarīga no sakņu morfoloģiskajiem (skaita, garuma, blīvuma), fizioloģiskajiem (sakņu / dzinumu attiecības, sakņu mikroorganismu ietekmes, ūdens uzņemšanas spējas), bioķīmiskajiem parametriem (enzīmu sekrēcijas, helatējošajiem savienojumiem) un minerālelementu spējas pārvietoties uz saknes virsmu difūzijas vai ūdens plūsmas veidā (Baligar *et al.* 2001). Minerālelementu uzņemšanu ietekmē arī augsnes īpašības (augsnes šķīdumu koncentrācija, augsnes buferspēja), vides faktori (gaisma, mitrums, temperatūra), kā arī augu slimības un kaitēkļi. Ja runā par augsnes auglīgumu, tad saistībā ar savvaļas augu augšanu tas ir relatīvs jēdziens, jo dažādām sugām ir dažādas prasības attiecībā uz augsni. Sakņu absorbcijas kapacitāte parasti ir augstāka ātri augošām sugām, neauglīgākās augsnēs augošām sugām raksturīga paaugstināta sakņu / dzinumu attiecība (Chapin 1980).

Minerālelementiem ir dažādi iedalījumi. Klasiskajā veidā tos iedala makroelementos un mikroelementos atkarībā no to koncentrācijas augos. Izšķir sešus galvenos makroelementus: slāpekli (N), fosforu (P), kāliju (K), magniju (Mg), kalciju (Ca) un sēru (S).

Minerālelementus iedala arī pēc to funkcijām augos (Mengel, Kirkby 2001) (3. tabula).

Slāpekli (N), fosforu (P) un kāliju (K) ir viegli šķīstoši un lielākā daļa šo elementu nonāk uz sakņu virsmas difūzijas ceļā. Visvieglāk augiem no augsnes absorbēt fosforu fosfātu veidā, slāpekli amonija jonu veidā un kāliju kā K^+ (Chapin 1980). Ļoti mobilie katjoni Ca^{2+} un Mg^{2+} arī nonāk uz sakņu virsmas gan difūzijas ceļā, gan ar ūdensplūsmu un, ja piegāde pārsniedz absorbciju, bieži tiek uzkrāti saknes tiešā tuvumā. Šie elementi ierobežo augu augšanu tikai ļoti zemā augsnes šķīduma koncentrācijā vai arī tad, ja saknes absorbē slāpekli kā NH_4^+ un citus katjonus zemās koncentrācijās, lai izlīdzinātu līdzsvaru

3. tabula. Minerālelementu klasifikācija pēc to bioķīmiskajām funkcijām (pēc Mengel, Kirkby 2001)

Nr.	Funkcijas	Minerālelements	Uzņemšana augā	Bioķīmiskās funkcijas
1.	Ietilpst oglekļa savienojumos	N, S	Joni no augsnes šķīdumiem, atmosfēras gāzes NO_3 , NH_4^+ , N_2 , SO_4^{2-} , SO_2	Galvenās organisko vielu sastāvdaļas; atomu grupu, kas iesaistītas enzimatiskajos procesos, pamatelementi; iesaistīti asimilācijas redoksreakcijās
2.	Nodrošina enerģētiskos procesus un strukturālo viengabalainību	P, B, Si	Fosfātu, borskābes vai borātu, silīcijskābes veidā no augsnes šķīduma	Esterifikācija ar dabīgajām spirta grupām augos; fosfātu esterī iesaistīti enerģijas pārvietošanas reakcijās
3.	Augos atrodas jonu veidā	K, Na, Ca, Mg, Mn, Cl	Jonu veidā no augsnes šķīduma	Veido osmotisko potenciālu; piedalās enzīmu aktivācijā; balansē anjonus; kontrolē membrānu caurlaidību un elektroķīmisko potenciālu
4.	Iesaistīti redoksreakcijās	Fe, Cu, Zn, Mo, Ni	Jonu vai helātu veidā no augsnes šķīduma	Sekmē elektronu transportu ar valences maiņu; helātu formā ietilpst prostētiskajās grupās

(Chapin 1980). Slāpekļis nodrošina augšanu, ietekmē šūnu skaitu un izmērus, fosforam ir līdzīga, tomēr mazāka ietekme, kālijs galvenokārt ietekmē šūnu izmērus. Kalcījs, savukārt, ir imobils floēmā, uzkrājas ksilēmā un transpirācijas vietās. Ja barības elementu uzņemšana no augsnes nav pietiekama, tad tie elementi, kas nodrošina meristēmu un jauno lapu augšanu (N, P, K, Mg), tiek ņemti no vecajām lapām, kur tie tiek pārvietoti no neorganiskajām uzglabāšanas vietām vakuolās un no hidrolizētiem savienojumiem kā fosfātu esteri un aminoskābes. Tas samazina gan proteīnu, gan hlorofila sintēzi. Fotosintēze ir tieši saistīta ar slāpekļa koncentrāciju lapās, jo slāpekļis ietilpst fotosintētisko enzīmu un hlorofila sastāvā. Savukārt, fosfora un kālija līmenim lapās mainoties, izmaiņas fotosintēzē notiek lēni (Chapin 1980). Sērs ietilpst katrā olbaltumvielu molekulā, jo ir vairāku aminoskābju sastāvā. No visa augā sastopamā sēra 70% atrodas hloroplastos (Riņķis, Ramane 1989). Sēram ir liela nozīme nitrātu reducēšanā un, trūkstot sēram, augā uzkrājas nitrāti (Riņķis, Ramane 1989).

Augam absolūti nepieciešami ir šādi mikroelementi: dzelzs (Fe), mangāns (Mn), varš (Cu), cinks (Zn), bors (B), kobalts (Co), molibdēns (Mo) (Riņķis, Ramane 1989).

Dzelzij liela nozīme augu elpošanas procesā, tā piedalās oksidēšanās-reducēšanās procesos, kas nepieciešami, lai veidotos hlorofils. Dzelzs iesaistīta hlorofila sintēzes sākuma posmos (protoporfirīnu un δ -aminolevulinātskābes sintēzē), līdz 80% šūnās esošā dzelzs atrodas hloroplastos (Hänsch, Mendel 2009). Augsnē dzelzs sastopama kā makroelements, taču augos tā ir mikroelements (Riņķis, Ramane 1989). Varš un cinks ietilpst dažādu enzīmu, tai skaitā, superoksīddismutāzes un plastocianīna, sastāvā, sekmē augu sausumizturību un salizturību, nodrošinot brīvo radikāļu līdzsvaru. Cinks ietilpst visu sešu enzīmu klašu (oksidoreduktāžu, transferāžu, hidrolāžu, liāžu, izomerāžu un ligāžu) sastāvā (Broadley *et al.* 2007), sekmē augsni stabilizāciju. Mangāns piedalās fotosintēzē, ietekmē elpošanu, olbaltumvielu un tauku sintēzi, sekmē augu salizturību, sausumizturību un karstumizturību (Riņķis, Ramane 1989). Mangāns proteīnos darbojas kā katalītiski aktīvs metāls vai kā enzīmu aktivators. Mangāna katalītiskā daba parādās superoksīda dismutāzē, kuras sastāvā ir mangāns, kas pasargā šūnu no brīvo radikāļu bojājumiem, oksalāta oksidāzē un mangānu saturošā ūdens sadalīšanas sistēmā PS II (Hänsch, Mendel 2009). Bors sekmē aminoskābju un olbaltumvielu sintēzi, tā trūkums izraisa traucējumus vielu transportā augos, jo cieš vadaudi, kā arī reproduktīvajos orgānos. Kobalts piedalās vairāku enzīmu aktivēšanā, veicina peroksīdu noārdīšanos šūnās, tā klātbūtnē palielinās augsni iedarbība (Riņķis, Ramane 1989). Molibdēns piedalās slāpekļa vielmaiņā augos, ietekmē olbaltumvielu, hlorofila un aminoskābju sintēzi.

1.6.1.2. Minerālelementu nepietiekamība un pārbagātība

Minerālelementu nepietiekamības apstākļos palielinās sakņu / dzinumu attiecība, samazinās fotosintētiskā aktivitāte, parādās redzami elementu nepietiekamības simptomi, samazinās reproduktīvā spēja. Savvaļas sugām var prognozēt minerālelementu pieplūdumu pavasarī, dažos apgabalos arī rudenī un ziemā (Chapin 1980). Līdz ar to, daudzgadīgajiem augiem raksturīga rezerves vielu uzkrāšana

un uzglabāšana, tai pat laikā uzkrātie ogļhidrāti var netikt izmantoti, ja trūkst citu barības elementu (Rusch *et al.* 2011). Rezerves vielu uzkrāšana notiek, ja vielu akumulācija pārsniedz augšanai un attīstībai paredzētos daudzumus. Uzņemti tiek kalcija, magnija, smago metālu joni, savukārt, uzglabāti – kālija, magnija joni, fosfora frakcijas (fosfāti, polifosfāti, fosfolipīdi, nukleīnskābes), slāpekļa frakcijas (proteīni, aminoskābes, nitrāti, nukleīnskābes) (Chapin *et al.* 1990). Sākotnējā vielu uzkrāšana un uzglabāšana notiek vakuolās un plastīdās. Uzskata, ka minerālelementiem ir galvenā nozīme (kopā ar gaismu, ūdeni un temperatūru) savvaļas augu augšanas un attīstības nodrošināšanā. Kopumā minerālelementi saglabājas un tiek pārstrādāti, turpretim ogleklis, enerģija un ūdens tiek zaudēti un pārvietoti. Jāņem vērā, ka lielākā daļa savvaļas augu piedzīvo minerālelementu trūkumu, kas saistīts ar minerālelementu daudzumu augsnē un augsnes veidu, sakņu funkciju ierobežojumiem attiecībā uz mitrumu, vai temperatūras limitus. Šīs atšķirības paver iespējas minerālelementiem kontrolēt veģētācijas funkcionālo sastāvu un nodrošina augu izplatību un sukcesijas procesus (Grime *et al.* 1997).

Minerālelementi darbojas kā antagonisti vai sinerģisti un viena elementa pārbagātība vai nepietiekamība augā var izsaukt cita elementa koncentrācijas izmaiņas (Osvalde 2011). Piemēram, ja dzelzs augsnē ir daudz, samazinās pārējo elementu, sevišķi mikroelementu, uzņemšana (Riņķis, Ramane 1989).

Tāpat minerālelementu uzņemšanu ietekmē arī augsnes tips un mitrums. Piemēram, mitrās un sārmainās augsnēs augošiem augiem molibdēna deficītu parasti nenovēro, jo veidojas šķīstoši dzelzs molibdāta kompleksi, savukārt labi aerētās skābās augsnēs veidojas grūti šķīstoši dzelzs oksīda molibdāta kompleksi un molibdēna uzņemšana augos ir apgrūtināta (Fageria, Moreira 2011). Dzelzs trūkuma gadījumā samazinās fotosintētisko pigmentu koncentrācija lapās (Morales *et al.* 2000). Vidējs dzelzs trūkums izraisa PSII reakcijas centru aizvēršanos (Abadía *et al.* 1999).

Augos sastopami arī smagie metāli, kas pat ļoti mazās koncentrācijās ir toksiski. Daļa no šiem elementiem ir neaizvietojamie mikroelementi, piemēram, varš, dzelzs, mangāns, cinks, kobalts, molibdēns, niķelis, kuru toksiskums parādās pie paaugstinātām koncentrācijām (Lambers *et al.* 2008). Pārējie smagie metāli – kadmiji, svins, hroms, dzīvsudrabs, sudrabs, urāns un zelts ir aizvietojamie mikroelementi un tie nav vitāli nepieciešami augu augšanai. Šo elementu toksiskums izpaužas šūnu membrānu caurlaidības izmainīšanā, reaģējot ar metabolītiem vai nomainot elementus enzimatiskajās reakcijās un receptoru proteīnos. Rezultātā samazinās augu augšana, tiek bojātas saknes, samazinās arī fotosintēzes pigmentu daudzums (Fargašová 1998). Kadmiji, varš, dzīvsudrabs, niķelis, svins vai cinks var aizvietot magnija atomu hlorofila molekulā, izjaucot fotosintēzi (Bertrand, Poirier 2005). Mangāns būtiski samazina fotosintēzes pigmentu veidošanu *Sinapis alba* augiem, savukārt vara, niķeļa, molibdēna un vanādija ietekme ir neliela (Fargašová 1998). Arī lauka pupu (*Vicia faba*) lapās samazinās hlorofila saturs palielinot mangāna saturu augsnē (Arya, Roy 2011). Dzīvsudrabs, varš un svins ietekmē PS II aktivitāti donora pusē. Šie metāli ietekmē skābekli izdalošo kompleksu, kur atbrīvo polipeptīdus, kas stabilizē mangāna klasteri (Boucher, Carpentier 1999). Cu^{2+} ietekmē

elektronu transportu PS II bloķējot tirozīnu Z (Tyr_Z) (Burda *et al.* 2003). Vara ietekme uz fotosintēzes pigmentiem *Sinapis alba* augos ir mazāka, nekā cinka vai svina ietekme (Fargašová 2004). Palielinot cinka daudzumu, samazinās proteīnu daudzums un hlorofila saturs lapās, bet palielinās absēcizskābes un prolina saturs (Zengin 2006). Absēcizskābes satura pieaugums, iespējams, saistīts ar auga adaptāciju abiotiskajam stresam, šajā gadījumā, paaugstinātai cinka koncentrācijai.

1.6.1.3. Kalcifilo augu adaptācija videi

Auga spēja uzņemt minerālelementus ir atkarīga no to pieejamības un koncentrācijas augsnē, augsnes skābuma, mitruma, temperatūras, augsnes aerācijas sakņu zonā, kā arī auga vecuma. Svarīgs priekšnoteikums auga spējai uzņemt minerālelementus ir augsnes šķīduma skābums. Ar sakņu izdalījumiem augs iedarbojas uz substrātu un var mainīt augsnes jonu sastāvu, kā arī skābumu. Augam uzņemot slāpekli NO_3^- formā, augsne kļūst sārmaināka, savukārt uzņemot NH_4^+ – skābāka.

Ar kaļķi bagātām augsnēm raksturīga zema smago metālu jonu šķīdība un augsta barības elementu un bikarbonātu jonu koncentrācija. Skābās augsnēs, savukārt, ir zems pH, augsta smago metālu jonu šķīdība un zema minerālelementu pieejamība (www.eplantscience.com/botanical_biotechnology_biology_chemistry/plant_nutrition/essential_elements_macronutrients). Kalcifili augi ir adaptējušies augstajam kalcija saturam augsnē, un apiet pārmērīgu kalcija uzņemšanu lapās, tiem kalcija klātbūtnē ir raksturīgs lielāks fosfora saturs lapās, nekā kalcifobiem augiem, vai augiem, kas auguši skābās augsnēs (Zohlen, Tyler 2004). Augi, kas nav piemērojušies karbonātiskām augsnēm (kalcifobi augi), nespēj no augsnes uzņemt dzelzi un tiem bieži vērojama lapu hloroze (Zohlen, Tyler 1997), jo šādās augsnēs dzelzs atrodas grūti šķīstošu savienojumu sastāvā (Rinķis, Ramane 1989), piemēram, dzelzs oksīdos, kas sārmainās augsnēs šķīst vāji (Velázquez *et al.* 2004).

Auga spēja uzņemt fosforu nav tik atkarīga no augstas augsnes pH vērtības un Ca^{2+} koncentrācijas, kā dzelzs uzņemšana (Fühner, Runge 2009). Fosfora uzņemšanu sārmainās augsnēs ierobežo mazšķīstošu fosfora savienojumu veidošanās ar kalciju (Cakmak 2002). Ar kalciju bagātās sausākās augsnēs kalcifilie augi labāk uzņem dzelzi, cinku un kalciju, savukārt, mitrākās – kāliju, magniju, mangānu un fosforu, tomēr tas atkarīgs no auga sugas (Misra, Tyler 1999). Savukārt, kalcifobiem augiem ir apgrūtināta dzelzs un mangāna uzņemšana ar kalciju bagātās augsnēs (Tyler 1996).

1.6.2. Sausuma ietekme uz fotosintēzi raksturojošajiem parametriem

Augi var izvairīties no fotosintēzes fotoinhibēšanas, samazinot gaismas absorbciju vai palielinot absorbētās gaismas pārpalikuma izkliedēšanu ar fotoķīmiskajiem vai nefotoķīmiskajiem mehānismiem. Viena no adaptācijām ir hlorofila satura samazināšanās, kas nodrošina kopējās gaismas absorbcijas samazināšanos, nesamazinot fotoķīmisko aktivitāti. Lai apietu fotoinhibēšanu, galvenās fotoaizsardzības reakcijas kopā ar iespējamu lapas absorbcijas spējas samazināšanos, ir palielināta fotoelpošana un siltuma izdalīšanās (Galmés *et al.* 2007).

Sausuma ietekmē samazinās hlorofila fluorescences rādītājs F_v/F_m , arī vakarā šis rādītājs ir zemāks, tomēr kontrolētos apstākļos PS II bojājumi parasti neparādās. Iespējams, ka tas saistīts ar palielinātu fotoelpošanu (Naumann *et al.* 2007), samazinās arī PI (Oukarroum *et al.* 2007). Sausuma ietekme uz fotoķīmiskajiem procesiem pārsvarā pētīta kultūraugiem. Piemēram, izmaiņas fotoķīmiskajos procesos sausuma ietekmē parādās pret sausumu jutīgām augu šķirnēm, savukārt, pret sausumu tolerantajām gan hlorofila saturs, gan pārējie ar fotoķīmiskajiem procesiem saistītie rādītāji saglabājas augstā līmenī (Li *et al.* 2006). Savukārt sausākā augsnē augi labāk uzņem minerālelementus, nekā pārāk mitrā (Misra, Tyler 2000). Īslaicīgi samazināts mitruma režīms kukurūzas augiem (*Zea mays*) vai nu neietekmē vai maz ietekmē hlorofila saturu (Schlemmer *et al.* 2005).

1.6.3. Mitruma ietekme uz fotosintēzi raksturojošajiem parametriem

Augsnes applūšana ir viens no abiotiskajiem stresa faktoriem un tas ietekmē sugu sastāvu konkrētajā biotopā. Dabiskajā vidē augoši augi parasti ir piemērojušies ūdens līmeņa svārstībām. Pārmērīgu ūdens daudzumu saņemošās slikti adaptētās sugas cieš no skābekļa trūkuma audos, kas atrodas zem ūdens, kā arī uzņem anaerobo mikroorganismu radītos produktus (Mn^{2+} , Fe^{2+} , S^{2-} , H_2S , karboksilskābes) (Jackson, Colmer 2005), līdz ar to, saindējot augu saknes. Samazinās citokinīnu sintēze saknēs un auga virszemes daļu apgāde ar tiem. Mitro vietu augiem ir raksturīga pielāgošanās videi – skābekļa trūkums tiek aizstāts ar efektīvu iekšējo aerāciju, anoksijas toleranci, un spēju aizkavēt un izlīdzināt oksidatīvos bojājumus reaerācijā (Jackson, Colmer 2005).

Mitruma stresa ietekmē (augiem applūstot) samazinās hlorofila daudzums lapās (Panda *et al.* 2006; Clua *et al.* 2009), kā arī izmainās fotosintēze (Kozłowski 2002). Bez tam vērojama lapu novecošanās un hlorofila degradācija (Ella *et al.* 2003). Tomēr, pret applūšanu tolerantiem augiem lapās vērojams paaugstināts hlorofila saturs (Macek 2006; Das *et al.* 2009). Minerālo elementu (slāpekļa, fosfora un kālija) absorbcija augos pārmitros apstākļos samazinās (Kozłowski 2002). Kopējais slāpekļa daudzums audos samazinās augiem applūstot, jo palielinās nitrātu reduktāzes aktivitāte, kas ir galvenā nitrātu reducētāja. Tomēr ir augi, kam tā samazinās, iespējams, samazinātas nitrātu uzņemšanas dēļ (Liao, Lin 2001).

Pilnīgi applūdušiem augiem, lai atjaunotu kontaktu ar gaisu, etilēna un anoksijas ietekmē notiek dzinumumu pagarināšanās. Bez tam, vērojama lapu novecošanās un hlorofila degradācija (Ella *et al.* 2003). Savukārt, pret applūšanu izturīgiem augiem applūšanas ietekmē lapās vērojams paaugstināts hlorofila saturs (Das *et al.* 2009). Dzinumu pagarināšanās notiek, samazinoties endogēnās abscīzskābes līmenim, ko radījis etilēna pieaugums, un, līdz ar to, palielinās giberelīnu daudzums, kā arī augu jutība pret tiem (Voeselek *et al.* 2003). Savukārt, auksīnu ietekme uz dzinumumu pagarināšanos augiem applūstot nav skaidri zināma (Pierik *et al.* 2005), iespējams, tie ir iesaistīti pastiprinātā kambija augšanā kokaugiem (Yamamoto *et al.* 1995).

Viena no raksturīgākajām mitro vietu augu pielāgojumu sistēmām ir aerenhīmas izveidošanās, kas

ļauj difundēt skābeklim uz leju pa koncentrācijas gradientu (Chen *et al.* 2002; Jackson, Colmer 2005). Applūdušiem augiem raksturīga sakņu atmiršana, tādēļ kā pielāgošanās ir novērojama adventīvo sakņu veidošanās. Galvenie veidi, kas liecina par augu pielāgošanos un sakņu absorbcijas kapacitātes fizioloģisko kompensāciju pārmitros apstākļos ir: 1) pozitīva korelācija starp applūšanas toleranci un adventīvo sakņu veidošanu; 2) pastiprināta augsnes ūdens uzņemšana ar sekojošu adventīvo sakņu veidošanos; 3) rizoferas oksidācija un augsnē izveidojušos toksīnu pārvēršana mazāk toksiskos savienojumos; 4) saknēs sintezēto giberelīnu un citokinīnu pastiprināta piegāde lapām (Kozłowski 2002). Augiem raksturīga arī metaboliskā adaptācija, saglabājot glikozes piegādi un apejot toksisko savienojumu uzkrāšanos (Kozłowski 2002).

Jaunu augu spēja pārdzīvot plūdus atkarīga no to attīstības fāzes, vecuma un plūdu sezonas (Kühne, Bartsch 2007). Fizioloģiskās atbildes uz applūšanu ir: 1) elpošanas metabolisma izmaiņas (saknēs notiek aerobā un anaerobā elpošana), 2) fotosintēzes inhibēšana (raksturīga pazīme – atvārsnišu aizvēršanās, CO₂ absorbcija lapās), 3) proteīnu sintēzes virziena maiņa (augi ražo anaerobos stresa proteīnus, kas piedalās glikolīzes ciklā), 4) minerālās barošanās izmaiņas (zema makroelementu absorbcija, ko parasti nodrošina mikoriza, savukārt palielinās mikroelementu absorbcija, jo piemēram, mangāns un dzelzs veido šķīstošās formas, tomēr augos bieži šie elementi samazinās sakarā ar plūdu izraisīto lēnāku augu augšanu); augiem, kas izturīgi pret applūšanu, minerālelementu absorbcija netiek ietekmēta, 5) samazināta citokinīnu un giberelīnu koncentrācija, palielināta abscīzskābes un etilēna (iesaistīts adventīvo sakņu veidošanā) koncentrācijas, 6) veidojas toksiskie savienojumi, kas izraisa augu bojājumus (Kozłowski 2002).

1.7. Savvaļas augu sēklu dīgšana un to noteicošie faktori

Sēklu dīgšana ir nozīmīgs posms auga dzīvē, tā atkarīga no sēklu kvalitātes, vides apstākļiem un daudzos gadījumos saistīta ar miera periodu. Sēklu dīgšana sākas ar ūdens uzņemšanu un beidzas ar dīglsaknes parādīšanos (Bewley 1997). Miera periods ir adaptīva īpašība, kas veicina sugas izdzīvošanu optimizējot dīgšanu laikā (Kermonde 2005).

1.7.1. Sēklu kvalitāte un izmērs

Sēklu daudzumu var ietekmēt ziedošo augu daudzums (Hunt 2001), kā arī apputeksnētāju klātbūtne. Nektāra daudzums ziedā atkarīgs no ziedu skaita ziedkopā – jo vairāk ziedu ziedkopā, jo mazāk nektāra katrā ziedā. Būtībā augs ražo tik daudz nektāra, lai pievilinātu apputeksnētāju, bet nepārsātinātu to (Lambers *et al.* 2008). Sēklu kvalitāte atkarīga arī no kaitēkļiem. Uzskata, ka sēklas ir apdraudētākas, kamēr tās atrodas mātesaugā (Thompson 1987).

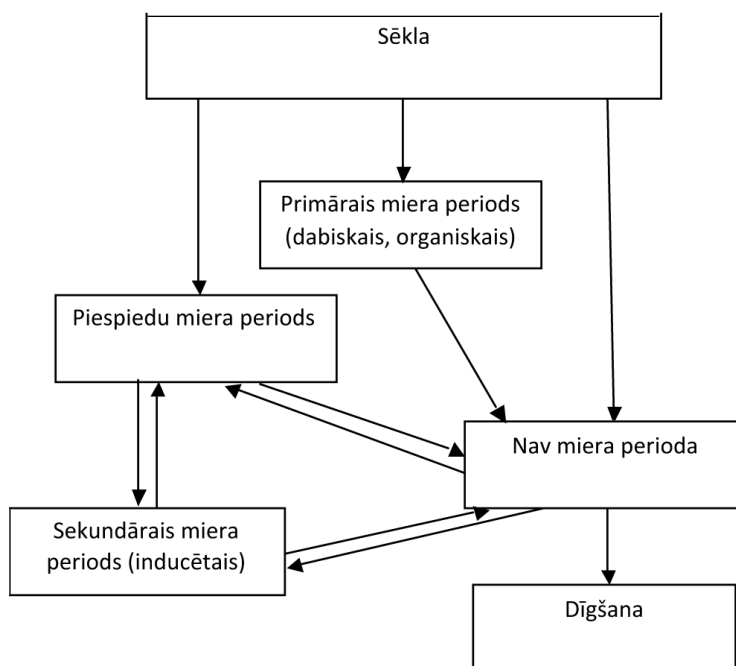
No sēklu izmēra lielā mērā atkarīga dīgsta augšana. Tāpēc sugām, kas aug atklātās vietās, bez spēcīgas konkurences, raksturīgas mazas sēklas, kas palielina iespējamību tām netraucēti izsēties, bet samazina sākotnējās augšanas un izdzīvošanas iespējas mazo iekšējo rezervju dēļ (Lambers *et al.*

2008). Savukārt, *Thompson* (1987) uzskata, ka pastāv negatīva korelācija starp sēklu svaru un dīgstu augšanu. Pētījumā par astoņu *Sarracenia* ģints sugu dīgspēju konstatēts, ka nav saistības starp sēklu svaru, optimālu priekšapstrādes laiku, dīgšanas sākumu un dīgspēju (Ellison 2001). Augiem, kuri aug augtenēs ar lielāku konkurenci dīgstu veidošanās laikā (mežos, pļavās), parasti ir lielākas sēklas. Sēklu izmērs ir saistīts arī ar sēklu skaitu, pie kam, sēklu izmērs slēgtās veģetācijās ir būtisks, lai izdzīvotu (Lambers *et al.* 2008).

1.7.2. Sēklu miera periods

Sēklu dīgšana atkarīga no labvēlīgiem apstākļiem (mitruma, optimālas temperatūras, gaismas, skābekļa). Miera periods ir adaptīva īpašība, kas palīdz augam izdzīvot, un to nosaka ģenētiskie un vides faktori. Vienas sugas robežās var variēt gan miera periodā esošu, gan neesošu sēklu daudzumi, kā arī var būt variācijas starp miera perioda klasēm. Miera periodā esoša sēkla ir sēkla, kas nedīgst normālos dabiskos apstākļos (optimālā temperatūrā, apgaismojumā, mitrumā, skābekļa klātbūtnē). Izšķir vairākus miera perioda veidus (7. attēls).

Primārais (organiskais, dabiskais) miera periods ir miera periods, kuru raksturo nogatavojušās sēklas nespēja dīgt piemērotos apstākļos (Baskin, Baskin 2004). Pēc miera perioda beigām tās vai nu dīgst, vai pāriet sekundārajā miera periodā. Piespiedu miera periods ir tāds miera periods, kad sēkla nedīgst konkrētu vides faktoru ietekmē un bieži vien to neuzskata par miera perioda veidu, bet par mehānismu, kas kavē dīgšanu (Baskin, Baskin 2004). Sekundārais miera periods iestājas, ja sēkla ir izgājusi no primārā miera perioda, bet apstākļi nav piemēroti dīgšanai. Atsevišķi tiek izdalīts nosacījuma miera periods, t.i., tad, kad sēklas pakāpeniski iziet no primārā miera perioda, tās iet caur



7. attēls. Miera periodi un to mijiedarbība pēc sēklu nogatavošanās (modificēts pēc Lambers *et al.* 2008).

nosacījuma (*conditional*) miera periodam, kad tās dīgst tikai konkrētos apstākļos (Lambers *et al.* 2008).

Pilnīgāko primārā (organiskā, dabiskā) miera perioda klasifikāciju izstrādājusi M.G. Nikolajeva un to adaptējuši amerikāņu zinātnieki J. un C. Baskini. Pēc *Baskin, Baskin* (2004), kas izmanto modificēto Nikolajevas shēmu, sēklu miera perioda raksturošanai ir trīs hierarhiskas pakāpes – klase, līmenis un tips.

Izdala piecas miera perioda klases: fizioloģiskais (PD), morfoloģiskais (MD), morfofizioloģiskais (MPD), fiziskais (PY) un kombinētais (PY+PD) (4. tabula). PD ietver trīs līmeņus un piecus tipus seklajā miera periodā. MPD ir astoņi līmeņi un tālāk tipi nav izdalīti, savukārt, PY nav sadalīts.

Visbiežāk sastopamais sēklu miera perioda veids ir seklais PD. Veidi, kā iziet no šī miera perioda, ir atšķirīgi. Ja sēkla atrodas dziļajā miera periodā, tad no tās izdalīts dīgļis veido nenormālu dīgstu, bet, lai dīgstu, sēklām vajadzīgi 3 līdz 4 mēneši aukstās stratifikācijas. Ja sēkla atrodas dziļajā miera periodā, tad giberelskābe (GA_3) neveicina dīgtspēju. Vidējā miera periodā esošās sēklas embrijs, to izdalot no sēklas, veido normālu dīgstu, dīgtspēju veicina GA_3 , kā arī 2 līdz 3 mēneši aukstās stratifikācijas. Seklo miera periodu raksturo tas, ka no tajā esošās sēklas izdalīts embrijs veido normālu dīgstu. Lai izietu no seklā miera perioda, lieto GA_3 , to veicina vai nu aukstā vai siltā stratifikācija, sēklas nobriest sausajā uzglabāšanā, skarifikācija var veicināt dīgšanu (Baskin, Baskin 2004). *Compositae* dzimtas augiem raksturīgs seklais fizioloģiskais miera periods (Baskin, Baskin 2004).

Sēklu dīgšanas un miera perioda mehānisms ietver ABS (inhibitors) un giberelīnu (stimulators) antagonismu. ABS kontrolē sēklas attīstību, miera perioda uzsākšanu, savukārt giberelīni veicina un nodrošina dīgšanu (Kermonde 2005). Šie fitohormoni regulē gan miera perioda sākumu, gan uzturēšanu, gan beigas. Arī etilēns ir iesaistīts šo procesu regulācijā, galvenokārt, samazinot sēklu jutību pret endogēno absēcizkābi. Dabiskos apstākļos dīgšanu ietekmē esošo sēklu daudzums, veiksmīga izsēšanās un drošas vides pieejamība, t.i., tādas, kurā iespējama dīgšana (Shimono *et al.* 2004). Šo drošo vidi ietekmē gan svārstīga temperatūra, gan gaisma vai lapotnes noēnojums, kā arī gadalaiks.

4. tabula. Primārā miera perioda klasifikācija pēc *Baskin, Baskin* (2004)

Miera perioda klase	Miera perioda līmenis	Miera perioda tips
Fizikālais MP (PY)		
Morfoloģiskais MP (MD)		
Fizioloģiskais MP (PD)	Dziļais Vidējais Seklais	1,2,3,4,5
Morfofizioloģiskais MP (MPD)	Dziļais vienkāršais Vidējais vienkāršais Seklais vienkāršais Dziļais vienkāršais epikotila Dziļais vienkāršais dubultais Seklais kompleksais Dziļais kompleksais Vidējais kompleksais	
Kombinētais MP (PY+PD)	Seklais PD	1,2

Savvaļas augiem bieži raksturīga slikta sēklu dīgspēja, kā arī nepieciešami specifiski apstākļi miera perioda pārtraukšanai. Sēklu īpašības, ieskaitot izmēru, miera periodu, dīgšanu un izplatību, ir galvenie auga vēstures komponenti. Dabā sēklas dīgst tikai tad, ja konkrētajā gadalaikā pietiekami ilgi ir apstākļi, lai augs varētu iziet savu dzīves ciklu vai izveidotu pārziemošanas struktūras (Jayasuriya *et al.* 2009).

Ellison (2001) pētīja, vai miera periodu pārtraucošie apstākļi nosacīti variē starp sugām atkarībā no ģeogrāfiskā platumā. Sēklu izmēri dažādām sugām bija dažādi un visām apskatītajām sugām bija morfofizioloģiskais miera periods. Lielākā ģeogrāfiskajā platumā esošajām populācijām bija garāks pirmsdīgšanas (mitrums, aukstums) periods, tomēr dīgšanas apstākļi nebija atšķirīgi. Uzskata, ka dīgspēju var ietekmēt tas, kādā augstumā virs jūras līmeņa sēklas vāktas; palielinoties augstumam virs jūras līmeņa, dīgspēja samazinās (Bu *et al.* 2007).

Pētot dažādu ārstniecības augu miera perioda pārtraukšanu, konstatēts, ka labāko efektu *Saussurea costus* dīgšanai dod aukstumapstrāde (Sharma *et al.* 2006). Savukārt, *Dianthus superbus* subsp. *superbus* labāk dīgst, apstrādājot sēklas ar GA₃, nevis kinetīnu (Mikulík, Vinter 2002). Pētījumā par dažādu *Lonicera* sugu sēklu dīgšanu konstatēts, ka tām ir neattīstīts embrijs (izsējoties pilnībā attīstīti tikai 20 līdz 40%) un katrai sugai ir cits miera perioda tips (Hidayati *et al.* 2000).

Endēmā kaļķainu Lombardijas Alpu pļavu suga *Primula glaucescens* dīgst bez fitohormonu pievienošanas, savukārt, *Physoplexis comosa* dīgst tikai sterilos apstākļos un pievienojot GA₃ (Cerabolini *et al.* 2004).

Sēklu daudzums, kam nav miera perioda, kā arī miera perioda veids, var variēt starp gadiem un sugas robežās, atkarībā no atrašanās vietas ziedkopā vai auglī, no vides ietekmes uz mātesaugu laikā, kad notiek sēklu attīstība (Baskin, Baskin 2004). Alpu sugām raksturīgs lēnāks dīgšanas sākums un svaigu sēklu dīgspēja, līdz ar to ieteicama sausā vai mitrā aukstā stratifikācija (Schwienbacher *et al.* 2011). Mitru vietu augu sēklas piemērojušās periodiskai applūšanai un applūšana to dīgspēju neietekmē. Pastāv viedoklis, ka to dīgšanai nepieciešams pazemināts skābekļa saturs (Geissler, Gzik 2008).

Arī tad, ja sēkla ir saņēmusi vides faktoru kombināciju, kas pārtrauc tās miera periodu, tā var neuzdīgt, ja nav dīgšanai piemēroti apstākļi, kā arī, tā var ieiet sekundārajā miera periodā. Sēklām dīgstot un dīgstam veidojoties, pastāv liela varbūtība, ka tas tālāk neattīstīsies. Ir izpētīts, ka pastāv pozitīva korelācija starp jauno un veco augu skaitu un negatīva korelācija starp dīgstu attīstīšanos un augsnes virskārtas biežumu (Jutila 2003), kas samazina apgaismojuma iespējas.

1.8. Savvaļas augu veģetatīvā vairošanās

Nereti savvaļas augiem raksturīga gan ģeneratīvā, gan veģetatīvā vairošanās. Veģetatīvās vairošanās formas ir dažādas, tās ir veidojušās sugas evolūcijas gaitā, piemērojoties specifiskiem vides apstākļiem (Klimeš, Klimešová 1999; Klimeš 2008). Pēdējās desmitgadēs parādās arvien vairāk pētījumu par vides apstākļu un augu sabiedrību ietekmi uz veģetatīvi vairojošos augu augšanu (Tamm *et al.* 2002; Sammul

et al. 2004; Klimeš 2008). Galvenie faktori, kas raksturo šādus augus, ir veģetatīvā izplatība laikā un telpā un rametu ilgdzīvotība (Groenendael et al. 1996; Tamm et al. 2002). Salīdzinoši daudz sugu ar īsu rametu mūžu un zemu veģetatīvo mobilitāti skaitliski pieaug, palielinoties dzinumu blīvumam un, pieaugot veģetatīvajai izplatībai, maksimālā rametu ilgmūžība palielinās (Tamm et al. 2002). Klimešová et al. (2011) izdala 20 galvenās klonālās augšanas formas un klasificē 16 no tām pēc rametu spējas izplatīties un atdalīties no mātesauga.

Literatūrā nav ziņu par *Saussurea esthonica* veģetatīvās reprodukcijas veidiem, tomēr tas ir viens no būtiskākajiem faktoriem sugas izdzīvošanai ilgtermiņā. Uzskata, ka *S. obvallata* vairojas ģeneratīvi un veģetatīvi (ar sakneņiem) (Dhar, Joshi 2005), savukārt *S. alpina* veido stolonus (Hill et al. 2004). Pētījumā par alpīno augu augšanas formām kā tipisku neklonālu, daudzgadīgu augu ar saknēni izdala *Saussurea gnaphalodes* (Klimešová et al. 2011).

Mainoties vides apstākļiem, klonālās augšanas ātrums var mainīties. Tas var mainīties temperatūras ietekmē (alpīno sugu ložņājošās daļas var izsilt aukstās ziemās), mitruma, minerālelementu pārbagātības vai nepietiekamības ietekmē, augu sabiedrības struktūras maiņas ietekmē (Sammul et al. 2004).

1.9. Molekulāro marķieru tehnikas un to pielietojums augu bioloģijas pētījumos

Ģenētiskajiem faktoriem ir būtiska nozīme sugas saglabāšanā ilgtermiņā, tādēļ arvien lielāka uzmanība tiek veltīta ģenētiskās daudzveidības izpētei populācijās un starp tām. Ģenētiskā daudzveidība tiek dalīta hierarhiski – daudzveidība starp reģioniem, populācijām un indivīdiem populāciju iekšienē. Galvenie evolūcijas spēki, kas nosaka ģenētisko daudzveidību ir mutācijas, dabiskā izlase, migrācija un ģenētiskais dreifs (Barrett, Kohn 1991).

Ģenētiskās daudzveidības izpētei lieto morfoloģiskās, bioķīmiskās un DNS marķieru metodes. Morfoloģiskie marķieri neprasa dārgas tehnoloģijas, taču balstīti tikai uz dažām morfoloģiskajām īpašībām (līdz ar to, polimorfisms ir zems) un atkarīgi no apkārtējās vides ietekmes (Schulman 2007). Kā bioķīmiskos marķierus parasti izmanto izoenzīmus. Tie, tāpat kā morfoloģiskie marķieri, ir atkarīgi no vides ietekmes (Schulman 2007). Šiem marķieriem ir pieejams neliels enzīmu daudzums un līdz ar to daudzveidības atrašana ir ierobežota (Mondini et al. 2009). Jaunākie ir DNS marķieri, t.i., nukleotīdu sekvences, kas atbilst noteiktai vietai genomā, un ko identificē no kopējā genoma. Šai sekvencai jābūt pietiekami polimorfai, lai viegli varētu izsekot atšķirības starp paraugiem. Ideāla molekulāro marķieru tehnika ir: 1) polimorfa un vienmērīgi izplatīta genomā; 2) nodrošina adekvātu ģenētisko atšķirību uzrādīšanu; 3) ģenerē daudz, patstāvīgus un drošus marķierus; 4) viegla, ātra un lēta; 5) analīzei nepieciešams mazs DNS daudzums; 6) ir saistīta ar atšķirīgiem fenotipiem; 7) neprasa sākotnēju informāciju par genomu (Mondini et al. 2009).

Tehnikas atšķiras viena no otras un atkarībā no pētījuma mērķa izvēlas konkrētu metodi. Molekulāro marķieru metodes tiek klasificētas dažādi. Viens no iedalījumiem ir PCR tehnikas izmantošana

vai neizmantošana, t.i., uz polimerāzes ķēdes reakciju (PCR) balstītās un ne-PCR tehnikas jeb uz hibridizāciju balstītās. Metodes, kuru pamatā ir PCR, iedala divās grupās: 1) metodes, kas detektē specifiskus, klonētus un sekvenētus rajonus genomā; 2) metodes, kurās izmantoti konservatīvie vai nespecifiskie praimerī, kas amplificē no daudz anonīmām vietām genomā (Schulman 2007). DNS marķieru metodes iedala arī pēc marķieru veida, t.i., genomiskā DNS marķieri, uz transpozonu elementiem bāzētie marķieri, hloroplastu, mitohondriālie, ribosomālās DNS marķieri (Mondini *et al.* 2009). Hloroplastu un mitohondriju genomu ziedaugos nodod pa mātes līniju un bieži filoģenēzes pētījumos izmanto marķierus, kas veidoti uz šo organoīdu sekvencēm (Caputo 1997; Ieviņa *et al.* 2009).

Galvenais uzdevums sugas saglabāšanas stratēģijas izstrādē ir pietiekoši plaša ģenētiskās daudzveidības spektra saglabāšana, tāpēc ir būtiski sākotnēji izprast populācijas ģenētiskās daudzveidības līmeni (Holsinger, Gottlieb 1991), kā arī to, kā ģenētiskā daudzveidība sadalīta starp populācijām. Viens no risinājumiem ir izmantot molekulāro marķieru metodes.

DNS marķieru metodes plaši lieto ģenētiskās daudzveidības pētīšanai (Agarwal *et al.* 2008), tomēr pārsvarā ir pētīti lauksaimniecības augi, līdz ar to, pieejams plašs informācijas apjoms par to sekvencēm, kā arī daudzi un dažādi marķieri (Varshney *et al.* 2005). *Saussurea* ģints ir maz pētīta ar molekulārajiem marķieriem, jo tā ir liela un sugu iekšienē ir liela daudzveidība (Raab-Straube 2003; Wang, Liu 2004), līdz ar to, izpēte ir apgrūtināta. Molekulārie marķieri *Saussurea* ģints sugām nav izveidoti, tāpēc molekulārajos pētījumos izmanto anonīmos marķierus. Analīžu pamatā ir PCR reakcija un sākotnējā informācija par sekvencēm nav nepieciešama.

1.9.1. Amplificēto fragmentu garuma polimorfisms (AFLP)

Amplificēto fragmentu garuma polimorfisms (*Amplified Fragment Length Polymorphism*; AFLP) ir labi zināma anonīmo marķieru metode, izveidota 20. gs. 90. gados (Vos *et al.* 1995), ko lieto ģenētiskās daudzveidības pētījumos (Fjellheim, Rognli 2005; Duffy *et al.* 2009; Lauterbach *et al.* 2012), lai atrastu tuvradniecīgus indivīdus pasugas līmenī, kā arī gēnu kartēšanai (Mondini *et al.* 2009). Metodei ir trīs posmi: 1) DNS restrikcija un oligonukleotīdu adapteru ligēšana, 2) restrikcijas fragmentu selektīva amplifikācija, 3) amplificēto fragmentu analīze.

Šī metode uzrāda polimorfismu restrikcijas enzīmu vietās amplificējot visus fragmentus, ko konkrētais enzīmu pāris ir ģenerējis starp ligējošajiem adapteriem PCR reakcijā (Vos *et al.* 1995). Kopumā AFLP uzrāda variācijas vienā vai dažās nukleotīdu pozīcijās, salīdzinot ar retrotranspozonu praimeriem, kas piedāvā iespēju detektēt lielu daudzumu nukleotīdu inserciju vietās (Schulman 2007). Praimeru pāris parasti producē 50 līdz 100 fragmentus (Mondini *et al.* 2009). Lietojot šo metodi, nav nepieciešami sekvenču dati. AFLP metodi izmanto ģenētisko karšu veidošanā, klonu izdališanai, kā arī klonētu segmentu atpazīšanai (Vos *et al.* 1995).

1.9.2. Starppraimeru piesaistes rajoni (iPBS)

Viena no jaunākajām DNS marķieru tehnikām ir iPBS (starppraimeru piesaistes rajoni, *inter-primer binding sites*), kas veidota, izmantojot retrotranspozonu sekvences. Retrotranspozoni ir mobilie elementi genomā, atrasti visos eikariotos. Augos ar lielu genomu retrotranspozoni ir galvenā atkārtotā (*repetitive*) DNS klase (Kumar, Bennetzen 1999). To galvenās priekšrocības ir tās, ka tie ir visur, uzrāda lielu kopiju skaitu (ir heterogēni), ir plaši izplatīti hromosomās, uzrāda inserciju polimorfismu gan sugu iekšienē, gan starpsugu līmenī (Kumar, Bennetzen 1999).

Pamatojoties uz retrotranspozonu strukturālo organizāciju, tos iedala divās apakšklasēs: garie pēdējie (nobeiguma) tiešie atkārtojumi (LTRs, *long terminal direct repeats*), kas dalās *gypsy-like* un *copy-like* un ne-LTR retrotranspozoni (*LINE 1-like*) (Agarwal *et al.* 2008; Kalendar 2011). Retrotranspozoni var amplificēties un pārvietoties uz citu vietu genomā ar RNS kā starpnieku. Šī transpozīcija inducē ģenētisko polimorfismu, ko var detektēt PCR reakcijā ar praimeriem, kuru pamatā ir retrotranspozonu sekvences. Retrotranspozoni aktivējas stresa apstākļos un var būt atbildīgi par pārkārtojumiem genomā (Schulman 2007; Grandbastien 1998). iPBS praimeru pieder pie LTR apakšklases un veidoti izmantojot retrotranspozonu konservatīvās sekvences (Kalendar *et al.* 2010). Analīzes ar šiem marķieriem ir tehniski relatīvi vienkāršas un neprasa sekvenču datus (Kalendar *et al.* 2010), tie parāda polimorfismu starp indivīdiem (Kalendar 2011), tādēļ to tos var lietot sugām, kam nav izstrādātas marķieru sistēmas.

1.9.3. Iekšējie transkribētie rajoni (ITS)

Kodola ribosomālās DNS (rDNS) iekšējie transkribētie rajoni (*Internal transcribed spacers*; ITS) tiek plaši lietoti filoģenēzes pētījumos (Baldwin 1992; Lee *et al.* 2002; Martins, Hellwig 2005; Sonboli *et al.* 2012). Šo metodi plaši lieto tādēļ, ka ITS reģioniem visos dzīvajos organismos ir vienāda struktūra un funkcijas. Kodējošie reģioni pārstāv konservatīvās eikariotu sekvences (Poczai, Hyvönen 2010). Šo DNS marķieru priekšrocības ir no abiem vecākiem pārmantoto īpašību uzrādīšana atšķirībā no hloroplastu un mitohondriālajiem marķieriem, PCR reakcija ar universālajiem marķieriem un vidēja izmēra fragmentu amplifikācija, kas ļauj tos viegli sekvenēt, kā arī DNS polimorfisms līmenī, kas ļauj tos izmantot evolūcijas pētījumos sugas un ģints līmenī (Poczai, Hyvönen 2010). Auga genomā ir ļoti daudz ITS kopiju, līdz ar to pastāv variācijas iespēja starp dažādiem atkārtojumiem vienā genomā un iespēja (sevišķi poliploīdo un hibrīdo augu izpētē) iegūt kļūdainus rezultātus (Poczai, Hyvönen 2010).

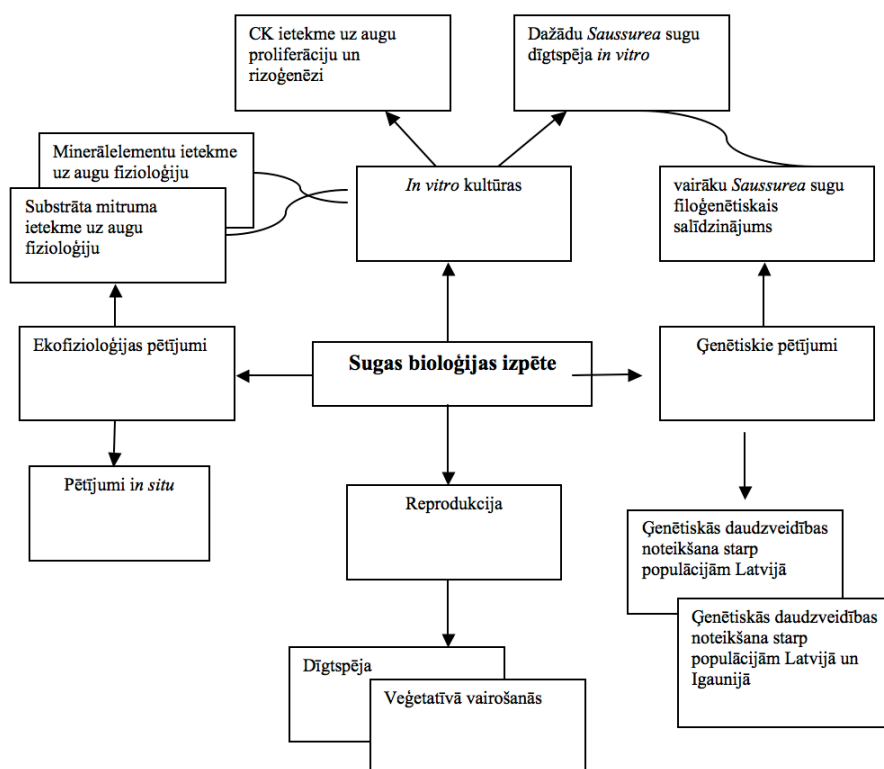
2. Materiāls un metodes

2.1. *Saussurea esthonica* bioloģijas raksturošanā ietvertie pētījumi

Sugas bioloģijas vispusīgai raksturošanai veiktie pētījumi shematiski parādīti 8. attēlā. Lai netraumētu dabisko populāciju, fizioloģiskajiem pētījumiem kontrolētos apstākļos izmantoja *in vitro* pavairotus augus. Savukārt, ekofizioloģiskajos pētījumos dabiskajās atradnēs *in situ*, lai saudzīgi izturētos pret populāciju, ar nedestruktīvām metodēm noteica hlorofila saturu un hlorofila *a* fluorescenci, tādējādi gūstot priekšstatu par izmaiņām PS II un, līdz ar to, izmaiņām fotosintēzes norisē (skat. 2.4. nodaļu). Lai nodrošinātu maksimāli drošu dīgstu ieguvu, ko tālāk izmantot DNS izdalīšanai un filoģenētiskajiem pētījumiem, *Saussurea* ģints sugu sēklas dziedēja *in vitro* apstākļos (skat. 2.3.1. nodaļu).

2.2. Pētījumu vietas un apstākļi

Ekofizioloģiskos pētījumus dabiskajās *S. esthonica* augšanas vietās *in situ* veica un lapas ģenētiskajām analīzēm ievāca abās populācijās Latvijā (turpmākajā tekstā populācijas nosauktas tuvākās apdzīvotās



8. attēls. *Saussurea esthonica* sugas bioloģijas vispusīgai izpētei veikto pētījumu shēma.



9. attēls. Pētītās *Saussurea esthonica* populācijas Latvijā un Igaunijā.

vietas vārdā, t.i., Apšuciems un Pope) un divās populācijās Igaunijā (Pärnu-Jaagupi un Kalevi) (9. attēls).

Latvijas *S. esthonica* atradnes ir ar īpašu juridisko statusu kā īpaši aizsargājamas un Natura 2000 teritorijas: mikroliegums „Dubļukrogs“ netālu no Apšuciema (LV0531900, E23°18'43", N57°02'38") un dabas liegums „Popes zāļu purvs“ netālu no Popes (LV0830400, E21°51'28", N57°22'26"). Abām atradnēm raksturīgs zāļu purvs ar kaļķainu augsni. Bez tam, šajās atradnēs aug arī aizsargājamās sugas *Carex davalliana*, *Pinguicula vulgaris*, *Dactylorhiza fuscii*, *Dactylorhiza incarnata*, *Primula farinosa*, *Platanthera bifolia* (Pope) un *Schoenus ferrugineus*, *Dactylorhiza incarnata*, *Gymnadenia conopsea*, *Primula farinosa* (Apšuciems) (<http://eunis.eea.europa.eu>). Igaunijas *S. esthonica* atradnes ir aizaugusi pļava pie Pärnu-Jaagupi un zāļu purvs pie Kalevi.

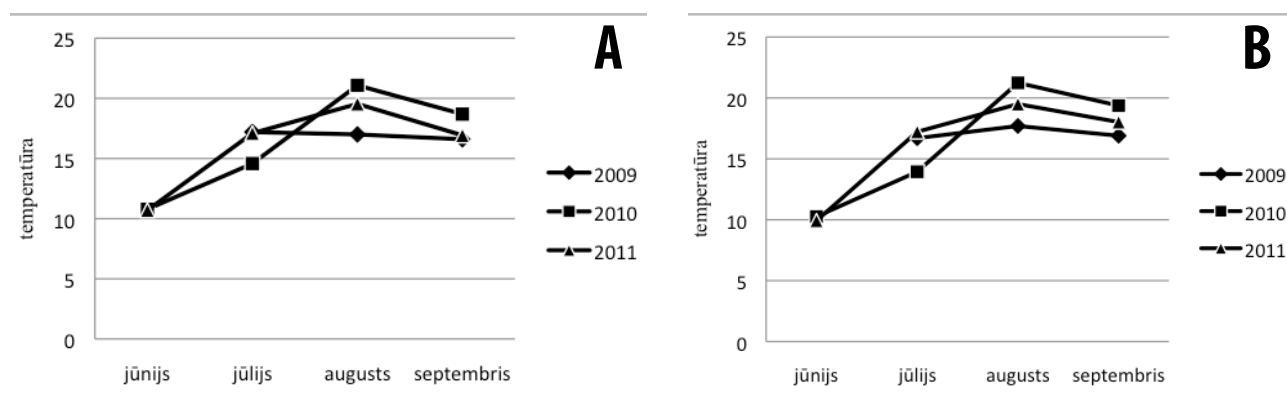
Augsnēm *S. esthonica* atradnēs raksturīgs labs slāpekļa nodrošinājums (izņemot Popi un Kalevi), pazemināts fosfora saturs (izņemot Pärnu-Jaagupi), kā arī augsts kalcijs saturs, kas samazinājās secībā Apšuciems > Pope > Kalevi > Pärnu-Jaagupi (5. tabula). Magnija saturs augsnē būtiski atšķīrās starp atsevišķām atradnēm, samazinoties secībā Pärnu-Jaagupi > Kalevi > Apšuciems > Pope un bija no nedaudz pazemināta Popē līdz augstam Kalevi un Pärnu-Jaagupi. Krasas atšķirības bija novērojamas sēra saturā – ja Apšuciema augsnē tas ievērojami pārsniedza optimālo līmeni, tad pārējās atradnēs bija novērojams sēra deficīts. Turpretī, dzelzs saturs visās atradnēs ievērojami pārsniedza normu, izņemot augsni Popes atradnē. Mangāna saturs bija krasi paaugstināts Apšuciema augsnē, paaugstināts

5. tabula. Augsnis raksturojums un minerālelementu sastāvs (mg L^{-1}) 1 M HCl izvilkumā pētītajās *S. esthonica* atradnēs. Ar vienādiem burtiem apzīmētie rezultāti viena minerālelementa robežās nebija statistiski atšķirīgi. Dati iegūti sadarbībā ar Dr. biol. Andi Karlsonu (LU Bioloģijas institūts)

Elements	Apšuciems	Pope	Pārnu-Jaagupi	Kalevi
N	126 ± 12 a	61 ± 10 b	124 ± 10 a	73 ± 2 b
P	40 ± 2 a	54 ± 16 ab	225 ± 29 c	68 ± 5 b
K	76 ± 17 a	87 ± 22 a	49 ± 4 b	58 ± 10 b
Ca	54 700 ± 6 307 a	13 167 ± 3 415 b	7 267 ± 996 c	9 583 ± 910 d
Mg	306 ± 10 a	248 ± 45 b	1 805 ± 671 c	747 ± 77 d
S	600 ± 25 a	45 ± 8 b	19 ± 2 c	20 ± 2 c
Fe	5 350 ± 400 a	240 ± 33 b	1 958 ± 80 c	1 581 ± 80 d
Mn	883 ± 233 a	38 ± 6 b	172 ± 22 c	60 ± 17 b
Zn	7.2 ± 0.6 a	7.2 ± 1.5 a	6.3 ± 1.1 a	6.0 ± 0.9 a
Cu	1.4 ± 0.1 a	1.6 ± 0.4 ab	4.8 ± 0.7 c	1.9 ± 0.2 b
Mo	0.06 ± 0.01 a	0.05 ± 0.01 ab	0.04 ± 0.00 b	0.04 ± 0.00 b
B	14.5 ± 1.8 a	2.6 ± 0.6 b	1.3 ± 0.4 c	2.9 ± 0.5 b
Na	46 ± 5 a	23 ± 4 b	–	–
pH	7.3 ± 0.0 a	6.6 ± 0.1 b	6.2 ± 0.2 b	6.4 ± 0.1 b
EC (mS m^{-1})	2.9 ± 0.2 a	0.7 ± 0.1 b	0.7 ± 0.1 b	0.6 ± 0.1 b

Pārnu-Jaagupi augsnē un tuvu optimumam pārejās divās atradnēs. Savukārt, cinka koncentrācija bija līdzīga visās atradnēs un visumā optimāla kultūraugiem, bet vara saturs bija nedaudz pazemināts visās populācijās izņemot Pārnu-Jaagupi. Molibdēna saturs augsnē visās atradnēs bija tuvu optimumam, bet bora līmenis bija krasi paaugstināts Apšuciemā un arī pārejās atradnēs, izņemot Pārnu-Jaagupi, tā saturs pārsniedza kultūraugu optimumu. Apšuciema augsne atšķirās ar vissārmaināko reakciju, bet pārejās atradnēs būtiski neatšķirās. Līdzīgi tam, Apšuciema augsne atšķirās ar visaugstāko kopējo augsnes sāļumu.

Apkopojot datus par vidējām gaisa temperatūrām sezonas laikā pētījumu gados, nevarēja novērot būtiskas atšķirības starp *S. esthonica* atradnēm, bet bija pamanāmas dažas vispārējas tendences (10. attēls). Salīdzinot atsevišķas sezonas un mēnešus, varēja konstatēt, ka 2010. gada jūlijs bija salīdzinoši vēsāks, bet šī paša gada augusts bija vissiltākais. Arī septembrī visaugstākā vidējā gaisa temperatūra bija 2010. gadā. Savukārt, augustā viszemākā vidējā temperatūra bija novērojama 2009. un 2011. gadā.



10. attēls. Gaisa temperatūras sezonālās izmaiņas 2009., 2010. un 2011. gadā Latvijas populācijām tuvākajās meteostacijās Mērsragā (A) un Ventspilī (B).

2.3. Pētījumi *in vitro* kultūrā

2.3.1. Dažādu *Saussurea* sugu dīgtspēja

No 14 botāniskajiem dārziem caur sēklapmaiņas sistēmu *Index Seminum* saņēma *Saussurea* 11 Eiropas un Āzijas sugu sēklu paraugus (6. tabula). Sēklām bija dažādi izmēri un kvalitāte. Pirms dezinfekcijas tās mērcēja 40 līdz 60 min. KMnO_4 šķīdumā, dezinficēja ar balinātāju ACE (4.5% aktīvās vielas): destilēts ūdens 1:1 (v/v) 15 līdz 30 min. Izmantoja divus modificētas *Murashige & Skoog* (1962; MS) barotnes variantus: (1) ar $\frac{1}{2}$ MS makroelementu sāļiem, 2% saharozi, 0.6% agaru un (2) ar $\frac{1}{4}$ MS makroelementu sāļiem, 2% saharozi, 0.6% agaru, papildinātu ar 0.2 mg L^{-1} kinetīnu. Kultūras audzēja audzējamajā telpā $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ temperatūrā ar fotoperiodu 16 h, fotosintētiski aktīvās radiācijas fotonu plūsmas blīvums $40 \mu\text{mol s}^{-1} \text{ m}^{-2}$. Uzskaitīja inficētās sēklas, aprēķināja dīgtspēju procentos un dīgšanas laiku dienās.

6. tabula. *In vitro* apstākļos diedzētie *Saussurea* ģints sugu sēklu paraugi. Sugu izplatības areāls pēc *Lipschitz* (1979). Sēklas vāktas dabīgajās populācijās (*); sēklas vāktas botāniskajā dārzā (**)

Suga	Donorinstitūcija	Ievākšanas vieta	Sugu izplatības areāls
<i>S. albescens</i>	Vācija, HBU Bonna	**	Himalaji
<i>S. alpina</i> (1)	Austrija, HBU Grāca	*Raxplateau, 1650m	Arktiskais reģions,
<i>S. alpina</i> (2)	Itālija, Cogne (Asota) H Alpino Paradisia	**	Eiropa, Āzija,
<i>S. alpina</i> (3)	Norvēģija, Oslo Universitātes BD	*Norvēģija: Oppland, Vågā, Maurvangen, 970 m	Mongolija, Ķīna
<i>S. alpina</i> (4)	Itālija, Cogne (Asota) H Alpino Paradisia	*	
<i>S. alpina</i> (5)	Islande, Akureiri BD	**	
<i>S. alpina</i> (6)	Norvēģija, Oslo Universitātes BD	*Norvēģija: Oppland, Vågā, Gjendesheim, 1000 m	
<i>S. alpina</i> (7)	Norvēģija, Oslo Universitātes BD	*Norvēģija: Oppland, Vågā, Bessheim, 1000 m	
<i>S. alpina</i> (8)	Norvēģija, Oslo Universitātes BD	*Norvēģija: Oppland, Vågā, Russlia, 950 m	
<i>S. alpina</i> (9)	Norvēģija, Oslo Universitātes BD	*Norvēģija: Oppland, Øystre Slidre, Døraåni, 1261 m	
<i>S. alpina</i> (10)	Itālija, Turīna HBU direction de „Chanousia”	**	
<i>S. alpina</i> (11)	Slovākija, P.J. Šafárik Universitātes BD	*Lomnica, Slovākija State forests of Tatra National Park, Tatranska	
<i>S. alpina</i> subsp. <i>depressa</i>	Itālija, Turīna HBU direction de „Chanousia”	**	
<i>S. candicans</i>	Lietuva, Šauļu HBU	**	Afganistāna, Pakistāna, Himalaji
<i>S. discolor</i> (1)	Austrija, Bundesgarden	* Schneeberg 1800-2050 m	Eiropas Alpi,
<i>S. discolor</i> (2)	Itālija, Cogne (Asota) H Alpino Paradisia	**	Karpatu kalni, Apenīni
<i>S. maximowiczii</i>	Japāna, Okamoto Ofuna HB	**	Ķīna, Tibeta
<i>S. neopulchella</i>	Krievija, Vladivostoka HBA	*Rošma upe	
<i>S. nipponica</i>	Itālija, Cogne (Asota) H Alpino Paradisia	**	
<i>S. parviflora</i>	Krievija, Sankt-Pēterburga HBIB	*pie Ulan-Udes	
<i>S. pulchella</i> (1)	Krievija, Vladivostoka HBA	**	Sibīrija, Mongolija, Ķīna,
<i>S. pulchella</i> (2)	Krievija, Vladivostoka HBA	* Teljakovska līcis	Koreja, Japāna
<i>S. pygmaea</i>	Islande, Reikjavikas BD	**	Eiropas Alpi, Karpatu kalni
<i>S. riederi</i> (1)	Igaunija, Tallinas BD	**	Kamčatka, Japāna,
<i>S. riederi</i> (2)	Itālija, Cogne (Asota) H Alpino Paradisia	**	Kuriļu salas

2.3.2. Citokinīnu ietekme uz *S. esthonica* proliferāciju un rizogēnēzi

Audu kultūrā pavairotos *S. esthonica* indivīdus eksperimenta uzsākšanai saņēma no Nacionālā Botāniskā dārza Augu valsts bioloģiskās daudzveidības *in vitro* saglabāšanas nodaļas. Tos tālāk pavairoja MS barotnēs, kam pievienots 0.5 mg L⁻¹ BAP, 3% saharoze, 0.6% agars. Divas nedēļas jaunus dzinumus kultivēja bezhormonu barotnē un tad pārnesa uz barotnēm ar ½ vai 1 MS makroelementu sāļiem, 3% saharozi, 0.6% agaru, un citokinīniem. Lietoja šādus citokinīnus: kinetīnu 0.5, 1.0, 1.5 un 2.0 mg L⁻¹; N⁶-(Δ 2-izopentenil)-adenīnu (2-iP) – 0.25, 0.5, 0.75 un 1.0 mg L⁻¹ vai 6-benzilaminopurīnu (BAP) – 0.25, 0.5, 0.75 un 1.0 mg L⁻¹. Kā kontroli izmantoja bezhormonu barotni ar ½ vai 1MS makroelementiem. Barotnes pH pirms autoklavēšanas bija 5.9. Dzinumus audzēja 300 mL kultivēšanas traukos, kuros ielieti 50 mL barotnes. Katrā variantā bija 30 mikrodzinumi trīs atkārtojumos. Pēc četrus nedēļas kultivēšanas uzskaitīja dzinumus veidojošos eksplantus, dzinumu un sakņu skaitu. *In vitro* kultūras audzēja telpā 24 ± 2 °C temperatūrā ar fotoperiodu 16 h, fotonu plūsmas blīvumu 40 μmol s⁻¹ m⁻². Saknes, kas izveidojās barotnēs ar kinetīnu un 2-iP, ieskenēja izmantojot skeneri *Perfection V750 PRO* (Epson) un, lai novērtētu sakņu morfoloģiju, analizēja izmantojot attēla analīzes sistēmu *WinRHIZO* 2008. Izmērija kopējo auga sakņu garumu, laukumu, vidējo diametru un galiņu skaitu. Datus parādīja kā vidējos no trim atkārtojumiem ± standartklūda (SE). Būtiskuma līmeni starp vidējiem lielumiem noteica ar ANOVA vienfaktora analīzi.

2.4. Ekofizioloģiskie pētījumi

2.4.1. Izmantotie mēraparāti un noteiktie parametri

Pētījumos izmantoja hlorofilmetru *SPAD 502* (Konica-Minolta, Japāna) un hlorofila fluorometru *Handy PEA* (Hansatech Instruments, Lielbritānija).

Ar hlorofilmetru noteica relatīvo hlorofila daudzumu lapās, mērot gaismas absorbciju (optiskā blīvuma atšķirības) divos viļņu garumos (sarkano 650 nm un tuvo infrasarkanā 940 nm). Hlorofila saturu izteica SPAD vienībās. Ar hlorofilmetru noteiktais hlorofila daudzums ir tieši proporcionāls hlorofila koncentrācijai lapā (Samsone *et al.* 2007).

Ar nepārtrauktās darbības hlorofila fluorometru *Handy PEA* mērīja ātrās fluorescences indukcijas līknes un analizēja hlorofila a fluorescences rādītājus. Visos analizētajos paraugos noteica piecus parametrus (Strasser *et al.* 2004).

1. F_v/F_m raksturo PS II maksimālā kvantu efektivitāte. Raksturo fotosintēzes fotoinhibēšanas pakāpi nelabvēlīgu apstākļu ietekmē, tāpēc to var izmantot par auga piedzīvotā stresa pakāpes rādītāju, ja tas ir mazāks par 0.8.

2. *Performance Index* (PI) ir auga vitalitātes rādītājs; to veido trīs komponenti: (1) reakciju centru blīvums, (2) gaismas reakciju efektivitāte saistībā ar primārās fotoķīmijas maksimālo iznākumu, (3) parametrs, kurš saistīts ar tumsas reakciju efektivitāti ($\log(1-V_j)/V_j$).

3. F_v/F_0 ir maksimālais PS II fotoķīmijas primārais iznākums, kas raksturo tās fotoķīmisko aktivitāti.

4. RC/ABS parāda PS II reakciju centru koncentrācijas un antenu hlorofila attiecību, raksturojot aktīvo / neaktīvo reakciju centru attiecību PSII.

5. $(1-V_j)/V_j$ (V_j ir relatīvi mainīgā fluorescence 2 ms).

2.4.2. Pētījumi dabiskos apstākļos

S. esthonica ekofizioloģiskos pētījumus *in situ* veica abās Latvijas atradnēs veģetācijas periodā reizi mēnesī (2009. gadā jūlija, augusta un septembra sākumā, 2010. un 2011. gadā jūnija, jūlija, augusta un septembra sākumā), kā arī 2009. līdz 2011. gada jūlijā divās Igaunijas atradnēs. Katrā mērīšanas reizē katrā atradnē veica vismaz 8 ziedošo (turpmāk tekstā minēti kā ģeneratīvie augi) un 7 veģetatīvo augu analīzes, mērot visu pieaugušo lapu hlorofila saturu ar hlorofilmetru un izdarot trīs līdz piecu lapu hlorofila *a* fluorescences analīzi ar fluorometru. Par ziedošajiem (ģeneratīvajiem) augiem darbā nosaukti tie augi, kas konkrētajā gadā zied, savukārt, par veģetatīvajiem tie, kas veido tikai lapu rozetes.

Hlorofila analīzes katrai lapai izdarīja piecas līdz desmit reizes, atkarībā no lapas izmēra, un aprēķināja vidējo lielumu, izmantojot hlorofilmetra iekšējo funkciju. Katram augam noteica lapu vidējo hlorofila saturu, kuru tālāk izmantoja veģetatīvo un ģeneratīvo īpatņu vidējā hlorofila satura un standartklūdas aprēķināšanai katrā atradnē konkrētajā mēnesī. Fluorescences analīzei lapas aptumšoja vismaz 20 min, uzliekot oriģinālo plastmasas klipsi. Aprēķināja auga vidējos fluorescences rādītājus, kurus tālāk izmantoja veģetatīvo un ģeneratīvo īpatņu vidējo fluorescences parametru un standartklūdu aprēķināšanai dotajā atradnē konkrētajā mēnesī.

Lai noskaidrotu temperatūras un nokrišņu ietekmi uz populācijām, apkopoja meteorinformāciju, ko ieguva no pētītajām populācijām tuvākajām meteostacijām (Mērsragā un Ventspilī) Latvijas Vides, ģeoloģijas un meteoroloģijas centra (LVĢMC) mājas lapā <http://www.meteo.lv> (2009. gadā) un interneta lapā <http://rp5.ru> (2010. un 2011. gadā).

2.4.3. Eksperimenti kontrolētos apstākļos

2.4.3.1. Minerālvielu sastāva ietekme

Eksperimentā izmantoja četrus dažādus substrātus, kas atšķirās ar minerālvielu sastāvu tajos (7. tabula). Kontroles varianta substrātā minerālvielas bija tādā sastāvā un koncentrācijā, kas optimāla lielākajai daļai kultūraugu, bet, tā kā *S. esthonica* ir kalcifila suga, papildus pievienoja dolomīta miltus. Otrā varianta substrāta minerālvielu sastāvs bija līdzīgs Apšuciema atradnes augsnei. Trešā varianta augsnes sastāvs bija līdzīgs Popes atradnes augsnei, bet ceturtais varianta augsne bija kā trešajā variantā, atšķiroties tikai ar palielinātu N un S saturu. Substrātu receptūru izstrādāja Dr. biol. Andis Karlsons LU Bioloģijas institūta Augu minerālās barošanās laboratorijā. Audzēšanas substrātus veidoja uz SIA „Laflora” ražoto kūdras substrātu KKS-1 un KKS-M3 pamata.

In vitro pavairotus *S. esthonica* augus pārstādīja pa vienam plastmasas veģetācijas traukos (9 × 9 × 10 cm) ar atbilstošu eksperimentālo substrātu, kad tiem bija attīstījušās trīs lapas un trīs nedēļas

7. tabula. Minerālelementu sastāvs (mg L^{-1}) substrātos minerālelementu ietekmes eksperimentam kontrolētos apstākļos

Elements	Kontrole (1.)	Apšuciems (2.)	Pope (3.)	Pope + (4.)
N	120	126	61	120
P	155	74	74	74
K	390	155	155	155
Ca	14800	13167	13167	13167
Mg	5450	306	300	300
S	120	250	22	120
Fe	265	3983	240	240
Mn	45	883	38	38
Zn	1.5	7	7	7
Cu	2.2	1.65	1.65	1.65
Mo	0.04	0.05	0.05	0.05
B	0.1	2.03	1.33	1.33
Na	30	30	30	30

ļāva aklimatizēties. Katrā eksperimenta variantā bija 10 augi. Augus kultivēja klimata kamerā *Selecta* (fotoperiods 16/8 h, fotonu plūsmas blīvums $40 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$, temperatūra 23/20 °C). Augus nepieciešamības gadījumā laistīja ar destilētu ūdeni. Eksperiments ilga 16 nedēļas un pirmajā, piektajā, devītajā, trīspadsmītajā un sešpadsmitajā nedēļā vizuāli noteica augu stāvokli to izsakot kā vitalitāti ballēs no 1 līdz 5 (0 – augam nav virszemes daļu, 5 – izcils), augošo augu daudzumu (%) un lapu skaitu.

Reizi nedēļā (piektdienās) mērīja hlorofila saturu lapās un hlorofila *a* fluorescenci. Šim nolūkam izmantoja 3 līdz 6 individuālos augus no katra eksperimentālā varianta. Hlorofila saturu mērīja visās atbilstošā lieluma lapās ar hlorofilmetru, veicot piecus līdz desmit nolasījumus un aprēķinot vidējo hlorofila saturu lapā, izmantojot hlorofilmetra funkciju. Katram augam aprēķināja vidējo hlorofila saturu, kuru izmantoja konkrētā varianta vidējā hlorofila satura un standartklūdas aprēķināšanai konkrētajā nedēļā. Hlorofila *a* fluorescences analīzei izmantoja trīs līdz piecas individuālā auga lapas, kuras aptumšoja ar standarta plastmasas klipšiem vismaz 20 min. Katram augam aprēķināja vidējo fluorescences parametru vērtību, kuru izmantoja, lai iegūtu dotā varianta vidējo vērtību un standartklūdu aprēķināšanai konkrētajā nedēļā.

2.4.3.2. Mitruma režīma ietekme

Eksperimentā izmantoja 4. varianta substrātu (skat. 7. tabulu). Audu kultūrā pavairotus *S. esthonica* augus pārstādīja pa vienam plastmasas veģetācijas traukos ($9 \times 9 \times 10$ cm) ar atbilstošo substrātu, kad tiem bija attīstījušās trīs lapas. Augiem atļāva iesakņoties un pēc trim nedēļām sadalīja četrās eksperimentālajās grupās, kas atšķīrās ar laistīšanas režīmu. Priekšmēģinājumos noteica laistīšanas režīmu, kas nodrošināja vizuāli optimālu, mēreni sausu, mitru un slapju augsni. Lai uzturētu atbilstošo laistīšanas režīmu, optimālā režīma gadījumā uzturēja 100% individuālo trauku (kopā ar substrātu un augu) masu, mērenā sausuma variantā tā bija 90% no optimālā varianta masas, bet mitrajā variantā – 150% no optimālās masas. Slapjo režīmu uzturēja, traukus ar augiem ievietojot ūdenī 3 cm dziļumā, kā

rezultātā trauku masa sasniedza 200% no optimālā varianta masas. Katrā eksperimenta variantā bija 3 līdz 6 individuāli augi.

Augus kultivēja klimata kamerā *Selecta* (fotoperiods 16/8 h, fotosintētiski aktīvās radiācijas fotonu plūsmas blīvums $40 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$, temperatūra 23/20 °C). Eksperiments ilga 13 nedēļas un reizi nedēļā (piektdienās) mērija hlorofila daudzumu un hlorofila *a* fluorescences rādītājus. Mērījumu izdarīšana un atkārtojumu skaits bija identiski iepriekš aprakstītajam (skat. 2.4.3.1. nodaļu). Savukārt, pirmajā, trešajā, sestajā, devītajā, vienpadsmitajā un trīspadsmitajā nedēļā vizuāli noteica augu stāvokli to izsakot kā vitalitāti ballēs no 1 līdz 5 (0 – augam nav virszemes daļu, 5 – izcils), augošo augu daudzumu (%) un lapu skaitu. Pēc eksperimenta katra varianta augsnes sastāva analīzi veica Dr. biol. Andis Karlsons LU Bioloģijas institūta Augu minerālās barošanās laboratorijā.

2.5. Reprodukcija

Lai noteiktu *S. esthonica* spēju vairoties ģeneratīvi un veģetatīvi, veica dīgtspējas eksperimentus un izvērtēja veģetatīvi veidojošās struktūras.

2.5.1. Dīgtspējas pētījumi

S. esthonica sēklas dīgtspējas pētījumiem ievāca 2009. un 2010. gadā dabiskajās populācijās un 2011. gadā no Nacionālajā botāniskajā dārzā augušie augiem. Tā kā pēc sākotnējiem novērojumiem bija zināms, ka *S. esthonica* sēklas ir salīdzinoši vāji dīgstošas, vispirms noteica to izmēru un pēc tam dīgtspējas atkarību no tā. Lai noskaidrotu apstākļus, kas veicina dīgtspējas palielināšanos (miera stāvokļa pārtraukšanu), pārbaudīja stratifikācijas, apgaismojuma, KNO_3 un giberelskābes (GA_3) ietekmi.

Sēklu izmēru noteikšanai izmantoja milimetru papīru. Lai noskaidrotu kurvītī esošo sēklu izmērus, izmērīja piecu augu sēklas (kopā 33 kurviši). Noteica, cik lielā proporcijā sastopamas katra izmēra sēklas. Pēc tam sēklas vizuāli izvērtēja un saskaitīja tukšās sēklas.

Lai noteiktu dīgtspējas atkarību no sēklu izmēriem, izmantoja ranžētas 3, 4, 5 mm sēklu frakcijas, kuras līdz testam glabāja 17 °C temperatūrā. Sēklas 12 h mērcēja H_2O , GA_3 vai 0.2% KNO_3 šķīdumos, tad novietoja Petri traukos, kuros ieklātas divas kārtas filtrpapīra, kas samitrināts ar H_2O , 10^{-2} M, 10^{-3} M, 10^{-4} M GA_3 vai 0.2% KNO_3 , un diedzēja 22 °C tumsā. Tā kā vizuāli pilnu sēklu bija maz, testam izmantoja 20 sēklas divos atkārtojumos. Tests ilga četras nedēļas un dīgstošo sēklu skaitu uzskaitīja 3., 4., 7., 10., 13., 17., 21. dienā.

Lai noteiktu priekšapstrādes, apgaismojuma un dažādu vielu ietekmi uz dīgtspēju, ievāktas sēklas izžāvēja, vizuāli novērtēja un tukšās sēklas tālākos pētījumos nelietoja. Dīgtspējas testam izmantoja 4 mm sēklu frakciju (8. tabula). Daļu sēklu glabāja vienu mēnesi 4 °C ledusskapī, bet pārējās 17 °C temperatūrā līdz eksperimenta sākumam. Sēklas 12 h mērcēja H_2O , GA_3 vai 0.2% KNO_3 šķīdumos, tad novietoja Petri traukos, kuros ieklātas divas kārtas filtrpapīra, kas samitrināts attiecīgajos šķīdumos.

8. tabula. Sēklu dīgtspējas eksperimentu apstākļi, izmantojot 4 mm garo sēklu frakciju

Priekšapstrāde	Aktīvā viela	Diedzēšanas apstākļi
Viens mēnesis 4 °C	10 ⁻² M GA ₃ 10 ⁻³ M GA ₃ 10 ⁻⁴ M GA ₃ 0.2% KNO ₃ H ₂ O	22 °C tumsa
	10 ⁻² M GA ₃ 10 ⁻³ M GA ₃ 10 ⁻⁴ M GA ₃ 0.2% KNO ₃ H ₂ O	22 °C gaisma/tumsa 16/8 h
17 °C	10 ⁻² M GA ₃ 10 ⁻³ M GA ₃ 10 ⁻⁴ M GA ₃ 0.2% KNO ₃ H ₂ O	22 °C tumsa
	10 ⁻² M GA ₃ 10 ⁻³ M GA ₃ 10 ⁻⁴ M GA ₃ 0.2% KNO ₃ H ₂ O	22 °C gaisma/tumsa 16/8 h

Eksperimenta varianti apkopoti 8. tabulā un to veica trīs atkārtojumos. Tests ilga četras nedēļas un 3., 4., 7., 10., 13., 17., 21. dienā uzskaitīja uzdīgušās sēklas un aprēķināja dīgtspēju procentos. Rezultātus analizēja, izmantojot ANOVA analīzi.

2.5.2. Veģetatīvās vairošanās izvērtējums

Desmit augus no dīgtspējas testā uzdīgušām kontroles varianta sēklām izstādīja veģetācijas traukos kūdras substrātā, vasarā audzēja lauka apstākļos, pārziemināja un pēc pārziemošanas lauka apstākļos noteica izveidojušos dzinumu un ziedkātus veidojošo dzinumu skaitu.

Divus augus izņēma no veģetācijas traukiem, tiem noskaloja saknes un analizēja sakņu struktūru.

2.6. Ģenētiskās daudzveidības salīdzinājums un *Saussurea* ģints filoģenētiskā analīze

2.6.1. *S. esthonica* Latvijas populāciju ģenētiskā daudzveidība

DNS izdalīja no 29 Apšuciema un 24 Popes atradnēs augošu *S. esthonica* indivīdu lapām, izmantojot firmas *Fermentas* genomiskā DNS attīrīšanas komplektu (*Fermentas Genomic DNA Purification Kit*). Katram izdalītajam paraugam izmērija DNS koncentrāciju ar UV/VIS spektrofotometru *Lambda 25*.

Ģenētisko daudzveidību noteica ar divām metodēm – iPBS (*inter Primer Binding Site*) un AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*).

iPBS metodei PCR reakcijā izmantoja 100 ng DNS, ko pievienoja reakcijas maisījumam (25 µL), kas sastāvēja no 1 × *Dream Taq* bufera, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 1 µM praimera, 1 U *Dream Taq* polimerāzes, 0.04 U *Pfu* polimerāzes. PCR amplifikāciju veica termociklerā šādos apstākļos: sākotnējā denaturācija 94 °C 4 min, denaturācija, praimeru saistīšanās un sintēze 38 cikli 94 °C 20 s, 50 °C 1 min

un 68 °C 1 min katrs, beigu sintēze 72 °C 5 min. Amplificētos produktus sadalīja elektroforēzē (50V 15 h) 0.7 % agarozes gēlā ar 0.2 µg mL⁻¹ etīdija bromīdu TAE buferī. Gēlu fotografēja un iegūto attēlu fiksēja, izmantojot digitālo sistēmu Alpha DigiDoc. Kopumā pārbaudīja 15 praimerus (Kalendar *et al.* 2010), no tiem piecus labākos izraudzīja turpmākām analizēm, pamatojoties uz reakcijas kvalitāti un amplificēto joslu skaitu. Rezultātus sakārtoja binārajā sistēmā un analizēja, izmantojot programmu *GenAEx 6* (Peakall, Smouse 2006).

AFLP analīzei izmantoja AFLP protokolu (http://bioweb.usu.edu/wolf/aflp_protocol.htm) ar dažām modifikācijām. Restrikcijas reakcijā izmantoja 500 ng DNS 10 µL reakcijas maisījumā (2 µL 10 × Tango bufera, 0.5 µL *Eco RI* enzīma) un inkubēja 37 °C 3 h. Reakcijai pievienoja 1 U *Tru I* (*Mse I*) enzīma, 0.4 µL 10 × Tango bufera, 1.5 µL H₂O un inkubēja 65 °C 3 h. Tad pievienoja 1 µL *Mse I* adaptera, 1 µL *Eco RI* adaptera, 1 U T4 DNS ligāzes, 2 µL ligāzes bufera, 0.6 µL 10 × Tango bufera, 3.2 µL H₂O un inkubēja 22 °C 3 h. Restrikcijas produktu atšķaidīja, pievienojot 80 µL TE bufera un preamplifikācijai izmantoja 3 µL parauga 25 µL PCR reakcijas tilpumā, kas sastāvēja no 0.2 mM dNTP, 1U *Taq* DNS polimerāzes, 2.5 µL *Taq* bufera, 1.5 mM MgCl₂ un 0.2 µM *Mse*+C un *Eco*+A praimeriem. PCR preamplifikācijas reakcija bija 30 cikli 20 s 94 °C, 30 s 56 °C un 2 min 72 °C, kam sekoja beigu pagarināšana 60 °C 30 min. PCR produktu atšķaidīja ar 75 µL sterilu TE buferi. Selektīvo amplifikāciju veica 2 min 94 °C, 12 cikli 30 s 94 °C, 30 s 65 °C un 2 min 72 °C, 23 cikli 30 s 94 °C, 30 s 56 °C un 2 min 72 °C, nobeigumā 10 min 72 °C. Izmantoja trīs praimeru kombinācijas: *Eco*-ACA/*Mse*-CTG, *Eco*-AAG/*Mse*-CAG, *Eco*-AGG/*Mse*-CAG. AFLP-fragmentus sadalīja *ABI PRISM 3130xl* ģenētiskajā analizatorā (sekvenatorā).

2.6.2. Latvijas un Igaunijas populāciju ģenētiskās daudzveidības salīdzināšana

Analīzei izmantoja no Latvijas atradnēs ievāktu *S. esthonica* lapu paraugiem izdalīto DNS, kā arī, no 24 Pärnu-Jaagupi un 28 Kalevi atradnēs ievāktu indivīdu lapām izdalīto DNS.

Analīzēm izmantoja četrus PBS DNS marķierus. Ģenētisko daudzveidību Latvijas un Igaunijas populāciju starpā noteica divos veidos: (1) ar neiezīmētajiem PBS praimeriem, amplificētos fragmentus sadalot elektroforēzē agarozes gēlā un pēc tam fotografējot, izmantojot digitālo sistēmu *Alpha DigiDoc*; (2) ar *HEX* un *6-FAM* krāsu iezīmētajiem PBS praimeriem, izmantojot 100 ng DNS 20 µL reakcijas maisījumā, kas sastāvēja no 1 × *Dream Taq* bufera, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 1 µM praimera, 0.6 U *Dream Taq* polimerāzes, 0.15 U *Pfu* polimerāzes. PCR reakcija: sākotnējā denaturācija 95 °C 3 min, denaturācija, praimeru saistīšanās un sintēze 38 cikli 95 °C 30 s, 50 °C 40 s un 68 °C 1 min katrs, beigu sintēze 72 °C 10 min. Iegūtos fragmentus sadalīja un analizēja *ABI PRISM 3130xl* ģenētiskajā analizatorā (sekvenatorā) izmantojot *GeneMapper v4.0* programmu. Rezultātus sakārtoja binārajā sistēmā un analizēja, izmantojot programmu *GenAEx 6* (Peakall, Smouse 2006).

2.6.3. Vairāku *Saussurea* ģints sugu filoģenētiskais salīdzinājums

Izmantoja jau izdalīto DNS no *S. esthonica* Latvijas un Igaunijas populāciju indivīdiem. DNS

izdalīšanai no citām *Saussurea* ģints sugām izmantoja *in vitro* kultūrā no sēklām izaudzētus augus. Ģenētiskajām analizēm izmantoja iPBS un ITS metodes.

iPBS gadījumā, PCR amplifikācijai un fragmentu analīzei izmantoja četrus PBS marķierus (2076, 2001, 2083, 2081) (Kalendar *et al.* 2010). Reakcijā izmantoja 100 ng DNS 20 µL reakcijas maisījuma, kas sastāvēja no 1 × *Dream Taq* bufera, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 1 µM praimera, 1 U *Dream Taq* polimerāzes, 0.04 U *Pfu* polimerāzes. PCR reakcija – sākotnējā denaturācija 95 °C 3 min, tad denaturācija, praimeru saistīšanās un sintēze 38 cikli 95 °C 30 s, 50 °C 40 s un 68 °C 1 min katrs, beigu sintēze 72 °C 10 min. Amplificētos produktus sadalīja izmantojot ABI PRISM 3130xl ģenētisko analizatoru un genotipēja izmantojot *GeneMapper* v4.0, veidoja bināro datu matrici un analizēja ar *GenAlEx 6* (Peakall, Smouse 2006). Filoģenētisko koku veidoja izmantojot *Neighbour-joining* klasteru analīzi *MEGA 4* programmā (Tamura *et al.* 2007).

Analīzē ar ITS ribosomālajiem DNS marķieriem, reakcijā izmantoja 100 ng DNS 20 µL reakcijas maisījuma, kas saturēja 10 µL 2 × F 131 PCR bufera, 0.12 µL 122S DNS polimerāzes (*Finnzymes*), 2 mM dNTP Mix, 200 nM praimera ITS 1 vai ITS 4 (White *et al.* 1990). PCR amplifikācija: sākotnējā denaturācija 98 °C 5 min, tad 38 cikli 98 °C 10 s, 60 °C 10 s, 72 °C 20 s katrs, beigu sintēze 72 °C 10 min. PCR produktu attīrīja ar alkalīna fosfatāzi un eksonukleāzi I, sekvenēja ar 2 µL attīrīta PCR produkta 20 µL reakcijas maisījumā, kas saturēja 5 µL 5 × sekvenēšanas bufera 200 nM praimera un 1 µL sekvenēšanas *RR-100 Big Dye*. Sekvenēšanas PCR reakcijas apstākļi: sākotnējā denaturācija 96 °C 3 min, denaturācija, praimeru saistīšanās un sintēze 35 cikli 96 °C 10 s, 50 °C 20 s, 60 °C 4 min katrs. Sekvenēšanas analīzes veica ar *ABI PRISM 3130xl* ģenētisko analizatoru un datus analizēja ar programmu *MEGA 4* (Tamura *et al.* 2007).

3. Rezultāti

3.1. *In vitro* kultūras sugas saglabāšanai un izpētei

3.1.1. *Saussurea* sugu dīgtpēja *in vitro*

No ārvalstu botāniskajiem dārziem saņemtie sēklu paraugi bija dažādas kvalitātes. Bojātās sēklas atlasīja uzreiz un nelika dziedēt. Deviņos paraugos bija daudz plānu neattīstītu sēklu. Dezinfekcijas laikā tās atkrāsojās. Kopumā uzdīga 11 paraugu sēklas (9. tabula).

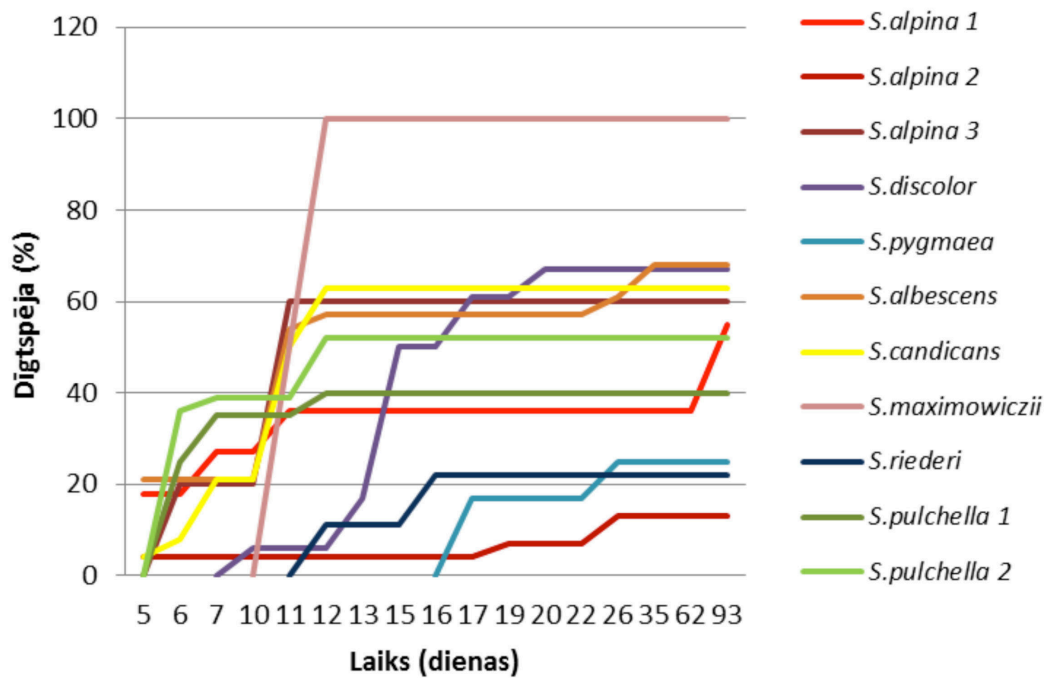
Desmit no tiem uzdīga 5 līdz 35 dienu laikā, bet viens *S. alpina* paraugs dīga 93 dienas. Atšķirības dīgtpējā sugām, kas vāktas botāniskajos dārzos vai savvaļā, netika novērotas, tāpat arī nebija lielas atšķirības starp dīgšanu dažādās barotnēs. Daļa dīgstu bija nenormāli. *S. albescens* nenormālajiem dīgstiem bija vērojams albīnisms. Dīgtpēja bezhormonu barotnēs ar ½ MS bija 14.3% un ¼ MS, kam pievienots kinetīns – 16.6%. Dažādām sugām dīgtpēja atšķīrās: no 13% *S. alpina* līdz 100% *S. maximowiczii*. Daļēji tas izskaidrojams ar mazo *S. maximowiczii* sēklu skaitu. Kopumā 92% sēklu uzdīga 3 nedēļu laikā, 6% – turpmākajās 2 nedēļās un tikai 2% dīga 3 mēnešus (11. attēls).

3.1.2. Dažādu citokinīnu ietekme uz augu kultivēšanu *in vitro*

Barotnē bez citokinīniem dzinumumu proliferāciju nenovēroja. Barotnēs, kurām bija pievienots BAP, augošajiem dzinumumiem novēroja izteiktu proliferāciju (10. tabula). BAP ietekmē palielinājās jaunus dzinumus veidojošo eksplantu skaits, kā arī dzinumumu skaits no eksplanta. Vienīgā statistiski būtiskā

9. tabula. *Saussurea* ģints sugu sēklu dziedēšanas uzskaitē

Suga	Sākotnējais sēklu skaits	Aseptisko sēklu skaits	Dīgstošās sēklas (%)	Nenormāli dzinumumi
<i>S. discolor</i>	45	18	67	–
<i>S. pygmaea</i>	12	12	25	2
<i>S. albescens</i>	30	28	68	7
<i>S. alpina</i> (1)	16	11	55	–
<i>S. alpina</i> (2)	33	27	13	–
<i>S. alpina</i> (3)	5	5	60	1
<i>S. candicans</i>	32	24	63	1
<i>S. maximowiczii</i>	12	2	100	–
<i>S. pulchella</i> (1)	45	40	40	–
<i>S. pulchella</i> (2)	42	33	52	–
<i>S. riederi</i>	22	9	22	–



11. attēls. Dīgšanas dinamika dažādu *Saussurea* sugu sēklām.

10. tabula. Citokinīnu un MS makroelementu ietekme uz *S. esthonica* dzinumu proliferāciju pēc 4 nedēļu kultivēšanas *in vitro*

MS makroelementu koncentrācija	Citokinīns (mg L ⁻¹)	Dzinumus veidojošie eksplanti (%)	Dzinumu skaits no eksplanta	Dzinumu garums (cm)
½ MS	BAP 0.25	85.4 ± 7.3	2.7 ± 0.6	2.1 ± 0.4
	BAP 0.50	93.1 ± 3.3	3.5 ± 1.0	1.8 ± 0.2
	BAP 0.75	99.4 ± 0.6	4.8 ± 0.3	1.8 ± 0.2
	BAP 1.00	100.0 ± 0.0	5.3 ± 0.2	1.4 ± 0.3
	kinetīns 0.50	89.3 ± 1.8	2.0 ± 0.2	1.5 ± 0.3
	kinetīns 1.00	82.7 ± 2.3	2.4 ± 0.4	1.8 ± 0.3
	kinetīns 1.50	76.8 ± 10.8	2.0 ± 0.5	1.4 ± 0.1
	kinetīns 2.00	63.4 ± 13.3	2.2 ± 0.6	1.6 ± 0.3
	2-iP 0.25	23.8 ± 17.7	1.5 ± 0.4	3.3 ± 0.3
	2-iP 0.50	26.6 ± 19.0	1.6 ± 0.5	2.1 ± 0.7
	2-iP 0.75	5.1 ± 2.6	0.7 ± 0.3	1.0 ± 0.0
	2-iP 1.00	13.8 ± 9.2	1.1 ± 0.1	1.8 ± 0.3
	0	0	0	0
	1 MS	BAP 0.25	95.7 ± 2.7	2.3 ± 0.3
BAP 0.50		90.3 ± 5.0	3.7 ± 0.9	2.1 ± 0.03
BAP 0.75		100.0 ± 0.0	6.0 ± 0.5	2.1 ± 0.2
BAP 1.00		100.0 ± 0.0	6.8 ± 0.3	1.5 ± 0.1
kin 0.50		68.8 ± 3.6	1.9 ± 0.2	1.8 ± 0.1
kinetīns 1.00		87.5 ± 4.6	2.4 ± 0.5	2.0 ± 0.2
kinetīns 1.50		88.1 ± 6.7	2.4 ± 0.5	2.1 ± 0.3
kinetīns 2.00		76.3 ± 11.5	2.4 ± 0.5	1.6 ± 0.1
2-iP 0.25		25.4 ± 18.2	1.0 ± 0.5	0.8 ± 0.2
2-iP 0.50		23.5 ± 20.5	1.0 ± 0.5	2.0 ± 0.6
2-iP 0.75		26.6 ± 15.0	0.9 ± 0.5	1.3 ± 0.3
2-iP 1.00		11.0 ± 5.7	0.9 ± 0.5	1.6 ± 0.2
0		0	0	0

atšķirība starp citokinīnu koncentrācijām parādījās variantā ar 1 MS makrosāļiem un BAP ($p < 0.05$). Variantos ar dažādām makrosāļu koncentrācijām būtiska atšķirība parādījās variantos ar 1 mg L^{-1} BAP un makroelementu sāļiem $\frac{1}{2}$ un 1 MS ($p < 0.05$). Dzinumu garums variēja starp 0.8 un 3.3 cm, tomēr ne citokinīna veids, ne koncentrācija būtiski neietekmēja dzinumu stiepšanos. Parādījās tikai tendence, ka BAP pievienošana barotnei varētu kavēt dzinumu pagarināšanos.

Salīdzinot dažādu citokinīnu ietekmi, būtiskas atšķirības parādījās starp visiem trim lietotajiem fitohormoniem gan jaunus dzinumus veidojošo eksplantu skaitā, gan jauno dzinumu no eksplanta skaitā barotnēs ar abām makroelementu sāļu koncentrācijām. Neatkarīgi no lietotās kinetīna koncentrācijas, rezultāts īpaši nemainījās, tomēr, salīdzinot ar BAP, tā efektivitāte bija zemāka. 2-iP nebija efektīvs jaunu dzinumu veidošanai (mazāk nekā 30% eksplantu veidoja jaunus dzinumus).

Saknes vislabāk veidojās barotnēs bez fitohormoniem un ar 2-iP (11. tabula). BAP inhibēja sakņu veidošanos. Mazāk par 30% eksplantu veidoja saknes barotnēs ar BAP un tās bija pāresninātas un īsas. Jo lielāka bija lietotā BAP koncentrācija, jo mazāk sakņu novēroja. Būtiskas bija atšķirības gan saknes veidojošo eksplantu skaitā, gan sakņu skaitā no eksplanta visos variantos izņemot variantus ar

11. tabula. Citokinīnu un MS makroelementu ietekme uz *S. esthonica* sakņu veidošanos pēc 4 nedēļu kultivēšanas *in vitro*

MS makroelementu koncentrācija	Citokinīns (mg L^{-1})	Saknes veidojošie eksplanti (%)	Eksplantu sakņu skaits
$\frac{1}{2}$ MS	BAP 0.25	30.1 ± 9.8	1.4 ± 0.3
	BAP 0.50	27.3 ± 10.7	1.2 ± 0.1
	BAP 0.75	16.5 ± 9.0	1.1 ± 0.1
	BAP 1.00	6.3 ± 3.1	0.8 ± 0.4
	kinetīns 0.50	36.9 ± 5.6	2.3 ± 0.4
	kinetīns 1.00	34.8 ± 7.2	2.2 ± 0.5
	kinetīns 1.50	43.3 ± 14.2	1.9 ± 0.3
	kinetīns 2.00	34.8 ± 1.8	1.9 ± 0.4
	2-iP 0.25	81.5 ± 6.0	2.9 ± 0.6
	2-iP 0.50	83.8 ± 6.0	3.0 ± 0.8
	2-iP 0.75	82.5 ± 2.6	2.6 ± 0.3
	2-iP 1.00	73.4 ± 0.9	3.0 ± 0.3
	0	87.2 ± 5.0	3.1 ± 0.2
	1 MS	BAP 0.25	34.7 ± 13.6
BAP 0.50		28.5 ± 11.2	1.5 ± 0.3
BAP 0.75		15.5 ± 8.9	1.2 ± 0.1
BAP 1.00		0	0
kinetīns 0.50		50.6 ± 5.9	2.8 ± 0.2
kinetīns 1.00		52.5 ± 20.7	2.0 ± 0.6
kinetīns 1.50		63.1 ± 10.7	2.1 ± 0.1
kinetīns 2.00		60.9 ± 1.8	1.8 ± 0.1
2-iP 0.25		88.0 ± 2.9	2.7 ± 0.2
2-iP 0.50		87.4 ± 3.2	2.7 ± 0.3
2-iP 0.75		64.7 ± 11.9	2.4 ± 0.6
2-iP 1.00		73.0 ± 9.6	2.8 ± 0.4
0		87.4 ± 3.2	2.9 ± 0.1

kinetīnu un 2-iP ar 1MS makroelementu sāļu koncentrāciju.

Pētījumā par citokinīnu ietekmi uz sakņu morfoloģiju, izmantoja kinetīnu un 2-iP. Tā kā variantos ar BAP saknes veidojās maz un tās bija paresninātas, tad BAP ietekme tālāk netika pētīta. Pētot citokinīnu ietekmi uz sakņu morfoloģiju (12. tabula), visi sakņu parametri barotnēs ar ½ MS atšķirās variantos ar kinetīnu un 2-iP. Savukārt, lietojot makroelementu sāļu koncentrācijā 1MS, ar citokinīnu apstrādātiem augiem nebija būtiskas atšķirības no kontroles. Novēroja, ka sakņu vidējais diametrs variantos ar kinetīnu mazliet samazinājās. Gan sakņu garums, gan laukums samazinājās palielinot citokinīnu koncentrāciju. 2-iP lietojot koncentrācijā 0.25 mg L⁻¹ novēroja sakņu skaita palielināšanos un šī koncentrācija parādīja labāku rezultātu nekā kontrole. Sakņu galiņu skaits parāda sakņu zarošanās pakāpi. Variantos ar 2-iP un variantos ar ½ MS sakņu galiņu skaits bija lielāks, līdz ar to var teikt, ka ½ MS veicina sakņu zarošanos, salīdzinot ar pilnu MS makroelementu sāļu formulu, bet 2-iP palielina sakņu skaitu.

3.2. Ar fotosintēzi saistīto rādītāju izmantošana fizioloģiskajos pētījumos

3.2.1. Pētījumi dabiskos apstākļos

Lai noteiktu ar fotosintēzi saistīto parametru iespējamās *S. esthonica* veģetatīvo un ģeneratīvo augu atšķirības dažādās augšanas vietās, trīs secīgu veģetācijas sezonu laikā veica hlorofila satura un hlorofila *a* fluorescences nedestruktīvos mērījumus abās Latvijas atradnēs, kā arī divās Igaunijas atradnēs. Latvijas atradnēs analīzes veica trīs reizes sezonā 2009. gadā un četras reizes sezonā 2010. un 2011. gadā. Savukārt, Igaunijas atradnēs mērījumus izdara katra gadā jūlijā no 2009. līdz 2011.

12. tabula. Citokinīnu un MS makroelementu ietekme uz *S. esthonica* sakņu morfoloģiju pēc 4 nedēļu kultivēšanas *in vitro*

MS makroelementu koncentrācija	Citokinīns (mg L ⁻¹)	Sakņu garums (cm)	Sakņu laukums (cm ²)	Vidējais diametrs (mm)	Sakņu galiņu skaits
½ MS	kinetīns 0.50	9.7 ± 2.8	1.9 ± 0.6	0.6 ± 0.0	5.6 ± 2.6
	kinetīns 1.00	8.7 ± 3.7	1.6 ± 0.7	0.6 ± 0.0	6.1 ± 2.5
	kinetīns 1.50	7.3 ± 4.2	1.4 ± 0.8	0.6 ± 0.0	3.7 ± 1.2
	kinetīns 2.00	6.0 ± 1.1	1.2 ± 0.1	0.7 ± 0.1	3.6 ± 0.2
	2-iP 0.25	15.4 ± 2.3	3.0 ± 0.4	0.7 ± 0.0	10.3 ± 1.3
	2-iP 0.50	11.7 ± 1.9	2.5 ± 0.4	0.7 ± 0.0	8.0 ± 0.3
	2-iP 0.75	12.5 ± 0.7	2.7 ± 0.2	0.7 ± 0.0	8.0 ± 0.6
	2-iP 1.00	11.7 ± 0.8	2.5 ± 0.2	0.7 ± 0.0	7.7 ± 1.4
	0	13.7 ± 2.3	2.7 ± 0.5	0.7 ± 0.1	8.9 ± 1.7
1 MS	kinetīns 0.50	8.9 ± 1.4	1.7 ± 0.2	0.6 ± 0.0	7.9 ± 0.9
	kinetīns 1.00	7.4 ± 5.6	1.6 ± 1.2	0.7 ± 0.0	5.5 ± 1.9
	kinetīns 1.50	5.7 ± 3.4	1.2 ± 0.7	0.7 ± 0.1	4.8 ± 0.5
	kinetīns 2.00	3.4 ± 0.1	0.9 ± 0.0	0.7 ± 0.0	4.6 ± 0.0
	2-iP 0.25	12.6 ± 1.5	2.5 ± 0.3	0.7 ± 0.0	7.0 ± 1.1
	2-iP 0.50	10.7 ± 1.8	2.1 ± 0.4	0.7 ± 0.0	6.6 ± 0.7
	2-iP 0.75	11.1 ± 5.6	2.3 ± 1.1	0.7 ± 0.0	7.0 ± 2.5
	2-iP 1.00	8.7 ± 4.7	1.8 ± 0.9	0.7 ± 0.0	6.5 ± 1.9
	0	8.9 ± 0.4	1.8 ± 0.0	0.7 ± 0.1	6.4 ± 0.1

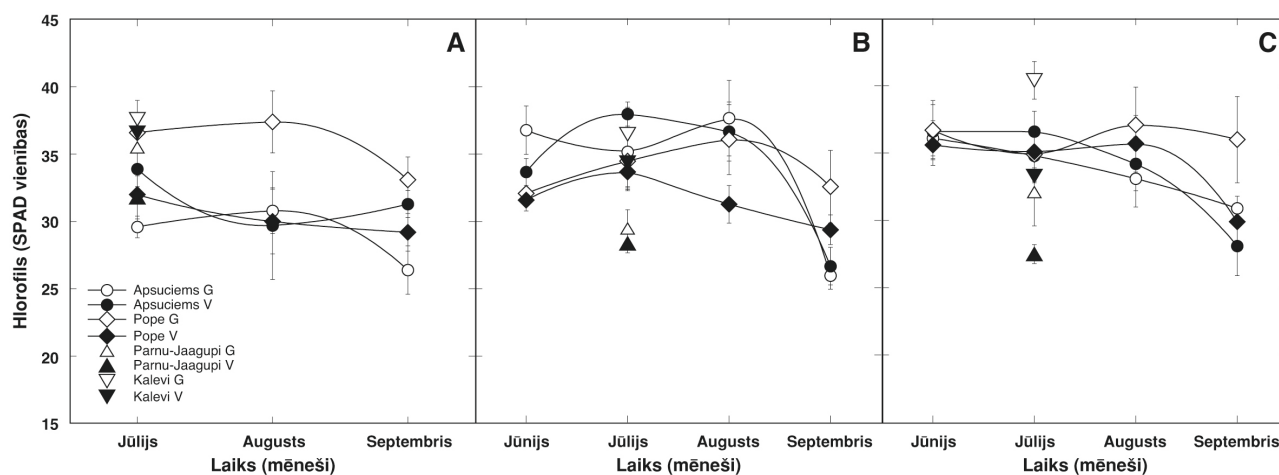
gadam.

Kopumā hlorofila saturs lapās sezonas laikā mainījās nedaudz, varēja novērot tendenci tam samazināties veģetācijas sezonas beigās, septembrī (12. attēls). Statistiski būtisks samazinājums bija novērojams Apšuciema atradnē augošajiem ģeneratīvajiem augiem 2009. gadā, kā arī, abu veidu augiem šajā atradnē 2010. un 2011. gadā. Būtiskas atšķirības starp ģeneratīvo un veģetatīvo augu lapu hlorofila saturu parādījās Popē augošajiem indivīdiem, ar statistiski būtiski augstāku hlorofila saturu ģeneratīvo indivīdu lapās 2009. gadā jūlijā, augustā un septembrī, 2010. gadā – augustā un septembrī, bet 2011. gadā – septembrī. Bez tam, šādas atšķirības bija novērojamas 2009. gadā Pärnu-Jaagupi atradnē un 2011. gadā – abās Igaunijas atradnēs.

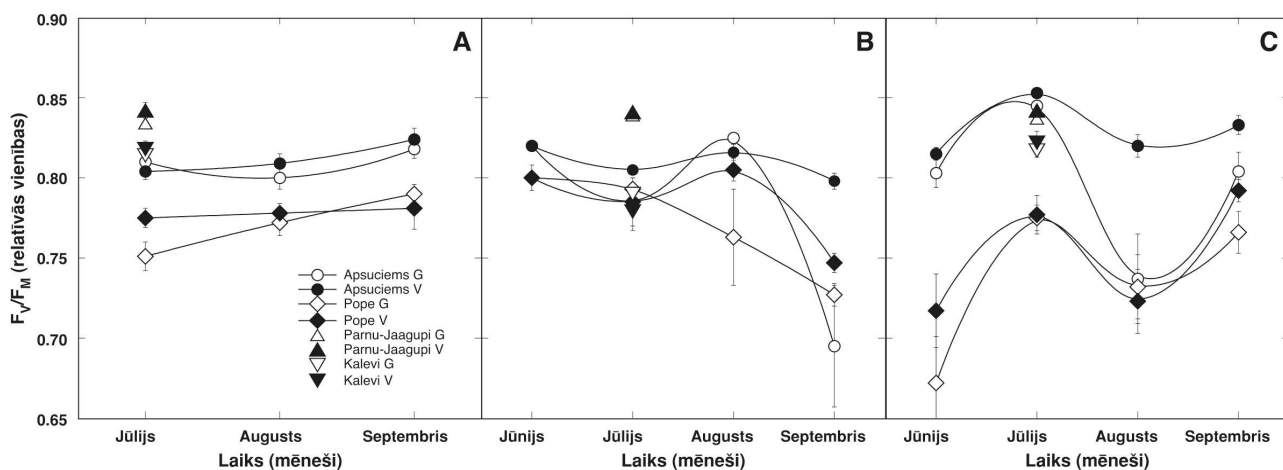
Salīdzinot atsevišķu gadu mērījumus, lapu hlorofila saturs Latvijas atradņu augos mainījās salīdzinoši maz. Varēja novērot tendenci, ka 2009. gadā bija viszemākais vidējais hlorofila saturs (izņemot ģeneratīvos augus Popē), tas pieauga 2010. gadā un saglabājās augstā līmenī 2011. gadā. Turpretī, Pärnu-Jaagupi atradnes augiem 2010. un 2011. gadā bija raksturīgs zemāks lapu hlorofila saturs nekā 2009. gadā.

Tā kā F_v/F_m samazinājuma pakāpe zem 0.8 raksturo augu nesena pagātnē piedzīvoto nelabvēlīgo apstākļu ietekmi, pēc šī rādītāja var spriest par augu fizioloģisko vitalitāti. Parametra absolūtā lieluma samazinājums līdz 0.7 2011. gada jūnijā un augustā Popē liecināja par nelabvēlīgu apstākļu ietekmi (13. attēls). Salīdzinot ziedošus un neziedošus *S. esthonica* augus dažādās atradnēs, varēja konstatēt, ka atšķirības lielākoties bija nebūtiskas, bet bija raksturīga tendence, ka veģetatīvajiem augiem F_v/F_m bija augstāks. Statistiski būtiski augstāks F_v/F_m līmenis veģetatīvajiem augiem bija novērojams 2010. gada augustā Popē un septembrī Apšuciemā, kā arī, 2011. gada augustā Apšuciemā. Augiem Igaunijas atradnēs F_v/F_m vērtības bija nedaudz augstākas vai Apšuciema augu atbilstošo vērtību līmenī.

Kompleksā fluorescences parametra *Performance Index* (PI), kas raksturo augu kopējo fizioloģisko vitalitāti, izmaiņas parādīja līdzīgas tendences kā F_v/F_m gadījumā, bet ar mazākām variācijām samazināšanās virzienā un lielākām – paaugstināšanās virzienā (14. attēls). Ja 2009.



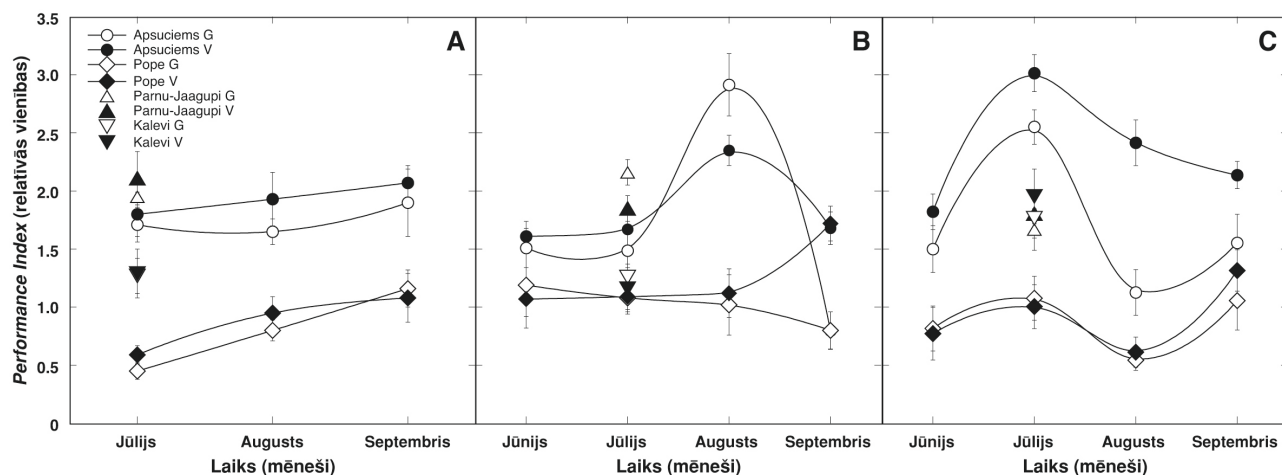
12. attēls. Hlorofila satura sezonālās izmaiņas 2009. gadā (A), 2010. gadā (B), 2011. gadā (C) ģeneratīvo (G) un veģetatīvo (V) *Saussurea esthonica* augu lapās savvaļas apstākļos dažādās atradnēs.



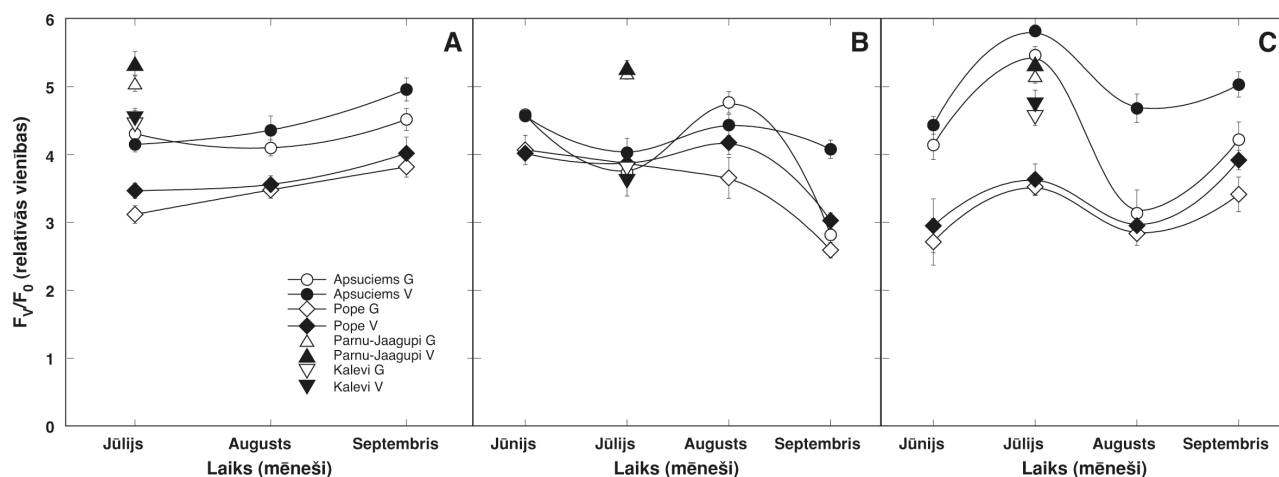
13. attēls. Hlorofila fluorescences parametra F_v/F_m sezonālās izmaiņas 2009. gadā (A), 2010. gadā (B) un 2011. gadā (C) ģeneratīvo (G) un veģetatīvo (V) *Saussurea esthonica* augu lapās savvaļas apstākļos dažādās atradnēs.

gadā sezonas laikā nebija novērojamas krāsas PI svārstības, tad 2010. gada augustā un 2011. gadā no jūnija līdz augustam Apšuciemā augošajiem augiem šis rādītājs būtiski pieauga. Popes atradnes augiem PI visās sezonās bija būtiski zemāks nekā Apšuciema augiem. Atšķirības starp ģeneratīvajiem un veģetatīvajiem īpatņiem nebija statistiski būtiskas, izņemot 2010. gada augustā Apšuciemā un septembrī Apšuciemā un Popē, kā arī, 2011. gadā Apšuciemā visā sezonas garumā. Salīdzinot Igaunijas atradņu augu PI datus varēja konstatēt, ka 2009. un 2010. gadā vitalitāte bija būtiski augstāka Pärnu-Jaagupi augiem, esot vienā līmenī ar Apšuciema augiem, bet 2011. gadā tā būtiski neatšķīrās.

F_v/F_0 izmaiņas *S. esthonica* augu lapās bija līdzīgas PI izmaiņām, bet ar būtiski mazāku amplitūdu (15. attēls). Būtiski augstāks F_v/F_0 līmenis Apšuciema augu lapās saglabājās visas sezonas garumā 2009. gadā, 2010. gadā tas bija vienāds ar Popes augu F_v/F_0 līmeni, bet 2011. gadā šāda atšķirība bija raksturīga sezonas pirmajā pusē (jūnijā un jūlijā), bet augustā un septembrī tas bija novērojams



14. attēls. Hlorofila fluorescences parametra *Performance Index* sezonālās izmaiņas 2009. gadā (A), 2010. gadā (B) un 2011. gadā (C) ģeneratīvo (G) un veģetatīvo (V) *Saussurea esthonica* augu lapās savvaļas apstākļos dažādās atradnēs.

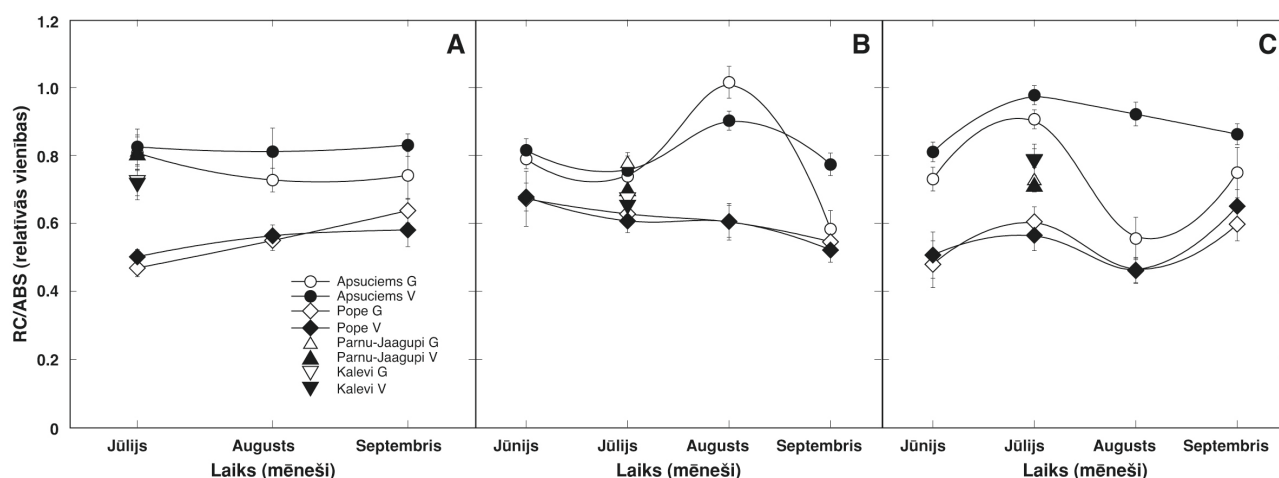


15. attēls. Hlorofila fluorescences parametra F_v/F_0 sezonālās izmaiņas 2009. gadā (A), 2010. gadā (B) un 2011. gadā (C) ģeneratīvo (G) un veģetatīvo (V) *Saussurea esthonica* augu lapās savvaļas apstākļos dažādās atradnēs.

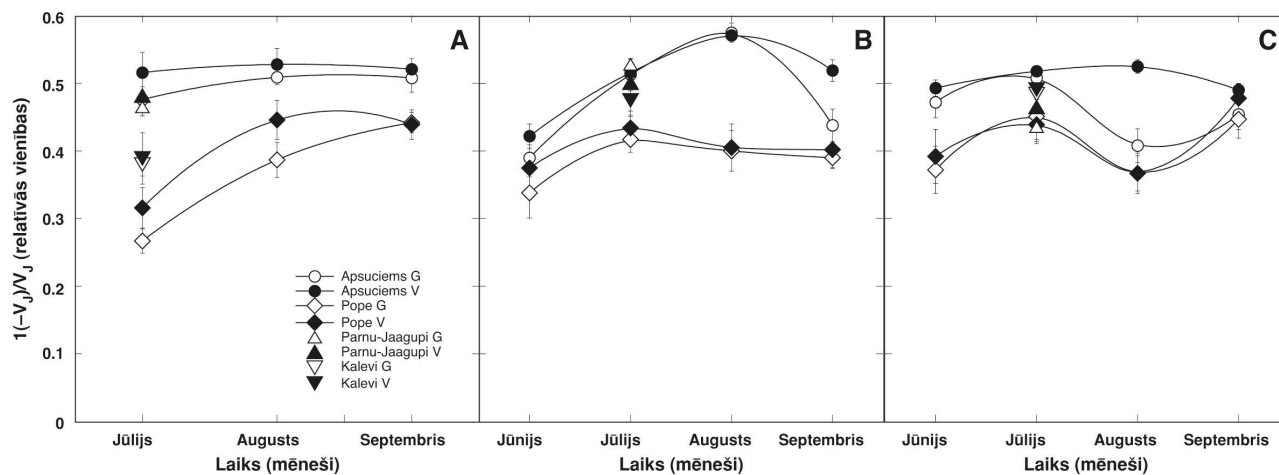
paaugstinātā līmenī tikai veģetatīvajiem augiem. 2011. gadā Apšuciema veģetatīvajiem augiem bija visaugstākais parametra līmenis, salīdzinot arī ar citiem gadiem. Savukārt, Igaunijas atradnes Pärnu-Jaagupi indivīdiem F_v/F_0 bija augstāks nekā Kalevi augiem visās sezonās.

Arī aktīvo reakcijas centru īpatsvaru raksturojošā parametra RC/ABS izmaiņas bija līdzīgas PI un F_v/F_0 izmaiņām (16. attēls). Novēroto izmaiņu amplitūda bija lielāka nekā F_v/F_0 , bet mazāka nekā PI. Raksturīgi, ka Apšuciema augiem RC/ABS bija augstākā līmenī nekā Popes augiem, bet Igaunijas atradņu augiem RC/ABS bija tuvu Apšuciema augu līmenim vai zem tā.

Salīdzinoši nelielas atšķirības starp dažādu atradņu augiem varēja novērot attiecībā uz fluorescences parametru $(1-V_j)/V_j$, kas parāda tumsas reakciju ietekmi uz PS II aktivitāti (17. attēls). Lai arī 2009. gadā Apšuciema atradnes augiem šis parametrs bija augstāks nekā Popes augiem visā sezonas garumā, 2010. gadā tas bija raksturīgi tikai jūlijā un augustā, bet 2011. gadā – sezonas



16. attēls. Hlorofila fluorescences parametra RC/ABS sezonālās izmaiņas 2009. gadā (A), 2010. gadā (B) un 2011. gadā (C) ģeneratīvo (G) un veģetatīvo (V) *Saussurea esthonica* augu lapās savvaļas apstākļos dažādās atradnēs.



17. attēls. Hlorofila fluorescences parametra $(1-V_j)/V_j$ sezonālās izmaiņas 2009. gadā (A), 2010. gadā (B) un 2011. gadā (C) ģeneratīvo (G) un veģetatīvo (V) *Saussurea esthonica* augu lapās savvaļas apstākļos dažādās atradnēs.

sākumā (veģetatīvajiem augiem – arī augustā).

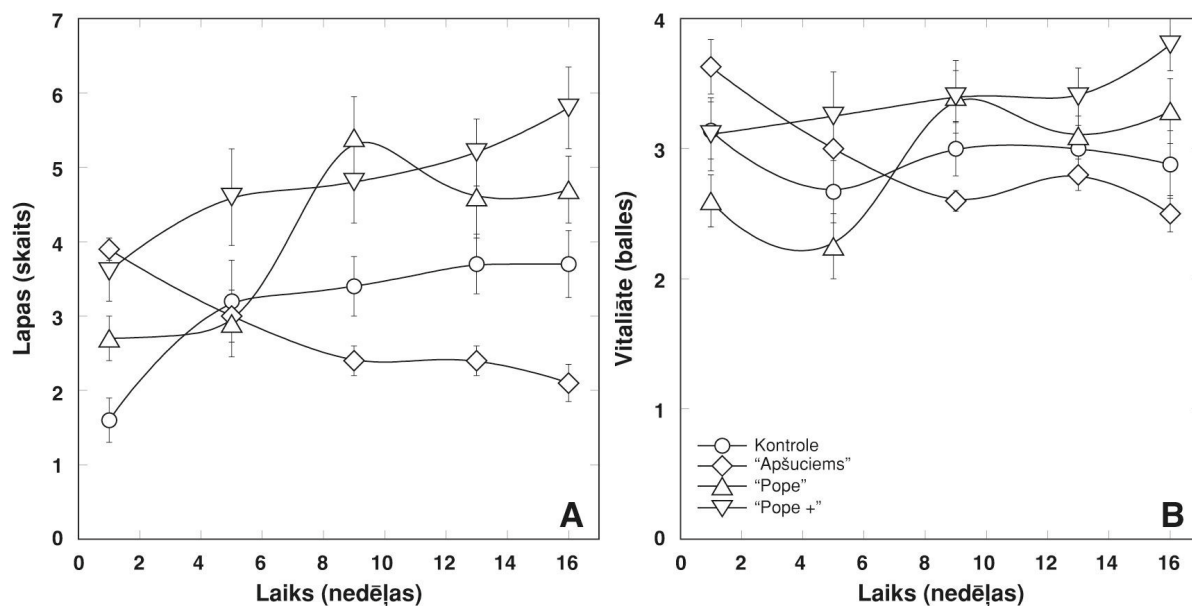
Novēroja, ka ar PS II fotosintētisko aktivitāti saistītie rādītāji kopumā augstāki bija veģetatīvajos, nevis ģeneratīvajos augos, tomēr šīs atšķirības nebija ļoti izteiktas. Krasākas atšķirības starp ar PS II saistītajiem rādītājiem parādījās augusta mērījumos, kas varētu būt saistīts ar ģeneratīvo augu lapu ātrāku novecošanos.

Visu ar fotosistēmas II aktivitāti saistīto rādītāju pazeminātā aktivitāte Popē ir saistīta ar nokrišņu līmeni, kā arī, iespējams, ir kompleksa mitruma un augsnes minerālā sastāva ietekmes izpausme. Tādēļ turpmākajos eksperimentos kontrolētos apstākļos pētīja šo divu parametru ietekmi.

3.2.2. Augsnes minerālelementu satura ietekme uz fotosintēzes rādītājiem

Lai noskaidrotu, kā mainās *S. esthonica* augu augšana un fizioloģiskā vitalitāte atkarībā no augsnes minerālelementu sastāva, augus audzēja kontrolētos apstākļos substrātā ar četrām atšķirīgām minerālelementu kombinācijām. Kontroles variantā minerālvielu sastāvs bija tādā līmenī, kas ir optimāls lielākajai daļai kultūraugu (pievienojot palielinātu kalcija daudzumu), 2. augsnes variants (Apšuciems) bija līdzīgs Apšuciema substrātam ar paaugstinātu slāpekļa, dzelzs, mangāna un sēra saturu, salīdzinot ar 3. variantu (Pope), kas bija līdzīgs substrātam Popē. Savukārt, 4. variantā (Pope +) bija lielāks slāpekļa un sēra saturs nekā 3. variantā, tai pat laikā slāpekļa saturs bija līdzīgs 2. varianta slāpekļa saturam un sēra saturs bija aptuveni divas reizes mazāks nekā 2. variantā.

Analizējot lapu skaita izmaiņas dažādās augsnēs redzams, ka lapu skaits krasi samazinājās Apšuciema augsnē, savukārt lielākais lapu skaits bija Pope + varianta augiem (18. attēls A). Šī likumsakarība parādījās arī attiecībā uz vizuāli novērtēto augu vitalitāti (18. attēls B). Kopumā vērtējot morfoloģiskos rādītājus eksperimenta beigās, augu attīstībai vislabvēlīgāka bija uzlabotā Popes augsne (Pope +), kurai sekoja Popes augsne un kontroles augsne, bet Apšuciema augsne bija vismazāk labvēlīga.

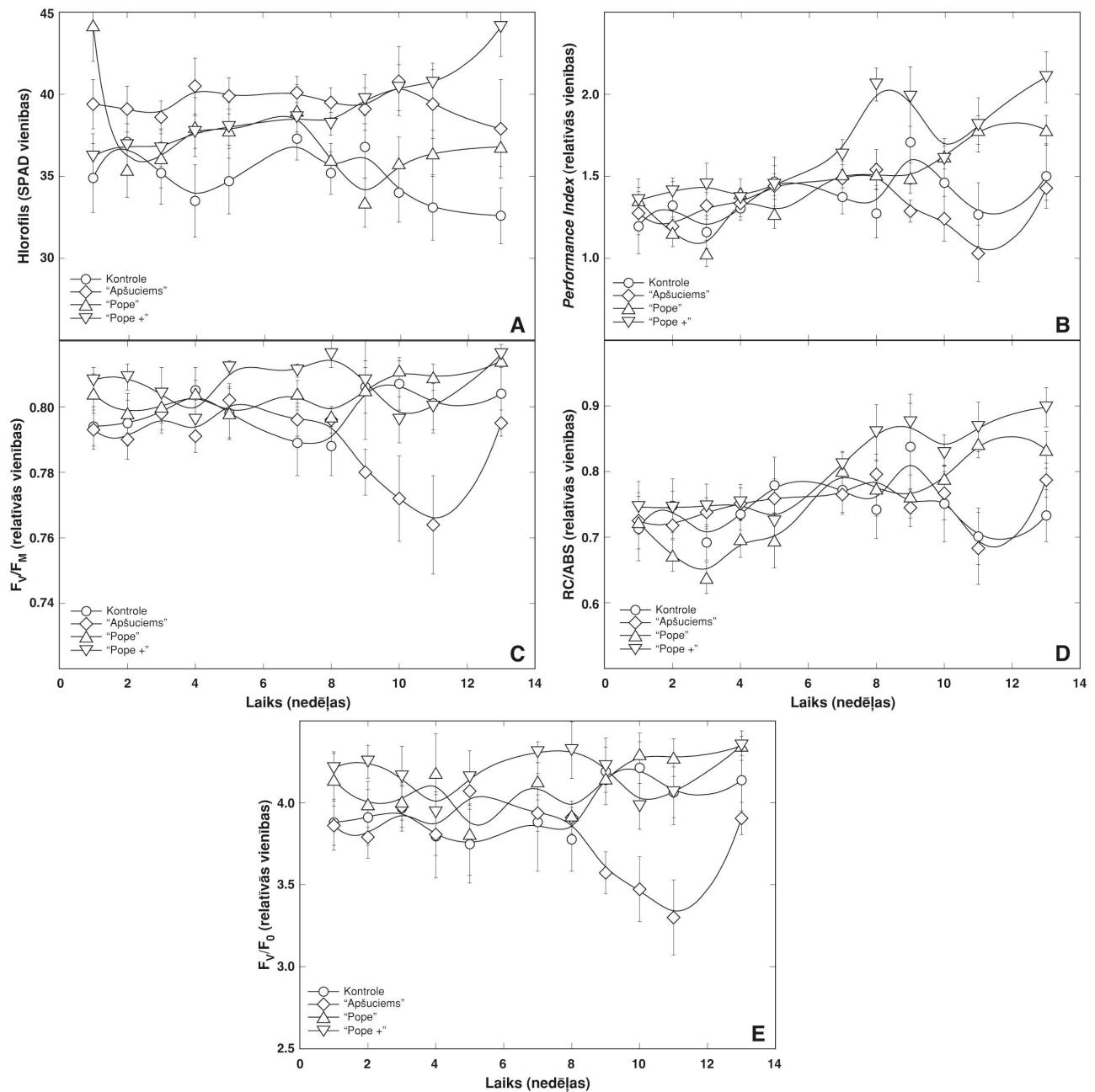


18. attēls. Lapu daudzuma izmaiņas (A) un augu vizuālais vitalitātes izvērtējums (B) *Saussurea esthonica* eksperimentos kontrolētos apstākļos ar dažāda minerālvielu sastāva substrātiem.

Ekspierimenta sākumā nelabvēlīga ietekme uz lapu hlorofila saturu bija vērojama Popes augsnes varianta augiem, bet vēlākā laikā tas saglabājās vidējā līmenī (19. attēls A). Apšuciema augsnes variantā lapu hlorofila saturs eksperimenta laikā nemainījās, bet uzlabotās Popes augsnes variantā varēja novērot stabilu lapu hlorofila satura pieaugumu visā eksperimenta laikā. Savukārt, viszemākais hlorofila saturs bija raksturīgs kontroles augiem.

Pretēji lapu hlorofila saturam, kas parādīja būtiskas atšķirības starp eksperimenta variantu augiem, hlorofila *a* fluorescences rādītāji eksperimenta sākumā mainījās salīdzinoši maz (19. attēls). Vienīgais, PI (19. attēls B) un RC/ABS (19. attēls D) augiem Popes augsnē parādīja nelielu, bet būtisku samazinājumu līdz 3. eksperimenta nedēļai. Tālākajā periodā (no 4. līdz 6. nedēļai) varēja novērot lielākas atšķirības starp eksperimentālajiem variantiem. Būtiski, ka izmaiņas bija atšķirīgas dažādiem fluorescences parametriem – PI un RC/ABS no vienas puses, un F_v/F_m un F_v/F_0 no otras, mainījās līdzīgi. PI un RC/ABS stabili pieauga Pope + variantā, bet salīdzinoši vēlāks pieaugums bija novērojams Popes variantā. Savukārt, kontroles un Apšuciema variantu augiem šie parametri samazinājās līdz 11. nedēļai ar tendenci tiem atjaunoties 13. nedēļā. F_v/F_m un F_v/F_0 periodā no 5. līdz 8. nedēļai bija visaugstākie Pope + augiem, un secīgi samazinājās Popes, Apšuciema un kontroles variantā. Sākot ar 9. nedēļu, šie parametri izlīdzinājās visiem variantiem, izņemot Apšuciema variantu, kur bija novērojams izteikts samazinājums līdz 11. nedēļai ar atjaunošanos 13. nedēļā.

Interesanti, ka PI absolūtās vērtības eksperimenta beigu stadijā (13. nedēļā; 19. attēls B) atbilda vizuālā augu vitalitātes izvērtējuma vērtībām (18. attēls B). Tā kā šie rezultāti bija pretrunā novērojumam, ka tieši Popē ir viszemākie fizioloģiskās vitalitātes rādītāji, iekārtoja eksperimentu mitruma režīma ietekmes pārbaudei.



19. attēls. Hlorofila satura (A) un hlorofila a fluorescences parametru PI (B), F_v/F_m (C), RC/ABS (D) un F_v/F_0 (E) izmaiņas *Saussurea esthonica* eksperimentos kontrolētos apstākļos ar dažāda minerālvielu sastāva substrātiem.

3.2.3. Mitruma ietekme uz fotosintēzes rādītājiem

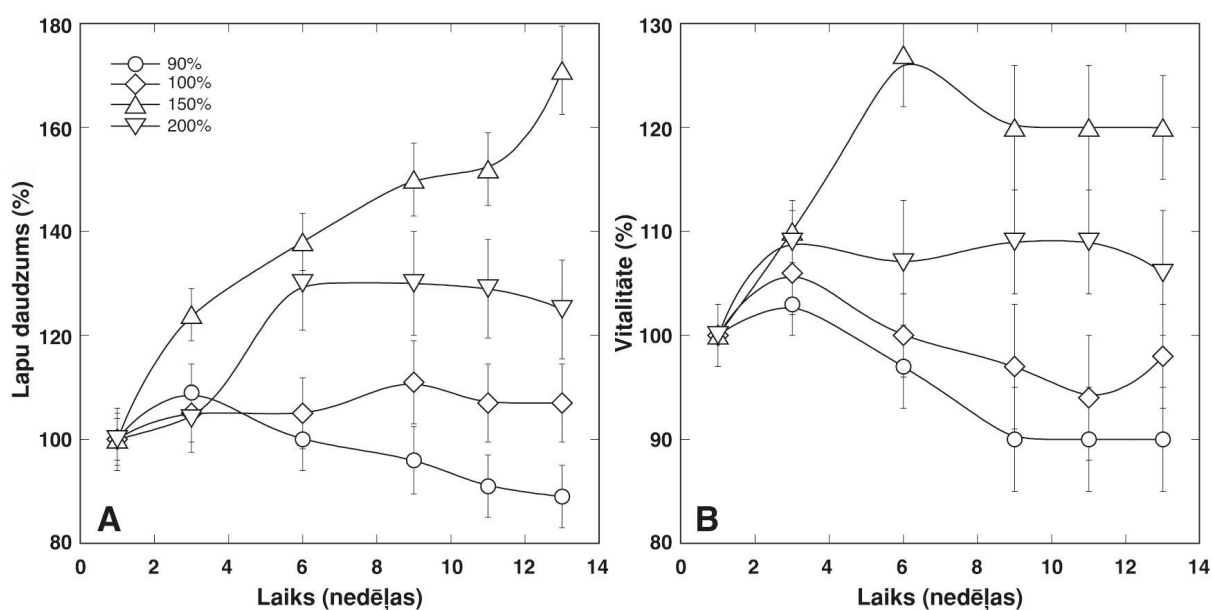
Lai noteiktu dažāda augsnes mitruma ietekmi uz *S. esthonica* augšanu un fotosintēzes rādītājiem, izvēlējās to augsnes minerālelementu sastāvu, kas atbilstošajā eksperimentā uzrādīja vispozitīvāko ietekmi uz augu attīstību un fluorescences rādītājiem, augsni Pope +. Atbilstoši priekšmēģinājumu rezultātiem, visā eksperimenta laikā nodrošināja četrus mitruma režīmus, ko nosacīti apzīmēja kā „optimālais“ (100%), „sausums“ (90%), „palielināts mitrums“ (150%) un „aplūdusi augsne“ (200%). Šajā pētījumā bija izslēgta dažādā mitruma nodrošinājuma ietekme uz *ex vitro* augu aklimatizāciju, jo līdz eksperimenta sākumam augus uzturēja optimāla augsnes mitruma apstākļos.

Attiecībā uz lapu skaita izmaiņām, visoptimālākais bija palielinātā mitruma režīms, pie kura varēja novērot stabilu lapu daudzuma palielināšanos visā eksperimenta gaitā (20. attēls A). Lapu skaita būtisks pieaugums bija novērojams arī applūdušā augsnē (200%) augošajiem *S. esthonica* augiem, bet to daudzums tālāk nemainījās sākot ar 6. nedēļu. Būtisks lapu skaita pieaugums nebija novērojams „optimālā” varianta (100%) augiem, bet sausuma apstākļos sākot ar 6. nedēļu bija vērojama pakāpeniska lapu skaita samazināšanās.

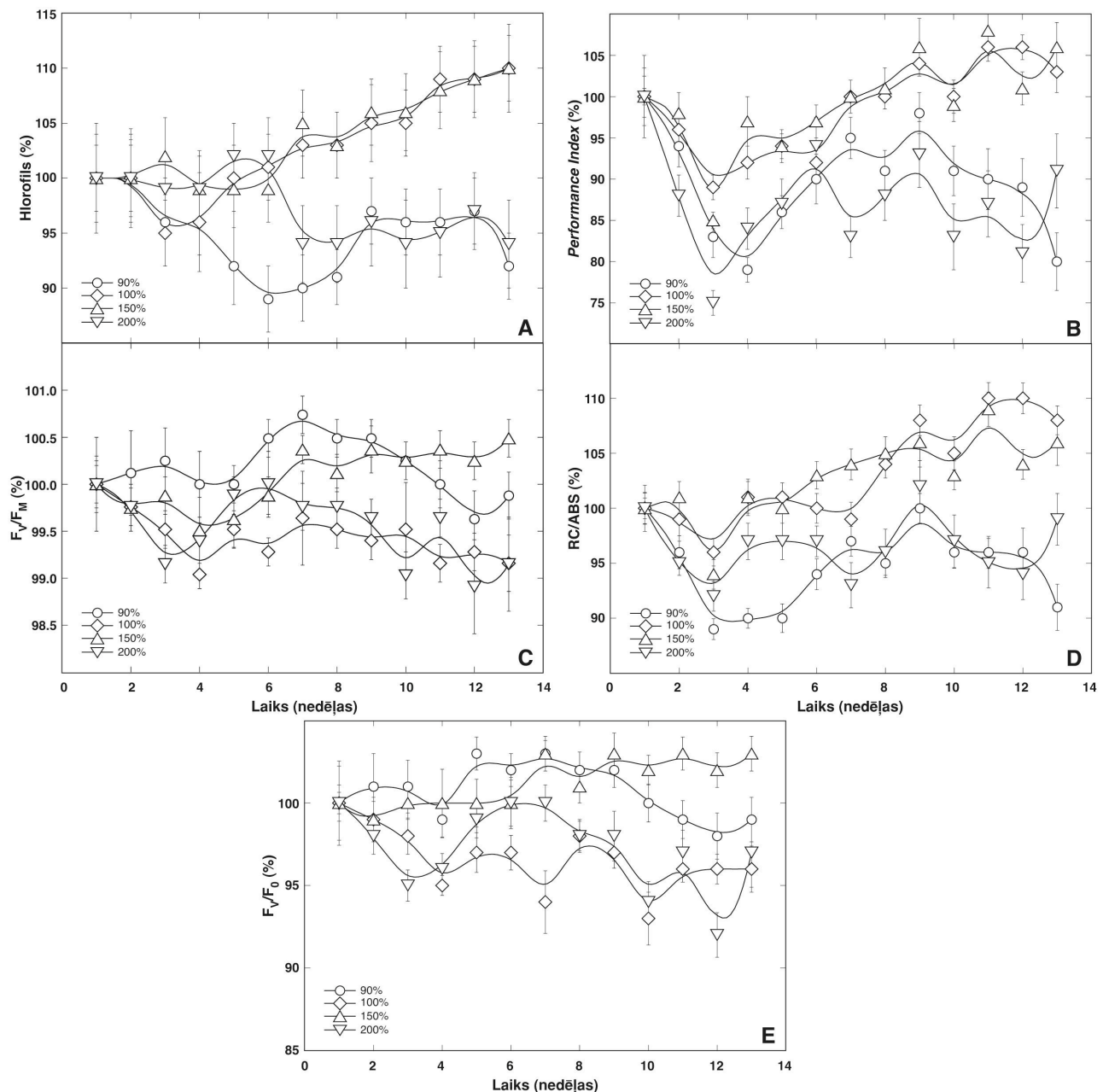
Arī vizuāli noteiktie vitalitātes rādītāji eksperimenta gaitā mainījās līdzīgi lapu daudzuma izmaiņām – stabils augu vitalitātes pieaugums bija novērojams augsnē ar palielinātu mitrumu līdz pat 6. nedēļai un tad tas saglabājās augstā līmenī (20. attēls B). Arī applūdušā augsnē augošajiem augiem vitalitāte nedaudz pieauga eksperimenta sākumā un tad saglabājās stabilā līmenī, bet kontroles un sausuma apstākļos tā būtiski samazinājās līdz 9. nedēļai.

Būtiski, ka augiem, kas auga appludinātā augsnē, pēc 4 nedēļu audzēšanas vizuāli varēja novērot violetu plankumu veidošanos starp dzīslām, kā arī, vēlākā periodā, hlorozi, parādot iespējamu metabolisma traucējumu sekas.

Pirmajās sešās nedēļās stabili nemainīgs lapu hlorofila līmenis saglabājās paaugstinātā mitruma (150%) un applūdušajiem (200%) augiem, bet optimālā mitruma režīmā (100%) novēroja nelielu samazinājumu 3. un 4. nedēļā, kam sekoja pieaugums (21. attēls A). Savukārt, sausā augsnē (90%) augošajiem augiem bija raksturīgs stabils lapu hlorofila satura samazinājums līdz 6. nedēļai. Sākot ar 7. nedēļu, 100% un 150% mitruma augiem bija novērojams vienāds un stabils hlorofila satura pieaugums līdz pat eksperimenta beigām. Pretēji tam, 200% mitruma augiem pēc strauja krituma no 6. līdz 7. nedēļai hlorofila saturs saglabājās stabilā līmenī. Kontroles augiem tajā pat laikā līdz 8. nedēļai novēroja hlorofila pieaugumu līdz 200% augu līmenim.



20. attēls. Lapu daudzuma izmaiņas (A) un augu vizuālais vitalitātes izvērtējums (B) *Saussurea esthonica* eksperimentos kontrolētos apstākļos ar dažādiem mitruma režīmiem.



21. attēls. Hlorofila saturs (A) un hlorofila a fluorescences parametru *Performance Index* (B), F_v/F_m (C), RC/ABS (D) un F_v/F_0 (E) izmaiņas *Saussurea esthonica* eksperimentos kontrolētos apstākļos ar dažādiem mitrums režīmiem.

Performance Index samazinājās visos eksperimentālajos variantos līdz 3. nedēļai, bet samazinājuma intensitāte bija atšķirīga dažādiem mitrums nodrošinājuma variantiem (21. attēls B). Tālākā laikā sekoja parametra pieaugums un variantiem ar viszemāko samazinājuma līmeni (100 un 150%) bija ilgstošāks pieaugums (līdz 9. nedēļai) nekā variantiem ar vislielāko samazinājuma līmeni (90 un 200%), kuriem tas bija tikai līdz 6. vai 7. nedēļai. Līdzīgi *Performance Index*, arī RC/ABS samazinājās līdz 3. nedēļai, bet samazinājums bija salīdzinoši mazāks (21. attēls D). Savukārt, sekojošais parametra pieaugums sākotnēji bija mazāk izteikts 100% variantā un stiprāk izteikts 200% variantā, izraisot šo variantu atšķirību īslaicīgu izlīdzināšanos. Eksperimenta beigās 100 un 150% mitrums nodrošinājuma varianti bija ar ievērojami augstāku RC/ABS līmeni nekā 200 un 90%

varianti.

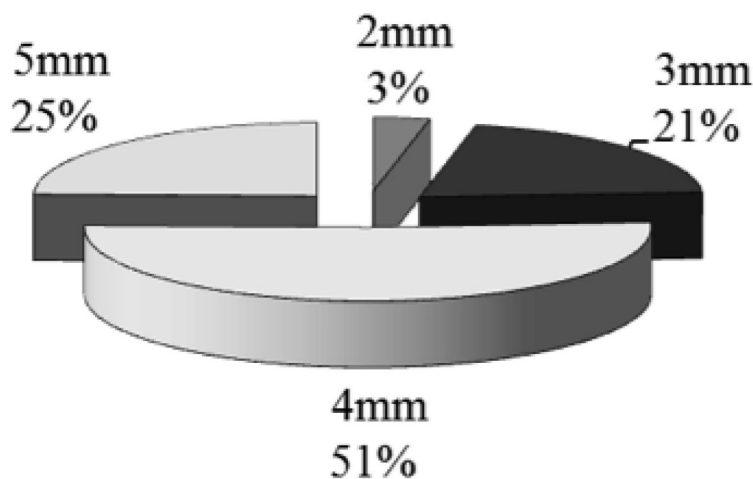
Pārsteidzoši, ka visaugstākais F_v/F_m līmenis eksperimenta sākuma posmā (līdz 4. nedēļai) bija 90% mitruma nodrošinājuma varianta augiem, bet neliels samazinājums bija vērojams visiem pārējiem variantiem (21. attēls C). Vidus posmā palielinājās visu mitruma variantu augu F_v/F_m , izņemot 100% variantu, bet 200% varianta līmenis līdz eksperimenta beigām nokritās līdz 100% varianta augu līmenim. Savukārt, 90% variantā arī bija novērojums kritums, bet 150% variantā F_v/F_m saglabājās konstantā līmenī līdz pat eksperimenta beigām. Līdzīgas, bet mazāk izteiktas izmaiņas eksperimenta gaitā novēroja attiecībā uz F_v/F_0 . Līdz ar to, pēc F_v/F_m un F_v/F_0 izmaiņām varēja secināt, ka vislabākajā stāvoklī bija augi 150% mitruma nodrošinājuma variantā, kam sekoja 90% varianta augi, bet 100 un 200% variantu augiem bija viszemākais šo parametru līmenis.

3.3. Sēklu dīgtspēja

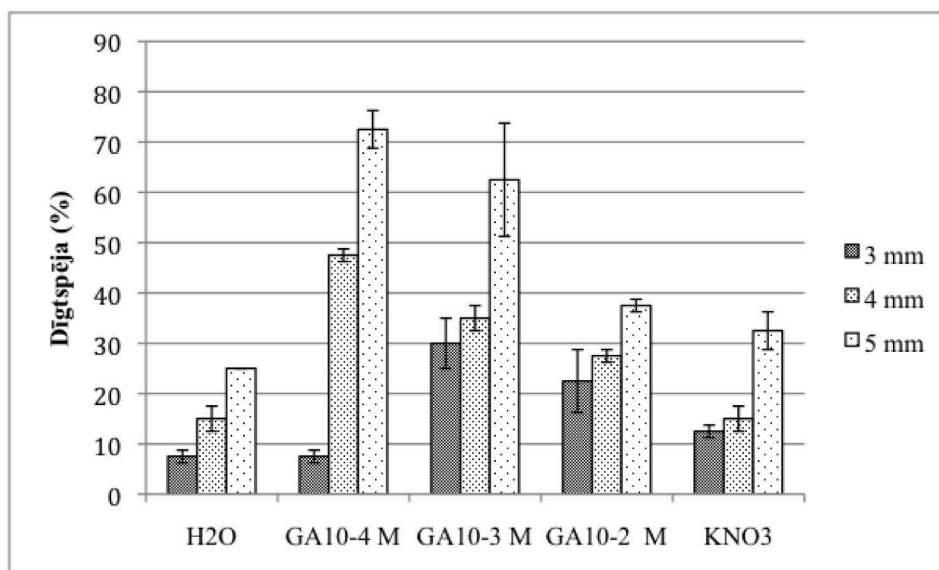
Savvaļā ievāktu *S. esthonica* sēklu garums variēja no 2 līdz 5 mm (22. attēls). Visvairāk bija 4 mm sēklu, bet 3 mm un 5 mm sēklas bija vienādā daudzumā. Mazo sēklu (2 mm) daudzums bija neliels un tās bija nedīgstošas. Vizuāli novērtējot, 44% no 3 līdz 5 mm garuma sēklām bija tukšas.

Sēklu dīgtspēja tumsā 22 °C temperatūrā bija atkarīga no to garuma. Sēklas, kuru garums bija 2 mm, bija nedīgstošas. Dīgtspēja būtiski palielinājās, pieaugot sēklu garumam, tomēr arī vislielāko sēklu (5 mm) dīgtspēja bija tikai 46% (23. attēls).

Sēklu dīgšanu ietekmēja gan apstrāde ar gibereliskābi (dažādās koncentrācijās), gan sēklu izmērs (23. attēls). Mazāko sēklu dīgšanas veicināšanai nepieciešamā zemākā GA_3 koncentrācija bija 10^{-3} M, bet vidējā un lielākā izmēra sēklām maksimālais dīgtspēju veicinošais efekts bija zemākajā GA_3 koncentrācijā (10^{-4} M). Tālāka koncentrācijas palielināšanās samazināja apstrādes stimulējošo ietekmi. Savukārt, sēklu apstrāde ar KNO_3 būtiski veicināja dīgtspēju tikai lielākā garuma (5 mm) sēklām.

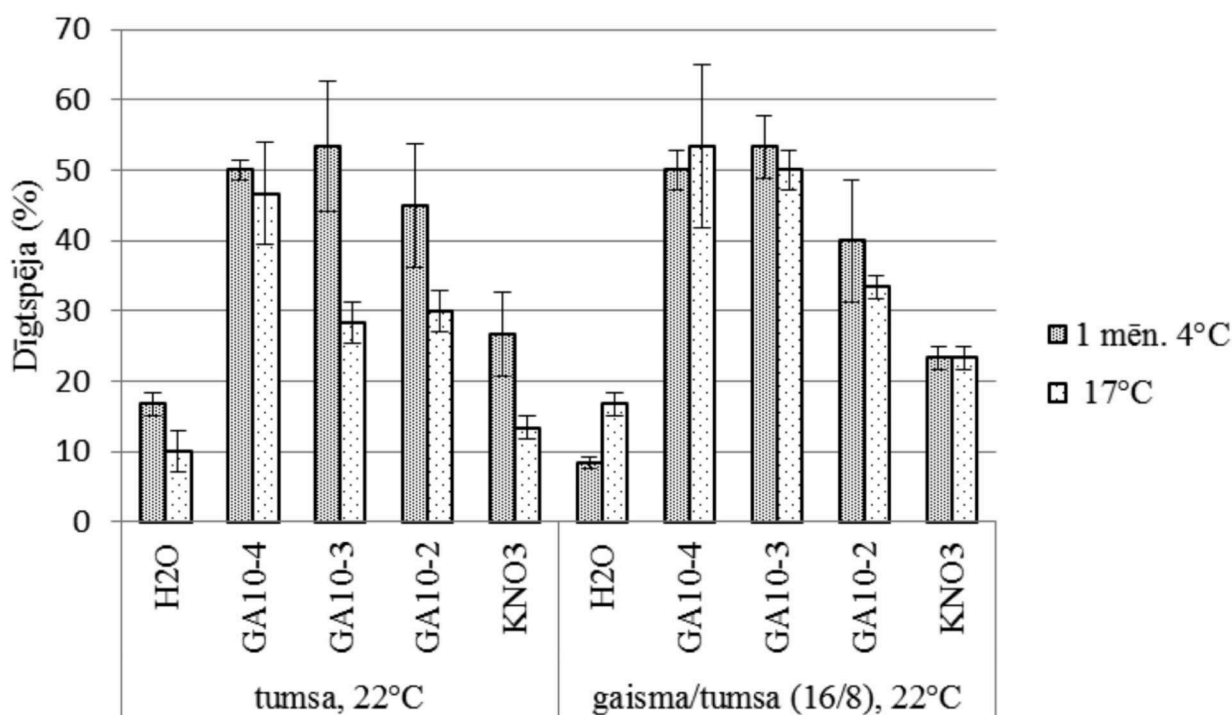


22. attēls. Dažāda garuma *Saussurea esthonica* sēklu relatīvais daudzums.



23. attēls. *Saussurea esthonica* sēklu dīgspēja atkarībā no sēklu garuma un apstrādes veida. Sēklu dīgspēja uzskaitīta no 30 dienās sadīgušo sēklu kopskaita.

Apgaismojuma un aukstās stratifikācijas ietekmi uz dīgšanu kombinācijā ar aktīvo vielu ietekmi pārbaudīja ar 4 mm garuma sēklām. Aukstā stratifikācija nedaudz veicināja sēklu dīgspēju tikai tumsā, bet mainīgos gaismas/tumsas apstākļos šai apstrādei bija būtisks inhibējošs efekts (24. attēls). Iepriekšējā stratifikācija veicināja dīgspēju tumsā sēklām, kas apstrādātas ar GA_3 vidējā un augstākajā koncentrācijā (10^{-3} un 10^{-2} M), bet ne zemākajā koncentrācijā. Arī KNO_3 veicināja dīgspēju iepriekš stratificētām sēklām, bet būtiski nepaaugstināja to $17^\circ C$ apstākļos uzglabātām sēklām. Fotoperioda apstākļos diedzētām sēklām dažādu GA_3 koncentrāciju veicinošā ietekme uz



24. attēls. *Saussurea esthonica* 4 mm garuma sēklu dīgspēja atkarībā no sēklu priekšapstrādes, apgaismojuma un apstrādes veida. Sēklu dīgspēja uzskaitīta no 30 dienās sadīgušo sēklu kopskaita.

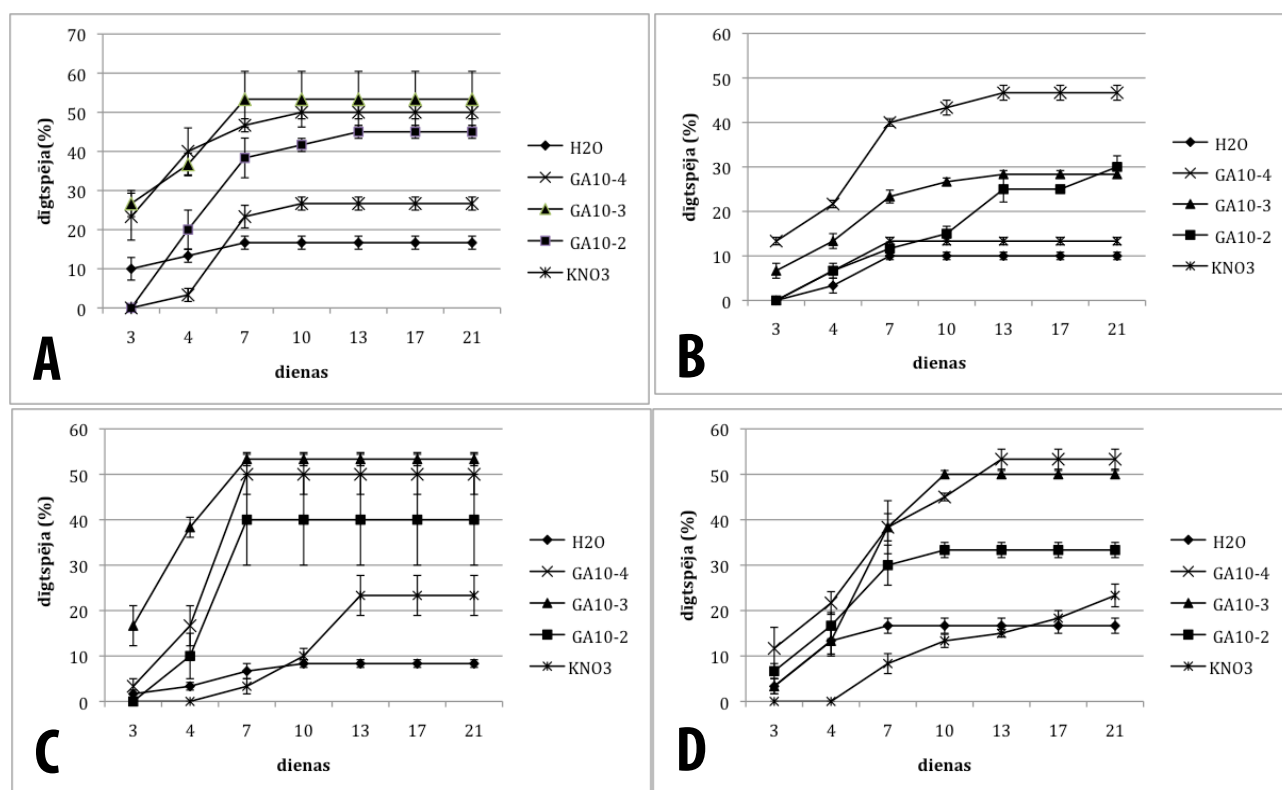
dīgspēju bija tāda pati, kā tumsā diedzētām, taču iepriekšēja aukstā stratifikācija nemainīja GA₃ ietekmi. Salīdzinot GA₃ ietekmi 17 °C apstākļos uzglabātām sēklām, varēja konstatēt, ka fotoperioda apstākļos diedzētām sēklām GA₃ ietekme bija izteiktāka, izņemot zemāko (10⁻⁴ M) koncentrāciju.

Salīdzinot sēkļu dīgšanas dinamiku dažādos apstākļos un ar vai bez priekšapstrādes, konstatēja, ka dīgšanas ilgums variēja starp 3 un 21 dienu ar maksimumu 4 līdz 7 dienas (25. attēls). Lielākā daļa sēkļu uzdīga 14 dienu laikā. Tikai 2% sēkļu dīga 14 līdz 21 dienu.

Tumsas apstākļos diedzētām iepriekš stratificētām sēklām izmantotā GA₃ koncentrācija neietekmēja dīgšanas ātrumu, mainījās tikai kopējais sadīgušo sēkļu skaits (25. attēls A). Turpretī, tumsā bez iepriekšējas stratifikācijas augstāku GA₃ koncentrāciju klātbūtnē samazinājās gan dīgšanas ātrums, gan kopējais uzdīgušo sēkļu skaits (25. attēls B). Fotoperioda apstākļos diedzētām sēklām šī atšķirība sadīgušo sēkļu skaitā nebija novērojama (25. attēls C un D). Tātad, stratifikācija palielināja ar GA₃ apstrādāto sēkļu dīgšanas ātrumu diedzējot gan tumsā, gan fotoperioda apstākļos.

Interesanti, ka fotoperioda apstākļos iepriekšējā aukstā stratifikācija izmainīja sēkļu dīgšanas dinamiku raksturu KNO₃ klātbūtnē, bet neietekmēja kopējo sadīgušo sēkļu skaitu – dīgšanas ātrums bija lielāks stratificētām sēklām un tās ātrāk sadīga (20. attēls C), bet bez stratifikācijas dīgšana bija izteikti pakāpeniska (25. attēls D). Tumsā KNO₃ veicināja stratificētu sēkļu dīgšanu, palielinot dīgšanas ātrumu, bet ne dīgšanas laiku (25. attēls A), salīdzinot ar nestratificētām sēklām (25. attēls B), jo abos gadījumos galējais sadīgušo sēkļu skaits tika sasniegts 7 dienu laikā.

Daļa no sēklām (19.5%), kas neuzdīga viena mēneša laikā, tika novērtētas kā nedīgstošas (sēklas



25. attēls. *Saussurea esthonica* 4 mm sēkļu frakcijas dīgšanas dinamika 22 °C tumsā pēc priekšapstrādes ar stratifikāciju 1 mēnesi 4 °C (A), 22 °C tumsā bez priekšapstrādes (B), 22 °C gaisma/tumsa 16/8 h pēc priekšapstrādes ar stratifikāciju 1 mēnesi 4 °C (C), 22 °C gaisma/tumsa 16/8 h bez priekšapstrādes (D).

iekšpusē novēroja baltu dīgli), pārējās bija nedzīvas, jo sāka pelēt, bet iekšējie audi bija melni. Lielākā daļa no nedīgstošajām sēklām bija diedzētas KNO_3 (71%) vai H_2O (17.8%) klātbūtnē. Pēc sekojošas skarifikācijas tās uzdīga 2 līdz 5 dienu laikā.

3.4. Veģetatīvās vairošanās potenciāls

Veģetatīvās vairošanās potenciālu noteica, analizējot veidoto dzinumu skaitu pēc pārziemošanas otrajā un trešajā veģetācijas sezonā. Pirmajā gadā pēc pārziemošanas viens augs vidēji veidoja 5 atsevišķus dzinumus (13. tabula). Tomēr, trīs no augiem veidoja tikai pa vienam dzinumam. Otrajā gadā vidējais dzinumu skaits bija 1.22 reizes lielāks (13. tabula). Pirmajā gadā pēc pārziemošanas ziedošos dzinumus novēroja 4 augiem, pie kam diviem no tiem novēroja divus ziedkātus katram. Otrajā gadā atkārtoti ziedēja tikai viens augs, pārējie ziedošie bija tādi, kas iepriekšējā gadā neziedēja.

Lai noskaidrotu, ar kādu struktūru starpniecību *S. esthonica* vairojas veģetatīvi un kāds ir tās iespējamais potenciāls, divus augus izņēma no veģetācijas traukiem un novērtēja. Konstatēja, ka veidojas divu veidu dzinumi – vertikāli orientēti adventīvie dzinumi tuvu galvenajam dzinumam no auga sakņu centra un daļēji horizontāli orientēti apakšzemes atzari ar dzinumiem attālināti no galvenā dzinuma, veidojot stoloniem līdzīgas struktūras (26. attēls). Jauno dzinumu atdalīšanos no galvenā dzinuma nenovēroja.

13. tabula. Vidējais dzinumu skaits un ģeneratīvo dzinumu skaits vienam *Saussurea esthonica* augam pēc augu pārziemošanas 2011. un 2012. gadā

Gads	Vidējais dzinumu skaits	Ziedošo dzinumu skaits
2011.	5.00 ± 1.30	0.60 ± 0.27
2012.	6.10 ± 0.56	0.50 ± 0.08



26. attēls. *Saussurea esthonica* veģetatīvās vairošanās formas: pie mātesauga pamatnes veidojošies adventīvie dzinumi (A), izplatība ar sakneņiem (B).

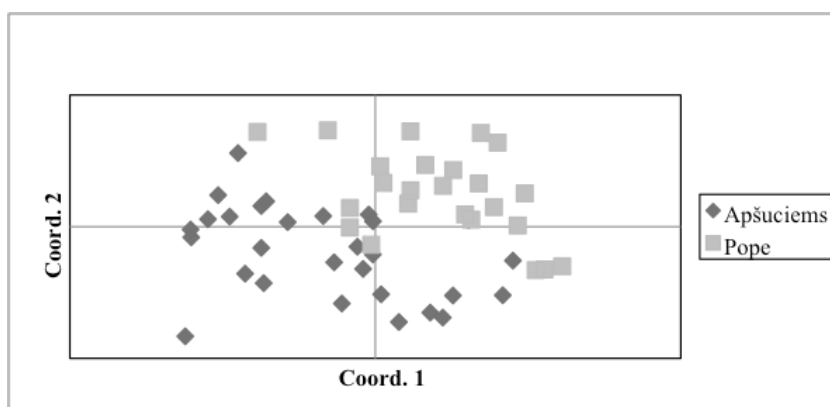
3.5. Molekulāri ģenētiskā izpēte

3.5.1. Daudzveidība Latvijas populācijās

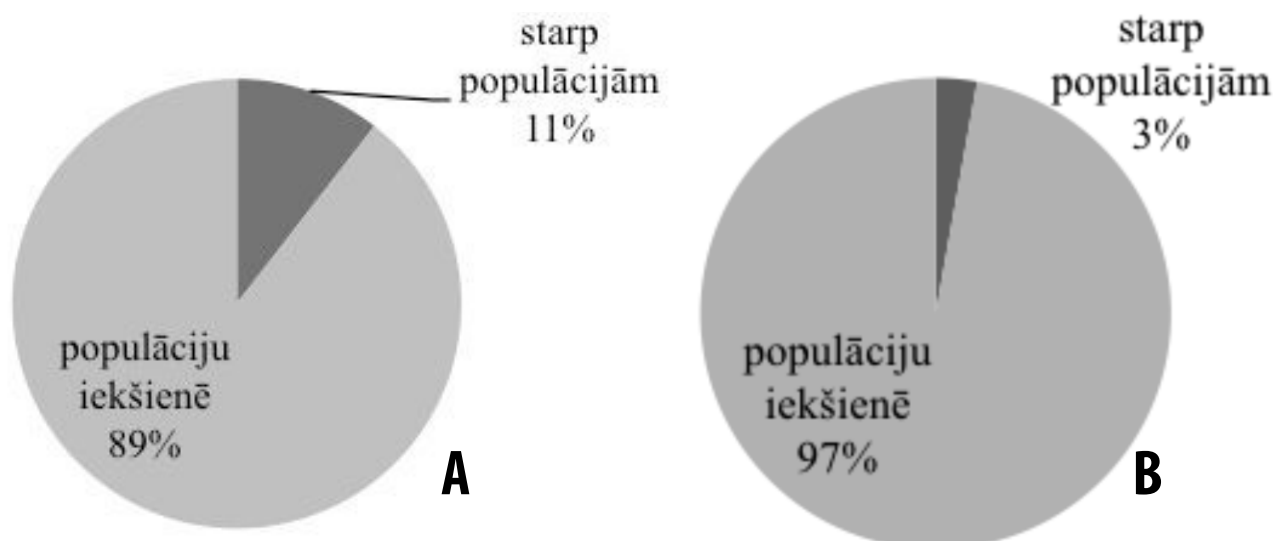
Saussurea esthonica Latvijas populācijas ģenētisko daudzveidību analizēja ar iPBS un AFLP metodēm. iPBS analizē pieci praimeru kopumā producēja (uzrādīja) 67 DNS fragmentus. Četrus unikālus fragmentus konstatēja Apšuciema populācijā. Šajā populācijā bija arī nedaudz augstāka sagaidāmā heterozigotāte (0.30) nekā Popes populācijā (0.29).

Ar AFLP analīzi ieguva 208 DNS fragmentus. Arī ar šo analīzi augstāka sagaidāmā heterozigotāte bija Apšuciema populācijā (0.32), kā arī bija 5 unikāli fragmenti. Popes populācijā attiecīgi sagaidāmā heterozigotāte bija 0.3 un bija 2 unikāli fragmenti. Vizualizējot rezultātus pamata koordinātu sistēmā, katras populācijas indivīdi izvietojās atsevišķi (27. attēls).

Analizējot ģenētisko daudzveidību starp populācijām un populāciju iekšienē, abas izmantotās metodes uzrādīja daudzveidību gan starp populācijām, gan to iekšienē (28. attēls). Ar iPBS analīzi starp populācijām bija 11% daudzveidības, savukārt, populāciju iekšienē – 89%. Analizējot ar AFLP metodi, starp populācijām bija 3% daudzveidības, bet populāciju iekšienē – 97%.



27. attēls. Uz *Saussurea esthonica* Latvijas populāciju iPBS analīzi balstītā pamata koordinātu analīze



28. attēls. Ģenētiskās daudzveidības sadalījums *Saussurea esthonica* Latvijas populācijās ar iPBS analīzi (A) un ar AFLP metodi (B).

Unikālo fragmentu skaits, sagaidāmā heterozigotāte un polimorfo lokusu skaits, kas ir galvenie ģenētiskās daudzveidības rādītāji, redzami 14. tabulā.

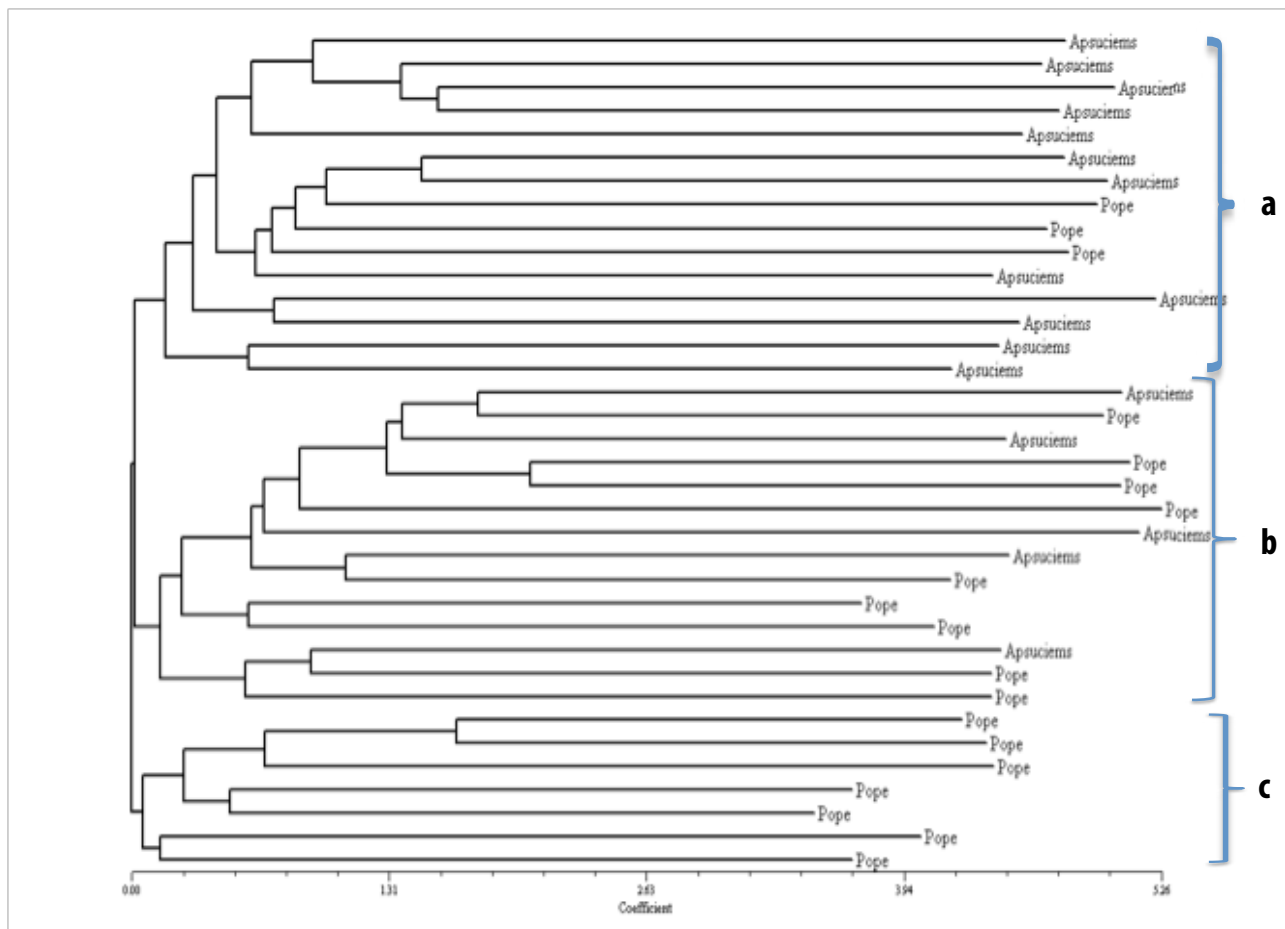
Uz AFLP datiem balstītajā dendrogrammā *S. esthonica* indivīdi izveidoja trīs grupas – Apšuciema, Apšuciema-Popes un Popes (29. attēls).

3.5.2. Daudzveidība starp populācijām Latvijā un Igaunijā

Tā kā analizējot daudzveidību starp populācijām Latvijā, iPBS metode uzrādīja lielāku daudzveidību starp populācijām, tad šo metodi izmantoja daudzveidības analīzei starp Latvijas

14. tabula. *Saussurea esthonica* Latvijas populāciju ģenētiskajās analīzēs atrastais unikālo fragmentu skaits, sagaidāmā heterozigotāte un polimorfo lokusu skaits

Parametrs	Apšuciems		Pope	
	iPBS	AFLP	iPBS	AFLP
Fragmentu skaits	67	206	63	203
Fragmentu skaits ($\geq 5\%$)	66	206	63	8203
Unikālo fragmentu skaits	4	5	0	2
Vidējā sagaidāmā heterozigotāte	0.297	0.324	0.251	0.303
Polimorfie lokusi (%)	82.09	95.67	73.13	93.75



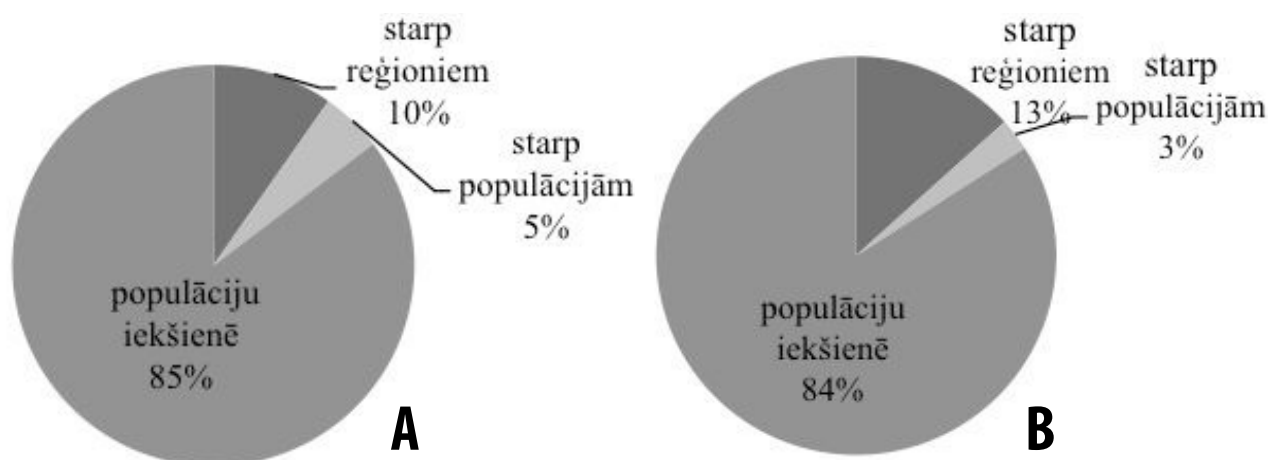
29. attēls. Neighbour-joining klasteru analīze, pamatojoties uz iegūtajiem *Saussurea esthonica* Latvijas populāciju AFLP analīzes datiem.

un Igaunijas populācijām. Izmantoja neiezīmētos un iezīmētos PBS marķierus. Analīzē ar neiezīmētajiem PBS marķieriem rezultātus vizualizēja agarozes gēlā un izveidojās 51 DNS fragmenta josla. Ar iezīmētajiem PBS marķieriem analīzes veica ģenētiskajā analizatorā (sekvenatorā) izmantojot *GeneMapper* v4.0 programmu, un ieguva 365 fragmentus. Tos tālāk analizējot, noteica daudzveidību starp populācijām, populāciju iekšienē un starp reģioniem. Lielākā daudzveidība bija vērojama populāciju iekšienē, daudzveidība starp populācijām bija neliela (3 līdz 5%), salīdzinoši lielāka daudzveidība bija starp reģioniem (Latvija un Igaunija) (10 līdz 13%) (30. attēls). Salīdzinot abas metodes, atšķirības starp tām bija salīdzinoši nelielas.

Informācija par unikālo fragmentu skaitu, sagaidāmo heterozigotāti un polimorfo lokusu skaitu apkopota 15. tabulā.

Populāciju īpatņu sadalījums pamata koordinātu sistēmā parāda, ka abu populāciju diferenciācija Latvijā un Igaunijā bija neliela (31. attēls). Neatkarīgi no lietotās metodes, Latvijas populācijas veidoja vienu klasteri un Igaunijas populācijas – otru, t.i., atšķirība starp reģioniem bija izteiktākās (31. attēls).

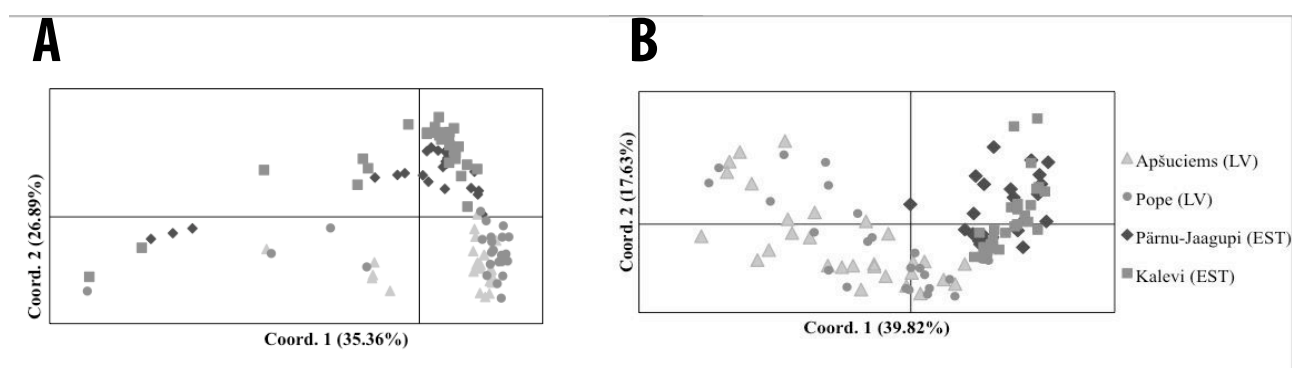
Nei ģenētiskās distancas starp Latvijas populācijām bija 0.062 un 0.003 ar neiezīmētajiem un iezīmētajiem iPBS marķieriem, starp populācijām Igaunijā attiecīgi – 0.041 un 0.002. Atšķirības



30. attēls. Ģenētiskā daudzveidība *Saussurea esthonica* Latvijas un Igaunijas populāciju iekšienē un starp populācijām ar neiezīmētajiem PBS marķieriem (A), ar iezīmētajiem PBS marķieriem (B).

15. tabula. *Saussurea esthonica* Latvijas un Igaunijas populāciju ģenētiskajās analizēs atrastais unikālo fragmentu skaits, sagaidāmā heterozigotāte un polimorfo lokusu skaits, analizējot ar neiezīmētajiem (N-PBS) un iezīmētajiem (I-PBS) PBS marķieriem

Parametrs	Pārnu-Jaagupi		Kalevi		Apšuciems		Pope	
	N-PBS	I-PBS	N-PBS	I-PBS	N-PBS	I-PBS	N-PBS	I-PBS
Fragmentu skaits	43	152	41	130	50	222	47	226
Fragmentu skaits ($\geq 5\%$)	41	127	37	87	49	145	47	151
Unikālo fragmentu skaits	0	28	0	22	1	50	0	48
Vidējā sagaidāmā heterozigotāte	0.231	0.051	0.219	0.041	0.279	0.078	0.236	0.077
Polimorfie lokusi (%)	76.4	41.64	72.55	35.62	78.43	60.82	68.63	61.92



31. attēls. Latvijas un Igaunijas *Saussurea esthonica* populāciju īpatņu sadalījums koordinātu sistēmā ar neiezīmētajiem PBS marķieriem (A), ar iezīmētajiem PBS marķieriem (B).

iegūtajos rezultātos skaidrojamas ar atšķirīgo iegūto fragmentu skaitu ar katru no metodēm. Tomēr starp Igaunijas populācijām *Nei* ģenētiskās distances bija mazākas nekā starp Latvijas populācijām.

3.5.3. Dažādu *Saussurea* sugu salīdzinājums

3.5.3.1. ITS sekvenēšana

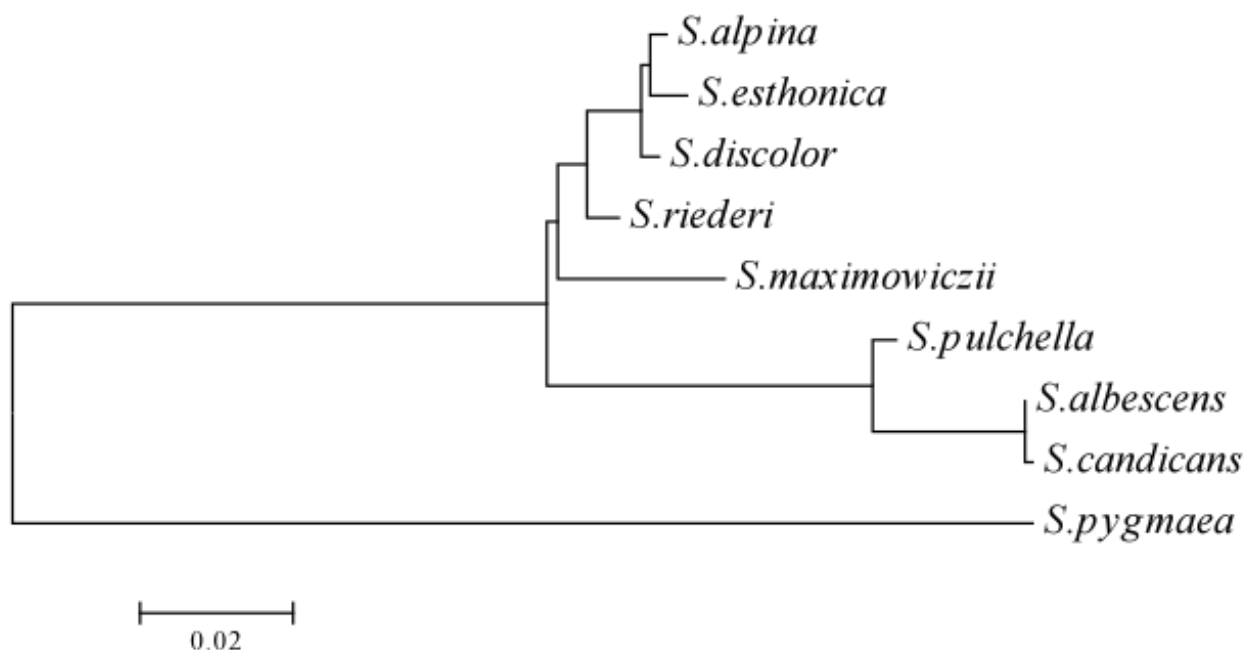
Saussurea sugu salīdzināšanai izmantoja ITS un iezīmētos PBS marķierus. Kopumā ieguva ITS sekvences no 9 *Saussurea* sugu 45 indivīdiem (16. tabula).

Zemas kvalitātes sekvences neanalizēja, līdz ar to, analizējamās sekvences bija aptuveni 486 nukleotīdu garas. Tās atrodamas NCBI sekvenču datubāzē ar numuriem no JN808226 līdz JN808270. Identificēja septiņas viena nukleotīda insercijas vai delēcijas. No 486 analizētajiem nukleotīdiem 150 bija mainīgi, un no tiem 49 bija vairāk nekā vienā sekvencē, turpretim 101 bija singletoni (atradās tikai vienā sekvencē). Lielākā daļa singletonu atradās vienā sekvencē, ko ieguva no *S. pygmaea* (90 vietas). Septiņas singletonu vietas atrada vienā no divām *S. maximowiczii* sekvencēm. Izmantojot katras sugas sekvences, aprēķināja ģenētisko distanci (*p-distance* metode) starp sugām un izmantojot *Neighbour-joining* metodi konstruēja dendrogrammu (32. attēls).

Filoģenēzē *S. alpina*, *S. esthonica* un *S. discolor* sagrupējās vienā klasterī, mazliet atstatus izvietojās *S. riederi* un *S. maximowiczii*. Savukārt, *S. pulchella*, *S. albescens* un *S. candicans* veidoja atsevišķu klasteri, bet *S. pygmaea* atradās atsevišķi no pārējām sugām.

16. tabula. Ar ITS un PBS DNS marķieriem analizēto dažādu *Saussurea* sugu indivīdu skaits

Parametrs	ITS sekvenēšanā	Ar iPBS metodi
<i>S. esthonica</i> (4 populācijas)	13	50
<i>S. riederi</i>	2	2
<i>S. discolor</i>	6	9
<i>S. alpina</i> (3 populācijas)	8	7
<i>S. pulchella</i> (2 populācijas)	7	28
<i>S. candicans</i>	2	2
<i>S. albescens</i>	4	11
<i>S. maximowiczii</i>	2	2
<i>S. pygmaea</i>	1	1



32. attēls. *Neighbour-joining* dendrogramma, kas veidota, izmantojot ģenētiskās distancas, iegūtas pēc ITS sekvenču datiem *Saussurea* dažādu sugu ģenētiskajā analizē.

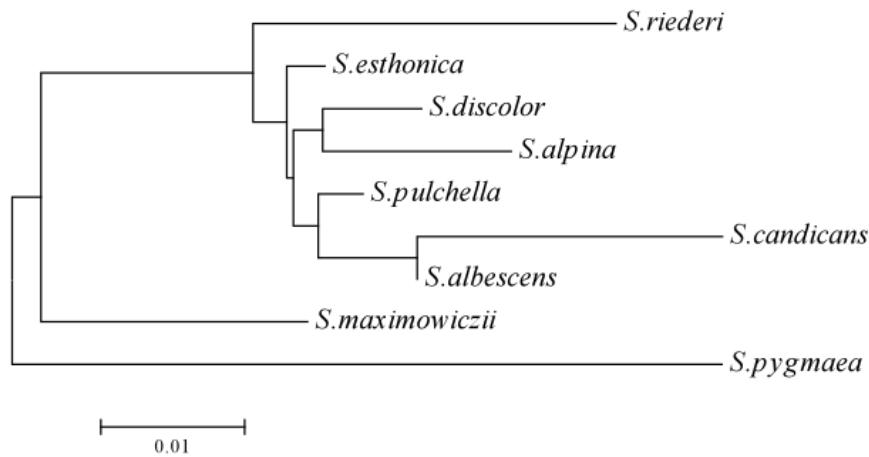
3.5.3.2. iPBS marķieru analīze

Kopumā analizēja deviņu sugu 112 individuus (13. tabula). Atkarībā no uzdīgušo augu skaita, analizēto individu skaits variēja no viena (*S. pygmaea*) līdz 28 (*S. pulchella*). Ar šo metodi ieguva 253 informatīvus DNS fragmentus. Fragmentu skaits katrai sugai korelēja ar analizējamo individu skaitu (*Spearman's rank correlation* $r_s = -0.93$, $p < 0.01$). Tas norāda, ka ģenētiskās daudzveidības līmenis sugas iekšienē, ko detektē iPBS marķieri, ir augsts. Tas parādās arī AMOVAs rezultātos (izņemot *S. pygmaea*, kurai analizēja tikai vienu individu): ģenētiskā daudzveidība sugas iekšienē bija 84%, 16% starp sugām ($p < 0.001$). AMOVA analizē, salīdzinot ITS sekvenču datus, 26% ģenētiskās daudzveidības atrada sugu iekšienē, 74% starp sugām ($p < 0.001$). Filoģenētiskais koks, kuru ieguva analizējot iPBS marķieru datus, bija līdzīgs ar ITS marķieriem iegūtajam (33. attēls).

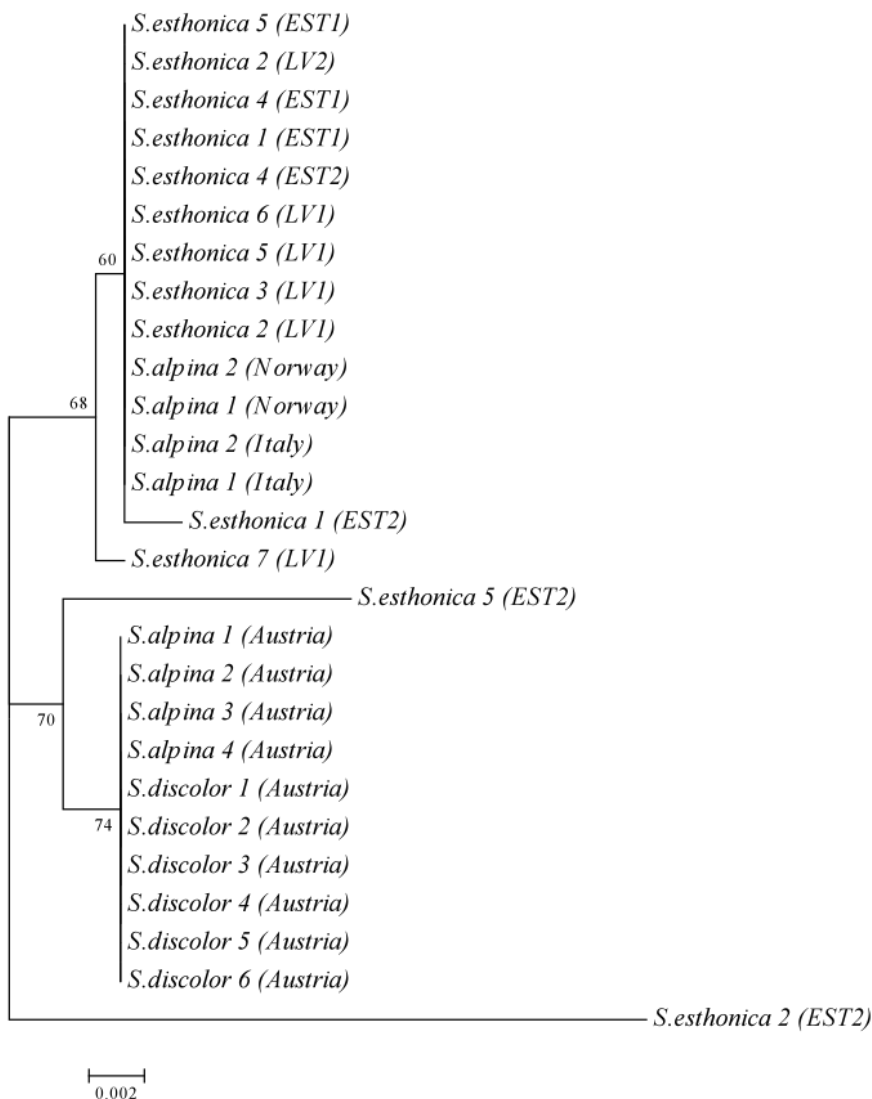
3.5.3.3. *S. esthonica* taksonomiskā radniecība ar *S. alpina* un *S. discolor*

Lai labāk izpētītu *S. esthonica* taksonomisko statusu, veica tālāku filoģenētisko analīzi izmantojot trīs sugu – *S. esthonica*, *S. alpina* un *S. discolor* individuus. Konstruēja *Neighbour-joining* filoģenētisko koku, izmantojot *p-distance* ģenētisko distanci starp indivīdiem (34. attēls). Lai arī vērojamas dažas atkāpes, piemēram, [*S. esthonica* 2 (EST2) un *S. esthonica* 5 (EST2)], vairums indivīdu veidoja klasterus atbilstoši sugām un populācijām. Interesants rezultāts bija tas, ka *S. alpina* Austrijas populācija veidoja klasteri ar *S. discolor* (sekvences bija identiskas), kas arī ir no Austrijas. Savukārt, *S. alpina* Itālijas un Norvēģijas populācijas veidoja klasteri ar *S. esthonica* indivīdiem (sekvences bija identiskas). Atšķirības starp pētītajām populācijām Latvijā un Igaunijā šajā analizē nenovēroja.

Lai pētītu *S. esthonica* radniecību ar citām *Saussurea* sugām, izmantoja ITS reģionu sekvenēšanu



33. attēls. *Neighbour-joining* dendrogramma, kas veidota, izmantojot ģenētiskās distances, iegūtas pēc iPBS sekvenču datiem *Saussurea* dažādu sugu ģenētiskajā analizē.



34. attēls. *S. esthonica*, *S. alpina* un *S. discolor* *Neighbour-joining* dendrogramma izmantojot ģenētiskās distances, kas iegūtas ITS analizē. Skaitļi zem zariem ir *bootstrap* līmeņi (%) (1000 *bootstraps*). LV 1 – Apšuciema populācija, LV 2 – Popes populācija, EST 1 - Pārnu-Jaagupi populācija, EST 2 – Kalevi populācija.

un iPBS marķieru analīzi, kas apskata (pēta) atšķirīgus genoma rajonus. ITS reģions ir konservatīvs un tiek plaši izmantots filoģenēzes pētījumos, savukārt iPBS tehnika ir jauna (Kalendar *et al.* 2010) un tā balstās uz variablajiem un nestabilajiem genoma komponentiem – retrotranspozoniem. Atšķirības starp abām metodēm parādās rezultātos, tomēr neatkarīgi no šīm atšķirībām, filoģenētiskā radniecība ar abām marķieru metodēm atklāj līdzīgus rezultātus: *S. esthonica* veido klasteri ar *S. alpina* un *S. discolor*, savukārt, *S. pygmaea* ir ļoti atšķirīga no pārējām analizētajām Eiropas sugām. Tomēr, tā kā bija pieejams tikai viens analizējams indivīds, tad, lai precizētu rezultātu, būtu nepieciešama vairāku indivīdu analīze.

4. Diskusija

4.1. *In vitro* kultūras sugu saglabāšanai *ex situ*

Aizsargājamās augus saglabā gan dabiskajās augšanas vietās (*in situ*), gan ārpus tām (*ex situ*). Lai nodrošinātu *ex situ* saglabāšanu, augus iespējams uzturēt un pavairot audu kultūrā (*in vitro*). Literatūrā minēta informācija par *ex situ* kolekciju veidošanu, izmantojot *in vitro* kultūras (Holobiuc, Blindu 2007; Paunescu 2009). Bieži augus no *in vitro* kolekcijām izmanto tālāk reintrodukcijai dabiskā areāla robežās (Edson *et al.* 1997). Galvenais uzsvars aizsargājamo augu pavairošanai audu kultūrās tiek likts uz optimālu *in vitro* protokola izstrādi katrai sugai, nelietojot pārmērīgas fitohormonu koncentrācijas. Eksplanta izvēle (sēklas vai dzinumi) ir būtisks priekšnoteikums veiksmīgas *in vitro* kultūras izveidei. Tā kā *S. esthonica in vitro* kultūras ieguve no dzinumiem ir problemātiska augstā inficētības riska dēļ (Gailīte *et al.* 2010) un no ārvalstu botāniskajiem dārziem varēja saņemt sēklas, tad ārzemju paraugu *in vitro* kultūras uzsākšanai kā eksplantus izmantoja sēklas. Jāpiebilst, ka vairumā gadījumu nebija zināms sēklu ieguves laiks un uzglabāšanas apstākļi.

Kā zināms, citokinīni veicina sēklu dīgospēju. Kinetīns veicina dīgospēju halofītiem, kuriem miera periodu rada paaugstināta sāļu koncentrācija (Khan, Ungar 1997; Khan *et al.* 2004). Tas palīdz neitralizēt abscīzskābes izraisīto dīgospējas inhibēšanu (Khan 1968). *Saussurea* sugu sēklas diedzēja barotnēs ar un bez kinetīna, lai izvērtētu kinetīna ietekmi. Sēklas diedzējot gan bezhormonu barotnē, gan ar kinetīnu, liela atšķirība starp variantiem neparādījās (kinetīna ietekme bija maza, līdz 2%). Iespējams, tas saistīts ar salīdzinoši zemu kinetīna koncentrāciju barotnē, jo, lietojot lielākas koncentrācijas *Lotus corniculatus* diedzēšanai, dīgospēja palielinājās par 5 līdz 30%, tomēr iegūtais rezultāts bija atkarīgs gan no sēklu ievākšanas gada, gan kinetīna koncentrācijas (0.08, 0.22, 0.35, 0.8, 2.2, 3.5 μM) (Nikolić *et al.* 2006). Vairums eksperimenta sēklu uzdīga trīs nedēļu laikā. Literatūrā atrodami dati tikai par *Saussurea lappa* dīgšanu *in vitro* apstākļos (Arora, Bhojwani 1989) un noskaidrots, ka sēklas uzdīgst 3-4 dienu laikā MS pamatbarotnē 25 °C. Klasiskajā dīgospējas testā laboratorijas apstākļos *Saussurea costus* uzdīgst trīs līdz 21 dienu laikā (Sharma *et al.* 2006).

In vitro kultūru uzturēšanai plaši izmanto dažādus augšanas regulatorus. Tā kā *S. esthonica* labi apsākņojas bezhormonu barotnē, tad darbā neapskatīja augsīnu ietekmi uz sakņu veidošanos; savukārt, bez citokinīniem nav iespējama šī auga proliferācija. Iegūtie rezultāti parādīja, ka labāko proliferāciju iegūst, barotnei pievienojot BAP. Joshi, Dhar (2003) secinājuši, ka BAP izmantošana

S. obvallata pavairošanai ir labāka par kinetīnu, bet, inducējot dzinumus no kallusa kultūras, proliferācijas barotnei pievieno gan kinetīnu, gan naftiletiķskābi. Šī pētījuma rezultāti rāda, ka kinetīns lietotajās koncentrācijās veicina sakņu veidošanos un zemākajās koncentrācijās arī sakņu augšanu garumā. Citokinīns 2-iP 0.25 mg L⁻¹ veicināja sakņu veidošanos, bet lielākās koncentrācijās sakņu garums un laukums samazinājās. *Chuenboonngarm et al.* (2001) pārbaudījis, ka *Gardenia jasminoides* proliferācijai lietojot 2.5 līdz 10 mg L⁻¹ 2-iP iegūst dažus dzinumus (1 līdz 5), bet šādas koncentrācijas izsauc somaklonālās izmaiņas. Izmantojot 2-iP desmit reižu mazākā koncentrācijā, neizdevās panākt *S. esthonica* proliferāciju, taču nenovēroja arī somaklonālās izmaiņas. Arī citi autori uzskata, ka reto augu saglabāšanai *in vitro* ir svarīgi izmantot minimāli optimālas augšanas regulatoru devas, lai izvairītos no somaklonālajām izmaiņām; kaut arī, atsevišķos gadījumos tieši somaklonālo izmaiņu inducēšanai varētu būt pozitīvs efekts ģenētiskās daudzveidības palielināšanas kontekstā (Fay 1992; Paunescu 2009).

Pavairošanai optimālākais citokinīns bija BAP, bet kinetīns un 2-iP maz ietekmēja *S. esthonica* proliferāciju. Tomēr 2-iP var izmantot augšanas un apsākņošanas veicināšanai. Galvenā uzmanība jāpievērš adekvātām, bet ne pārmērīgām augšanas regulatoru koncentrācijām.

Augus saglabājot *in vitro* kolekcijā, jādomā par daudzu meriklonu saglabāšanu, lai nodrošinātu ģenētisko daudzveidību, līdz ar to, sēklu banka varētu būt optimālāks risinājums saglabāšanai. Tajā pat laikā, sēklas uzglabājot ilgstoši, nepieciešams periodisks monitorings, jo pētījumi rāda, ka sēklas no vēsām, mitrām dzīvotnēm glabājas sliktāk (Probert *et al.* 2009).

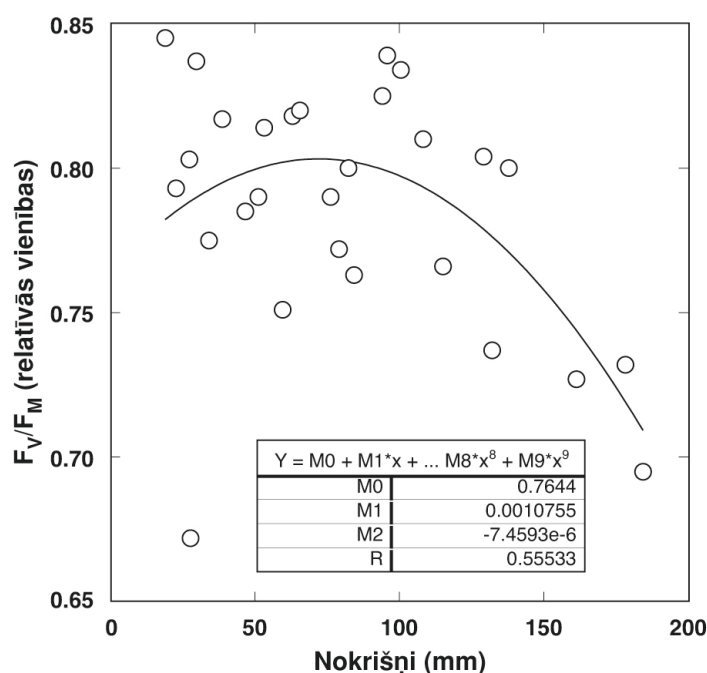
4.2. Ekofizioloģiskie pētījumi dabiskajos apstākļos

Lai salīdzinātu augu adaptāciju vidē un noteiktu to „labsajūtu”, izmantoja hlorofila satura un hlorofila *a* fluorescences noteikšanu ar nedestruktīvām metodēm. Hlorofila saturs parāda ilglaicīgu izmaiņu ietekmi. Kopumā veģētācijas sezonas beigās tam bija tendence samazināties, kas skaidrojams ar lapu novecošanos (Adams *et al.* 1990). Popē un Igaunijā mērītajiem augiem hlorofila saturs veģētācijas periodā ģeneratīvo augu lapās bija lielāks nekā veģetatīvo augu lapās, savukārt, Apšuciema augiem tas variēja. Piemēram, visos trijos mērījumu veikšanas gados jūlijā Apšuciemā hlorofila saturs augstāks bija tieši veģetatīvajiem augiem. Pētījumā par hlorofila daudzumu lapās dažādās rožu sugās un šķirnēs to ontogēnēzē, konstatēts, ka dažādām sugām, kā arī šķirnēm hlorofila daudzums atšķiras, tomēr vairumā gadījumu hlorofila daudzums ziedēšanas laikā samazinās un augļu nogatavošanās fāzē mazliet paaugstinās (Adumitresei *et al.* 2011). Arī citi autori (Ding *et al.* 2005) pētījumā ar dažādiem kukurūzas hibrīdiem konstatējuši, ka pēc ziedēšanas hlorofila daudzums un F_v/F_m vairumā gadījumu samazinās, to saistot pārsvarā ar lapu novecošanos. Mūsu pētījumā ziedēšanas fāzei atbilst jūlija mērījumi, savukārt, sēklu nogatavošanās fāzei – augusta mērījumi. Pie tam, bija vērojams, ka Popē augi zied nedaudz ilgāk un augustā daļa augu vēl ziedēja. Arī pa gadiem konkrētajos laikos ziedošo vai noziedējušo augu skaits atšķīrās. Kopumā hlorofila daudzums

nedaudz palielinājās starp ziedēšanas un augļu nogatavošanās fāzi, tomēr 2011. gadā Apšuciemā tas samazinājās. Veģetatīvo augu lapās hlorofila saturs sāka samazināties jau jūlijā (izņemot 2011. gadā Apšuciemā) (12. attēls). Lapām novecojot, hlorofila saturs tajās samazinās, jo metabolīti atplūst uz atraģējošajiem centriem, bet hlorofila sintēzes intensitāte krītas. Līdz ar to, mūsu mērījumu rezultāti parāda, ka hlorofila daudzums lielā mērā atkarīgs gan no vides faktoriem, gan ontogēneses periodiem.

Hlorofila fluorescences mērīšana ir ātra, nedestruktīva, kvantitatīva un diagnosticējoša un to veiksmīgi var izmantot arī reto un izzūdošo augu ekofizioloģiskajos pētījumos (Mohammed *et al.* 2003). Trīs vasaras veicot mērījumus abās populācijās Latvijā, konstatēts, ka Popē visi ar fotosistēmas II aktivitāti saistītie fotosintēzes rādītāji zemāki nekā Apšuciemā.

Rādītājs F_v/F_m Popē bija zem 0.8, kas norāda uz fotosintēzes fotoinhibēšanu, savukārt, Apšuciemā tas bija nedaudz virs 0.8 (izņemot 2011. gada augustu ģeneratīvajiem augiem). Iespējams, tas saistīts ar lielāku nokrišņu daudzumu Popē. Analizējot nokrišņu daudzumu, konstatēts, ka kopumā nokrišņu daudzums abās Latvijas populācijās viszemākais bija jūlijā. Augustā, septembrī tam bija tendence pieaugt. 2010. gadā ļoti zems nokrišņu daudzums augustā bija Popē. Iespējams, ka nokrišņu daudzumam pieaugot, samazinās ar fotosistēmas II aktivitāti saistītie rādītāji. Arī krasais F_v/F_m samazinājums Popē 2011. gada augustā varētu būt saistīts ar palielinātu nokrišņu daudzumu. Literatūrā atrodami dati par appludināšanas ietekmi uz rīsu stādiem, tiem F_v/F_m samazinājumu novēroja jau pēc divām dienām (Panda *et al.* 2006). Konstatējām, ka vērojama vidēja negatīva korelācija starp nokrišņiem un F_v/F_m (35. attēls).



35. attēls. Sakarība starp F_v/F_m *Saussurea esthonica* augiem Latvijas atradnēs trīs veģetācijas sezonu laikā un summāro nokrišņu līmeni iepriekšējā mēnesī. Parādīti tikai ģeneratīvo augu rezultāti.

Augu vitalitātes rādītājs PI Apšuciema augiem visus trīs gadus bija augstāks (virs 1.0) nekā Popes augiem (0.4 līdz 1.5). Arī abu Igaunijas populāciju PI bija augstāki nekā Popes. Tas norāda, ka Popē augu vitalitāte bija pazemināta. Arī rādītāji F_v/F_0 un RC/ABS augiem Popē bija zemāki nekā Apšuciemā augošajiem, pie kam, atšķirības starp Popes veģetatīvo un ģeneratīvo augu rezultātiem bija mazākas nekā Apšuciemā.

Novēroja, ka ar PS II fotosintētisko aktivitāti saistītie rādītāji kopumā augstāki bija veģetatīvajos, nevis ģeneratīvajos augos (13. līdz 17. attēls) (izņemot 2010. gada augustu Apšuciemā), tomēr šīs atšķirības nebija izteiktas. Krasākas atšķirības dažādos gados starp ar PSII saistītajiem rādītājiem parādījās augusta mērījumos. Tas varētu būt saistīts ar augu attīstību ontogēnēzē, jo augusta sākumā, kad veica mērījumus, daļa augu ziedēja, daļai jau bija gatavas sēklas. Zināms, ka F_v/F_m sāk samazināties kukurūzas augiem 4 nedēļas pēc ziedu atvēršanās (Ding *et al.* 2005). Līdz ar to mūsu novērotās atšķirības augusta mērījumos pa gadiem varētu būt saistītas ar izmaiņām augu ontogēnēzē.

Tā kā hlorofila saturs abu atradņu augiem bija samērā līdzīgs, tad, acīmredzot, fotoinhibēšana saistīta PS II aktivitātes samazināšanos, nesamazinot pigmentu saturu. Visu ar fotosistēmas II aktivitāti saistīto rādītāju pazeminātā aktivitāte Popē ir iespējami saistīta ar mērījumu veikšanas laiku, nokrišņu līmeni, kā arī ir kompleksa mitruma un augsnes minerālā sastāva ietekmes izpausme. Tādēļ turpmākajos eksperimentos pētījām šo divu parametru ietekmi.

4.3. Minerālelementu sastāva ietekme kontrolētos apstākļos

Hlorofila fluorescences rādītāju izmantošana augu fizioloģiskā stāvokļa noteikšanai plaši lietota kultūraugiem, minerālelementu, piem., slāpekļa ietekmes noteikšanai (Zhou *et al.* 2006 ; Maļceva *et al.* 2009).

Pētījumos centāmies noskaidrot substrāta ietekmi uz ar PS II aktivitāti saistītajiem rādītājiem. Eksperimentos kontrolētos apstākļos ar dažādiem substrātiem, konstatējām, ka Popes substrāts (3. variants) un Popes + (4. variants) kopumā ir labāks nekā Apšuciema (2. variants), kurā bija paaugstināts mangāna un dzelzs saturs. Hlorofila saturs palielinājās Popes + varianta augiem, samazinājās kontroles un Popes varianta augiem, savukārt, Apšuciema varianta augiem visu eksperimenta laiku tas saglabājās nemainīgs (19. attēls). Tas varētu būt saistīts ar palielināto mangāna un dzelzs saturu Apšuciema varianta substrātā. Kā zināms, līdz 80% šūnās esošās dzelzs atrodas tieši hloroplastos (Hänsch, Mendel 2009) un piedalās hlorofila sintēzes sākuma posmos. Mangāns piedalās ūdens sašķelšanā fotosistēmā II. Šo elementu pārmērīgās koncentrācijas, iespējams, neitralizē substrātā esošais kalcijs.

Fluorescences rādītāji F_v/F_m un F_v/F_0 nedaudz palielinājās kontroles, Popes un Popes + varianta augiem, savukārt, Apšuciema varianta augiem tie palika nemainīgi (19. attēls). Tā kā F_v/F_m bija mazāks par 0.8, tad, acīmredzot, Apšuciema varianta augiem bija fotosintēzes fotoinhibēšana. Jau eksperimenta sākumā F_v/F_m Popes + varianta augiem bija lielāks. Ja F_v/F_m izmaiņas ir salīdzinoši

nelielas, tad PS II aktivitāti labāk novērtēt pēc parametra F_v/F_0 (Baker, Rosenqvist 2004). Mums šie abi rādītāji deva diezgan līdzīgu rezultātu un F_v/F_0 izmaiņas nebija lielākas kā F_v/F_m gadījumā. Uzskata, ka slāpekļa piegāde izmaina fotosistēmas II aktivitāti un tas parādās kā F_v/F_0 izmaiņas (Maļceva *et al.* 2009). Savukārt, mūsu izvēlētajos variantos kontroles, Apšuciema, Popes + variantā bija lielāks slāpekļa daudzums savukārt, Popes variantā – uz pusi samazināts, taču F_v/F_m un F_v/F_0 Popes variantā bija nedaudz mazāks nekā Popes + varianta augiem, līdz ar to nevar apgalvot, ka slāpekļa saturs bija tas, kas pamatā ietekmēja šos rādītājus. Arī sēra saturs kontroles un Popes + varianta augiem bija vienāds, tomēr kontroles varianta augiem ar PS II aktivitāti saistītie rādītāji bija zemāki.

Pēc literatūras datiem, RC/ABS parāda fotosistēmas II reakciju centru hlorofila un antenu hlorofila attiecību, un šī parametra izmaiņas liecina par izmaiņām fotosintētiskajā aparātā (Pinior *et al.* 2005). Labvēlīgos augšanas apstākļos fotosistēmās ir liela reakciju centru aktivitāte. Reakcijas centrus veido fotoķīmiski aktīvās molekulas, bet antenu pigmentu molekulas saista gaismas kvantus. RC/ABS samazinājums liecina par to, ka palielinās antenu hlorofila saturs katrā reakcijas centrā (Thach *et al.* 2007). Līdz ar to, kontroles un Apšuciema varianta augiem vērojama fotosintēzes fotoinhibēšana reakcijas centru pārslodzes dēļ.

PI raksturo augu vitalitātes stāvokli, apvienojot vairākus fizioloģiskos rādītājus, kas veicina fotosintēzes norisi. Uzskata, ka PI ir rādītājs, kas visjutīgāk reaģē uz vides izmaiņām (Thach *et al.* 2007). PI palielinājās Popes un Popes + varianta augiem, pavisam nedaudz kontroles varianta augiem, bet Apšuciema varianta augiem PI eksperimenta laikā nemainījās. Kontroles varianta augiem PI palielinājās acīmredzot tādēļ, ka palielinājās nulles līmeņa fluorescence.

Tā kā Popes un Popes + varianta augiem eksperimenta gaitā PI un RC/ABS uzlabojās, tad var secināt, ka šie rādītāji tikai daļēji ir atkarīgi no slāpekļa un sēra satura augsnē, jo Pope + variantā slāpekļis un sērs bija kontroles varianta līmenī, bet minerālelementu ietekme visdrīzāk ir kompleksa. Pirmajā variantā, iespējams, palielinātais fosfora, kālija un magnija saturs samazināja slāpekļa un sēra ietekmi, jo, kā zināms, dažādi minerālelementi darbojas kā sinerģisti vai antagonisti, un varēja radīt pavisam nelielu PI uzlabojumu.

Kopumā ar fotosistēmas II fotoķīmiju saistītie rādītāji ļauj secināt, ka Igaunijas rūgtlapei piemērotāks ir Popes + varianta vai Popes varianta substrāts. Neatbilstība starp iegūtajiem rezultātiem dabiskajās populācijās un kontrolētos apstākļos liek domāt, ka tā varētu būt saistīta ar citu augsnē esošo elementu, piemēram, cinka, ietekmi uz fotosintēzi raksturojošajiem parametriem, kas var aizvietot mangāna atomu mangāna klasterī (Bertrand, Poirier 2005), līdz ar to, inhibējot PS II aktivitāti. Šī neatbilstība varētu būt saistīta arī ar laistīšanas režīmu un temperatūru, jo kontrolētajā eksperimentā augi tika mēreni laistīti un temperatūras bija stabilas. Līdz ar to radās jautājums par mitruma ietekmi uz augu 'labsajūtu' un fotosintēzes fotoķīmijas efektivitāti.

4.4. Mitruma ietekme kontrolētos apstākļos

Hlorofila fluorescences rādītājus parasti izmanto augu reakcijas uz sausumu noteikšanai (Sayed 2003; Sakalauskiene *et al.* 2008), datu par hlorofila fluorescences rādītāju izmantošanu palielināta mitruma ietekmes uz fotosintēzes procesiem izpētē ir maz.

Eksperimentā ar dažādiem mitruma režīmiem, pārbaudot, kā augi reaģē pārmitros un ļoti sausus apstākļos, konstatēja, ka suga labi adaptējusies dažādiem apstākļiem. Lapu skaits un vizuāli novērtētā vitalitāte eksperimenta gaitā palielinājās palielinoties mitruma daudzumam augsnē. Sausos apstākļos augi auga lēnāk, tomēr bija dzīvi. Savukārt, applūdušajā augsnē augi auga visspēcīgāk, tomēr lapām novēroja elementu nepietiekamību. Applūdušajā augsnē (200%) augošo augu vecākajām lapām pēc divu nedēļu audzēšanas novēroja gan hlorozi, gan violetu plankumu veidošanos starp dzīslām, kas varētu liecināt par fosfora, kā arī citu elementu nepietiekamību vai pārbagātību. LU BI speciālisti analizēja augsnes sastāvu pēc eksperimenta un konstatēja, ka salīdzinot "optimālo" un applūdušo augsni (t.i., palielinot augsnes mitrumu), vairāk nekā par 50% samazinās slāpekļa, kālija, sēra, mangāna, cinka, nātrija, hlora saturs, par 30-40% fosfora, magnija, bora saturs, 10-15% robežās mainījās kalcijs un dzelzs saturs, savukārt vara saturs pieauga par 500%, molibdēna saturs augsnē nemainījās. Interesanti bija tas, ka tiem elementiem, kas samazinājās vairāk nekā par 50%, šī atšķirība parādījās tieši applūdušajā augsnē (17. tabula).

Savukārt sausā varianta (90% mitruma) augsnē visu makroelementu, mangāna un dzelzs daudzums bija lielāks nekā pārējo variantu augsnēs. Analizējot minerālelementu saturu lapās konstatēja, ka applūdušajā augsnē augu lapās ir samazināts slāpekļa, kālija, dzelzs saturs un palielināts kalcijs, magnijs, sērs, cinka saturs salīdzinot ar kontroli (100%). Sausā varianta augu lapās, salīdzinājumā ar kontroli (100%), bija palielināts kalcijs, nātrijs, mangāns, cinks, dzelzs

17. tabula. Minerālelementu saturs (mg L^{-1}) *Saussurea esthonica* audzēšanas substrātos 1M HCl izvilkumā pēc mitruma eksperimenta un to salīdzinājums ar inerto substrātu (Dr. biol. A. Karlsona nepublicēti dati, LU Bioloģijas institūts). *, pēc Osvalde (2011)

Elements	90%	100%	150%	200%	Inertais*
N	113	75	67	27	120
P	87	65	52	53	60
K	165	22	15.5	10.5	150
Ca	6750	6600	6900	6100	200
Mg	400	375	535	270	60
S	538	475	425	105	50
Fe	665	620	535	575	5
Mn	90	70	65	32.5	2
Zn	15	16	15	8.5	1
Cu	0.9	1.1	2.35	4.75	0.3
Mo	0.11	0.11	0.06	0.09	0.02
B	2.4	2.7	2.4	1.8	0.2
Na	110	100	95	27	
Cl	87	26	13	<5	
pH _{KCl}	7.15	7.05	6.99	7.24	

saturs. Ja salīdzina ar optimālajām devām kultūraugiem, tad visos variantos bija zems fosfora saturs un augsts kālija, kalcija, mangāna, molibdēna un bora saturs lapās. Uzskata, ka mitruma ietekmē mangāna un dzelzs nešķīstošās formas reducējas šķīstošās formās un līdz ar to labāk uzsūcas audos, kur to palielinātais saturs kaitīgi ietekmē enzimatiskās struktūras, palielinās arī cinka pieejamība un līdz ar to tā uzkrāšanās lapās (Pezeshki 2001). Mēs konstatējām, ka dzelzs saturs augsnē mitruma ietekmē samazinās par 10-15% un arī lapās samazinās, savukārt cinka uzkrāšanās lapās palielinās. Mangāna koncentrācija bija augsta visu variantu augu lapās. Tā kā šis elements ir mitohondriālās superoksiddismutāzes aktīvā centra sastāvā, tad iespējams, ka tas neitralizē pārmērīga mitruma iniciētos brīvos radikālus. Palielinājās arī sēra saturs applūdušajā augsnē augošo augu lapās. Sērs sulfīdu formā daudzām mitro vietu sugām samazina fotosintēzes efektivitāti iedarbojoties uz gaismas reakcijām (Pezeshki 2001). Tomēr daudzos gadījumos mitro vietu augi spēj rizosfērā oksidēt sulfīdus, tādējādi samazinot vai izslēdzot bojājumus (Pezeshki 2001).

Dažiem mitru vietu augiem novēro hlorofila satura samazināšanos plūdu ietekmē (Pezeshki 2001; Clua *et al.* 2009). Arī pētījumos par appludināšanas ietekmi uz hlorofila saturu rīsu lapās, konstatēts, ka pēc 4 dienu appludināšanas hlorofila saturs lapās samazinājās un šī samazināšanās bija saistīta ar augu dzīvotspēju (Panda *et al.* 2006). Arī ūdens deficīta apstākļos vērojams hlorofila satura samazinājums lapās (Schlemmer *et al.* 2005; Sakalauskiene *et al.* 2008). Mēs novērojām hlorofila satura samazinājumu sausā varianta (90%) un applūdušajā augsnē (200%) augošajiem augiem, savukārt "optimāli" (100%) un palielinātā mitrumā (150%) augošajiem augiem, hlorofila saturs eksperimenta gaitā mazliet pat palielinājās.

F_v/F_m un F_v/F_0 gandrīz nemaz neatšķīrās starp variantiem (21. attēls). Acīmredzot, palielināts mitrums šiem augiem nav stresa faktors un tie labi adaptējušies mainīgam ūdens režīmam. Ir pētījumi, ka jau divas dienas pēc augu appludināšanas F_v/F_m samazinās, kas liecina par PS II spējas reducēt primāro akceptoru plastohinonu samazināšanos (Panda *et al.* 2006). Acīmredzot, kultivējot *S. esthonica* augus pārmitros apstākļos, bet neappludinot, fotosintēzes fotoinhibēšana neiestājas. Novērots, ka pret applūšanu tolerantām rīsu šķirnēm fotoinhibēšanu nenovēro (F_v/F_m nemainās), tomēr PI izmaiņas ilgākā laika periodā parādās (Sarkar *et al.* 2004). Arī pētot sausuma ietekmi uz ābeļu lapām konstatēts, ka sausuma ietekme uz maksimālo kvantu izmantošanas efektivitāti, ja PSII reakcijas centri ir atvērti, ir nenozīmīga un fotoinhibēšanu nenovēro (Massacci, Jones 1990). Arī citi autori konstatējuši, ka F_v/F_m samazināšanās sausuma ietekmē ir nenozīmīga un PS II netiek bojāta (Naumann *et al.* 2007).

Hlorofila fluorescences mērījumus izmantojot ķērpja *Lobaria pulmonaria* reakcijas uz pārmērīgu apgaismojumu izpētē konstatēts, ka F_v/F_m izmainās apgaismojuma izsaukta bojājuma laikā, tomēr šis rādītājs nedarbojas ilgstoša bojājuma apstākļos (Mohammed *et al.* 2003). Sausuma ietekmē vērojama arī PI samazināšanās, taču, ja pie tam ļoti maz mainās F_v/F_m , tad atjaunojot laistīšanu, PI uzlabojas, un neatgriežamu bojājumu PS II sausums nav radījis. Uzskata, ka reakcija uz sausumu

ir atgriezeniska, kamēr nemainās F_v/F_m (Oukarroum *et al.* 2007). Mēs konstatējam, ka sausuma un pārmērīga mitruma apstākļos izmainās ar PS II efektivitāti saistītie rādītāji PI un RC/ABS. Tātad pārmērīga sausuma un mitruma ietekmē mainās nevis fotoķīmijas primārais iznākums (F_v/F_m), bet gan aktīvo/neaktīvo reakcijas centru attiecība pret antenu hlorofilu (RC/ABS), reakcijas centru blīvums, nulles līmeņa fluorescence (F_0).

Parasti mitruma ietekmē samazinās sakņu masa, bet šajā pētījumā to nevarēja novērot. Applūdušajā augsnē augiem saknes bija visvitālākās un spēcīgākās. Arī daudzgadīgais augs *Lepidium latifolium* ir applūšanas toleranta suga ar lielu daudzgadīgu rizomu un labi piemērojies dažādiem vides faktoriem – gan applūšanai, gan salīdzinoši sausiem apstākļiem (Chen *et al.* 2002). Uzska, ka savvaļas augi, kā arī mitru vietu augi labi adaptējušies apstākļiem, kuros aug, un stresa jēdziens vairāk attiecas uz kultūraugiem, nevis dabiskajos biotopos augošiem augiem (Otte 2001). Zināms arī, ka mitrās vietās augošās kalcifilās vaskulāro augu sugas ir tolerantas pret ūdens līmeņa maiņu 25 cm robežās (Ilomets *et al.* 2010). Līdz ar to, lai arī vizuāli *S. esthonica* augi pa variantiem atšķirās, tomēr no fotosintētiskās aktivitātes viedokļa izmaiņas nebija būtiskas. Acīmredzot *S. esthonica* dabiskajās augtēnēs ir labi adaptējušies mainīgam mitruma režīmam.

4.5. Vairošanās potenciāls

Vairošanās ir viens no auga dzīves cikla svarīgākajiem komponentiem. Liela daļa savvaļas sugu vairojas gan ģeneratīvi, gan veģetatīvi. Ja ģeneratīvā vairošanās tiek kavēta, augs pastiprināti sāk vairoties veģetatīvi. Tai pat laikā ģeneratīvā vairošanās ir tā, kas nodrošina ģenētisko daudzveidību populācijā un līdz ar to suga var labāk pielāgoties apkārtējās vides izmaiņām.

Sēklu dīgspēja ir lielā mērā atkarīga no sēklu izmēra. Konstatējam, ka *S. esthonica* sēklu garumi variē no 2-5 mm un lielākām sēklām ir labāka dīgspēja. Izvēloties 4 un 5 mm lielas sēklas ir lielāka varbūtība, ka sēklas dīgs. Literatūrā ir dati par dīgspējas atkarību no sēklu masas. Tomēr bieži dati ir pretrunīgi. Konstatēts, ka pastāv negatīva korelācija starp sēklu masu un dīgspēju (Bu *et al.* 2007). Pretējs uzskats ir, ka lielākās sēklas sāk dīgt ātrāk un tām ir labāka dīgspēja, kā piemēram, *Sarracenia purpurea* (Ellison 2001). Tas gan lielā mērā bija atkarīgs arī no aukstās stratifikācijas ilguma pirms dīgspējas testa (3, 4 vai 5 nedēļas). Uzska, ka sēklu izmērs ietekmē dīgspēju, tomēr tas neietekmē turpmāko dīgstu augšanu (Mölken *et al.* 2005). *Saussurea* sēklas dīgst gan sterilos, gan nesterilos apstākļos, tomēr literatūrā ir dati, ka ir retas un endēmas sugas, kas dīgst tikai sterilos apstākļos (Cerabolini *et al.* 2004). Asteru dzimtas augiem mazs sēklu daudzums var būt nevis inbrīdīga, bet gan vairošanās sistēmas īpatnību dēļ (Luijten *et al.* 2002). Pie tam, daudzgadīgajiem augiem pat mazās populācijās izžušanu var aizkavēt gan garais dzīves cikls, gan klonālā augšana (Jacquemyn *et al.* 2002). Tādēļ grūti paredzēt sugas atradņu nākotni, tomēr daļēji to nosaka mazs sēklu daudzums vai zema dīgspēja.

Savvaļas augu sēklām bieži raksturīgs miera periods un tā pārtraukšanai lieto dažādas metodes un

dažādām augu sugām tās var atšķirties. Piemēram, dažas *Lonicera* ģints sugas dīgst pēc aukstās, dažas pēc aukstās-karstās, dažas pēc karstās stratifikācijas, arī GA_3 uzlabo dīgtspēju (Hidayati *et al.* 2000). Konstatēts, ka *Primula modesta* dīgtspēja bez mitrās aukstumapstrādes ir 20 līdz 60%, bet 1 mēnesi turot 4 °C tumsā dīgtspēja palielinājās līdz 90-100% (Shimono *et al.* 2004).

Arī mūsu rezultāti parāda, ka aukstā stratifikācija pozitīvi ietekmē dīgtspēju. Labākie rezultāti iegūti sēklas apstrādājot ar GA_3 . Arī KNO_3 pozitīvi ietekmēja dīgtspēju. Līdzīgu rezultātu ieguva arī Sharma *et al.* (2006) ar *S. costus* sēklām. *S. costus* ir vidēja dīgtspēja (līdz 68%) un labāko rezultātu ieguva pirms dīgšanas vienu mēnesi sēklas pakļaujot aukstajai stratifikācijai. GA_3 (10^{-3} M) bija efektīvāks par GA_3 (10^{-4} M) un tas, savukārt – par KNO_3 un H_2O (Sharma *et al.* 2006). Sēklu dīgtspēju var ietekmēt arī apgaismojums. Ir sugas, kas labāk dīgst gaismā, un ir sugas, kas labāk dīgst tumsā (Schwienbacher *et al.* 2011). Sēklas diedzējot tumsā parādījās aukstumapstrādes pozitīvais efekts, savukārt diedzējot gaismā/tumsā šis efekts nebija izteikts. Arī *Kalidium caspicum* sēklām novērots, ka aukstumapstrāde izmaina prasību pēc gaismas sēklām dīgstot (Qu *et al.* 2008). Līdz ar to, stratifikācijas pozitīvais efekts nav izteikts.

Dzīvo nesadīgušo sēklu skarifikācija arī pozitīvi ietekmēja dīgtspēju. Zināms, ka skarifikācija veicina necaurīdīga sēklapvalka izraisīto dīgšanas inhibēšanas un/vai augšanas inhibitoru izraisītā miera perioda apiešanu (Torresán *et al.* 1996).

Salīdzinot iegūtos rezultātus ar literatūrā minētajiem miera perioda tipiem konstatēts, ka *S. esthonica* varētu būt sekla fizioloģiskais miera periods, taču tā kā pieejamo sēklu skaits bija ierobežots un daudz bija tukšu sēklu, tad pilnīgi droši to nevar apgalvot. Pie kam zināms, ka pat vienas sugas robežās var novērot dažādus miera perioda veidus, līdz ar to ne vienmēr ir iespējams konkrēti noteikt gan miera perioda tipu, gan tā pārtraukšanas apstākļus.

Veģetatīvā vairošanās savvaļas augiem ir bieži sastopama. Uzskata, ka to biežāk novēro vēsos, mitros, noēnotos apstākļos un nabadzīgā augsnē augošiem augiem un tai var būt filoģenētiski, dzīves cikla noteikti iemesli vai vienkārši tā ir augu adaptācijas konkrētiem apstākļiem sekas (Sosnová *et al.* 2010). Veģetatīvās vairošanās veidus iedala atkarībā no saistības ar mātesaugu – atdalās vai nē un pēc izplatības attāluma – tuvu pie mātesauga vai nē (Klimeshová *et al.* 2011). Ap 21% no klonālo augu sugām ir vairāk kā viens klonālās augšanas veids (Klimesh, Klimeshová 1999). Centrāleiropas klonālo augu datubāzē (Klimeshová, Klimesh 2006) ir dati par trim *S. alpina* paraugiem – no Norvēģijas, Vācijas un Zviedrijas (18. tabula).

Mūsu novērojumi rāda, ka *S. esthonica* vairojas veģetatīvi vai nu ar rizomu, vai arī hipokotilā veidojas adventīvie pumpuri, kas tālāk veido lapu rozetes. Iespējams, ka dabā grūti novērot adventīvos pumpurus, kas veidojas tuvu pie mātesauga. Mēs tos novērojām augam, kas vēlāk uzziedēja. Tipiskāks veģetatīvās vairošanās veids *S. esthonica* augiem ir ar sakneņiem. Pēc mūsu datiem dzinumumu skaits no mātesauga ir >1. Atšķirībā no *Saussurea alpina*, *S. esthonica* aug mitrās vietās, līdz ar to veģetatīvā vairošanās varētu būt labāk izteikta, nekā kalnos augošajām sugām, kā arī

18. tabula. *Saussurea alpina* veģetatīvā vairošanās un izplatība pēc Centrāleiropas klonālo augu datubāzes datiem (Klimešová, Klimeš 2006)

Parauga izcelsme	Klonālās augšanas orgāns	Sakneņa zarošanās	Laterālā izplatība (m gadā ⁻¹)	Dzinumu skaits no mātesauga gadā
Norvēģija	epiģeogēns zars (rizoma)	simpodziāla	< 0.01	< 1
Vācija	epiģeogēns zars (rizoma)	simpodziāla	0.01 – 0.25	1
Zviedrija	hipoģeogēns zars (rizoma)	simpodziāla	0.01 – 0.25	< 1
	epiģeogēns zars (rizoma)		< 0.01	< 1

mēs augus pētījām daļēji kontrolētos apstākļos, kur augsne nebija piemēlota dabiskajai, bet gan optimāla kultūraugiem, un augam bija lielākas iespējas parādīt savu augšanas potenciālu.

4.6. Molekulāri ģenētiskā izpēte

Ģenētiskās daudzveidības izpētē arvien plašāk tiek lietoti molekulārie marķieri. Vairumā gadījumu sugas specifiski marķieri izstrādāti kultūraugiem un tie arī pārsvarā tiek pētīti. Savvaļas augiem pārsvarā lieto sugas nespecifiskos marķierus, piemēram, AFLP, kas ir universāli un neprasa konkrētu sekvenču datus. Arvien plašāk pētījumos lieto retrotranspozonu marķierus. Viena no metodēm, kas uzrāda polimorfismus bez iepriekš zināmiem sekvenču datiem un līdz ar to izmantojama tām sugām, kam nav izstrādātu marķieru, ir iPBS metode (Kalendar *et al.* 2010). Tā kā *S. esthonica* nav sugas specifisku marķieru, bija svarīgi, lai lietotie marķieri uzrādītu atšķirības. Tāpēc salīdzinot populācijas lietotas divas metodes. Pētot populācijas Latvijā ar AFLP metodi lielāka heterozigotāte parādījās populāciju iekšienē, iPBS marķieri uzrādīja lielāku polimorfismu starp populācijām. Kopumā abas šīs metodes ir lietojamas daudzveidības noteikšanai un iegūtie rezultāti ir līdzīgi. Abas populācijas ir atšķiramas. Ir tādi indivīdi, kas raksturīgi tikai konkrētajai populācijai un ir tādi, kas sastopami abās populācijās. Tā kā iPBS marķieri uzrādīja lielāku dažādību starppopulāciju līmenī, tad Latvijas populāciju salīdzināšanai ar Igaunijas populācijām izmantojām tos. Izmantojām iezīmētos un neiezīmētos iPBS marķierus. Iezīmētie marķieri ir jutīgāki, tāpēc ar šo metodi atrada lielāku fragmentu skaitu, tomēr abas metodes uzrādīja līdzīgu rezultātu. Arī šie rezultāti parādīja, ka populācijas, lai arī ir līdzīgas, ir atšķiramas. Lielāka atšķirība bija vērojama starp reģioniem (10 līdz 13%), t.i., Latviju un Igauniju, nevis starp populācijām (3 līdz 5%). Lielākais uzrādīto fragmentu skaits bija Apšuciema populācijā, mazākais – Kalevi. Unikālo fragmentu skaits un sagaidāmā heterozigotāte lielāka bija Latvijas populācijās.

Tā kā daudzveidība ir cieši saistīta ar populācijas izmēriem un augu reprodukciju, 2009. gadā uzskaitīja ziedošos augus, lai noteiktu populācijas izmēru. Izrādījās, ka vismazākā ir Pärnu-Jaagupi populācija, tai seko Kalevi, Pope, un Apšuciema populācija ir lielākā. Līdz ar to var teikt, ka populācijas Latvijā ir gana stabilas un ģenētiskās daudzveidības zudums tās neapdraud. Tajā pat laikā *S. esthonica* vairāk izplatīta Igaunijā (ap 60 populāciju) (Narits *et al.* 2000). Tas, iespējams, ir skaidrojums, kādēļ ģenētiskās distancēs Igaunijas populācijās ir mazākas, nekā Latvijas populācijās.

Latvijas populācijas atrodas viena no otras ~95 km attālumā, līdz ar to maz ticama ir gēnu plūsma starp populācijām, savukārt populācijas Igaunijā izvietotas salīdzinoši tuvāk. Pamatojoties uz populāciju ģenētikas teoriju, ir sagaidāma korelācija starp populācijas izmēru un heterozigotāti (Reed, Frankham 2003).

Lai iegūtu priekšstatu par *S. esthonica* radniecību ar citām *Saussurea* sugām, tā salīdzināta izmantojot ITS un iPBS marķierus. Kopumā bija 25 sēkļu paraugi no 11 *Saussurea* sugām, iegūt dīgstus izdevās no 9 sugu 11 paraugiem, t.i., trīs sugas nevarēja izanalizēt (*S. neopulchella*, *S. nipponica* un *S. parviflora*, kā arī vienu pasugu (*S. alpina* subsp. *depressa*).

Izmantotās marķieru metodes darbojas atšķirīgos genoma rajonos. ITS reģions ir konservatīvs un tiek plaši izmantots filoģenēzes pētījumos, savukārt iPBS tehnika balstās uz variablajiem (mainīgajiem) un nestabilajiem genoma komponentiem – retrotranspozoniem. Atšķirības starp abām metodēm parādās rezultātos: daudzveidība sugu iekšienē 84% ar iPBS un 26% ar ITS sekvenēšanu. Neatkarīgi no šīm atšķirībām, filoģenētiskā radniecība ar abām marķieru metodēm atklāj līdzīgus rezultātus: *S. esthonica* veido klasteri ar *S. alpina* un *S. discolor*, savukārt, *S. pygmaea* ir ļoti atšķirīga no pārējām analizētajām Eiropas sugām. Kopumā iegūtie filoģenēzes rezultāti saskan ar Lipschitz (1979) doto klasifikāciju (19. tabula).

Visas analizētās sugas pieder apakšģintij *Saussurea*, izņemot *S. pulchella*, kas ir *Theodorea* apakšģintī. *S. alpina*, *S. discolor*, *S. esthonica* un *S. riederi* ir sekcijā *Saussurea*, un veido vienu klasteri, kas labi redzams ITS sekvenču filoģenēzē. *S. maximowiczii*, kas ir atsevišķā sekcijā (*Laguranthera*), veido atsevišķu klasteri. *S. pygmaea* arī atrodas atsevišķā sekcijā (*Pycnocephala*). *S. albescens* un *S. candicans* pieder sekcijai *Elatae*, un veido vienu klasteri. Izņēmums bija *S. pulchella*, kas pieder atsevišķai apakšģintij, taču filoģenētiskajā kokā veidoja klasteri ar *S. albescens* un *S. candicans*.

Saussurea ģints filoģenēze nav pilnībā izpētīta (Raab-Straube 2003; Wang, Liu 2004) un ir daudz neskaidrību. Iepriekš *S. esthonica* taksonomiskais statuss ir analizēts, balstoties uz morfoloģisko īpašību izpēti (Narits et al. 2000), secinot, ka *S. esthonica* varētu būt *S. alpina* ekoģeogrāfiska pasuga. *S. esthonica*, *S. alpina* un *S. discolor* filoģenētiskā analīze, izmantojot ITS sekvenču datus, neparādīja skaidru sugu radniecību, Norvēģijas un Itālijas *S. alpina* populācijas veidoja klasteri ar *S. esthonica*,

19. tabula. Analizējamo *Saussurea* ģints sugu klasifikācija pēc Lipschitz (1979)

Suga	Klasifikācija
<i>S. esthonica</i>	Subg. <i>Saussurea</i> , sect. <i>Saussurea</i>
<i>S. alpina</i>	Subg. <i>Saussurea</i> , sect. <i>Saussurea</i>
<i>S. riederi</i>	Subg. <i>Saussurea</i> , sect. <i>Saussurea</i>
<i>S. discolor</i>	Subg. <i>Saussurea</i> , sect. <i>Saussurea</i> , subsect. <i>Cordifoliae</i>
<i>S. albescens</i>	Subg. <i>Saussurea</i> , sect. <i>Elatae</i>
<i>S. candicans</i>	Subg. <i>Saussurea</i> , sect. <i>Elatae</i>
<i>S. maximowiczii</i>	Subg. <i>Saussurea</i> , sect. <i>Laguranthera</i>
<i>S. pygmaea</i>	Subg. <i>Saussurea</i> , sect. <i>Pycnocephala</i>
<i>S. pulchella</i>	Subg. <i>Theodorea</i> , sect. <i>Theodorea</i>

bet Austrijas *S. alpina* populācija bija tuvāka Austrijas *S. discolor* populācijai. Jau 19. gadsimta beigās Franšē (*Francheau*), pētot *Saussurea* ģints sugas Japānā, izvirzīja hipotēzi, ka ģints izcelsmes centros sugas ir morfoloģiski atšķirīgākas, savukārt areāla malās sugas ir grūti atšķiramas (Lipschitz 1979). Līdzīgu secinājumu izdarījis arī *Martins* (2006) pētot *Klasea* ģinti, ka sugas, kas atrodas izcelsmes centrā, ir homogēnākas, morfoloģiski labāk atšķiramas un, iespējams, vairāk reproduktīvi izolētas, savukārt ģints izplatības areāla malās notiek hibridizācija un jaunu sugu veidošanās. Tā kā Rietumeiropa ir *Saussurea* ģints izplatības areāla rietumu mala, tas izskaidro alpu rūgtlapes daudzveidību un iespējamību, ka šī suga nav monofilētiska. Rezultāti parāda, ka Igaunijas rūgtlape ir tuva Norvēģijas un Itālijas alpu rūgtlapēm (kas, iespējams, ir *S. alpina* ssp. *alpina*), savukārt *S. alpina* no Austrijas, kas, analizējot ar ITS praimeriem, bija radniecīgāka *S. discolor*, varētu būt cita *S. alpina* pasuga. Lai precīzi varētu pateikt, vai Igaunijas rūgtlape ir alpu rūgtlapes pasuga, nepieciešams lielāks paraugu skaits un precīzāka informācija par *S. alpina* citzemju paraugiem.

Konstatēta radniecība starp *S. esthonica*, *S. alpina* un *S. discolor*, tomēr nepieciešami tālāki pētījumi ar lielāku paraugu (populāciju) skaitu, lai noskaidrotu *S. esthonica* taksonomisko statusu. Igaunu zinātnieki izpētei izmantoja *S. alpina* populācijas no Norvēģijas un Polijas. Viņi iesaka uzskatīt, ka *S. esthonica* ir *S. alpina* ekoģeogrāfiska pasuga (*Narits et al.* 2000). Mūsu rezultāti parāda ciešu saistību starp *S. esthonica* un *S. alpina* Norvēģijas un Itālijas populācijām, bet atšķirību no Austrijas populācijas. *Narits et al.* (2000) uzskata, ka *S. stubendorffii* Herd., kas aug Austrumsibīrijā un Jakutijā ir morfoloģiski ļoti līdzīga *S. esthonica*. Šī suga mums nebija pieejama, līdz ar to nevar pateikt, kā tā iekļautos kopējā sistēmā.

4.7. Sugas ilgtermiņa saglabāšana un citu aizsargājamo sugu stratēģijas izstrāde

S. esthonica izpētes gaitā iegūtie rezultāti parāda, ka sugu *ex situ* iespējams saglabāt *in vitro*, tomēr ir vairāki faktori, kas šajā saglabāšanas veidā jāņem vērā. Viens no būtiskākajiem ierobežojošajiem faktoriem ir tas, ka sēklām ir slikta dīgspēja, līdz ar to, *in vitro* kultūras izveide ir apgrūtināta. Otrkārt, *in vitro* kultūras varētu nebūt piemērotas sugas saglabāšanai, jo, lai nodrošinātu ģenētiskās daudzveidības saglabāšanu, jā saglabā lielāks skaits genotipu. Līdz ar to, *in vitro* kolekcija ir nozīmīga paralēli *in situ* saglabāšanai un to optimāli var izmantot ekspozīciju veidošanai vai augu pavairošanai zinātnisko pētījumu veikšanai, tomēr būtu jādomā par iespējām izvērtēt sēkļu kvalitāti un tās uzglabāt sēkļu bankā ģenētiskās daudzveidības nodrošināšanai.

Lai nodrošinātu aizsargājamo augu saglabāšanu *in situ*, jāveic ģenētiskās daudzveidības pētījumi populāciju iekšienē un starp populācijām, lai prognozētu populācijas izdzīvošanu ilgtermiņā un izprastu un, iespējams, censtos samazināt draudus, ko populācijai varētu nodarīt ģenētiskās daudzveidības samazināšanās. Pētījumu rezultātā konstatējām, ka *S. esthonica* populācijas ģenētiskās daudzveidības samazināšanās pašlaik neapdraud, tomēr periodiski būtu jāveic ģenētiskās daudzveidības monitorings, lai prognozētu populācijas dzīvotspēju ilgtermiņā. Tas sevišķi svarīgi

mazām un izolētām populācijām, jo tās visvairāk apdraud nejaušas vides vai ģenētiskās izmaiņas (Lande 1988; Luijten *et al.* 2000).

Arī vides faktoru ietekmi uz augu vitalitāti un dzīvotspēju ir jāņem vērā, līdz ar to ar fotosistēmas II efektivitāti saistītie rādītāji dod ieskatu augu vispārējā vitalitātē un nelabvēlīgos apstākļos vērojama fotosintēzes fotoinhibēšana, hlorofila satura samazinājums lapās, kā arī *Performance Index* samazinājums. *S. esthonica* kopumā labi piemērojusies mainīgiem vides faktoriem. Pārmērīgās minerālelementu koncentrācijas augsnē auga bioloģisko īpašību, kā arī minerālelementu sinerģisma vai antagonisma ietekmē (Osvalde 2011) tiek neitralizētas. Mitro vietu kalcifilās vaskulāro augu sugas ir tolerantas pret ūdens līmeņa maiņu 25 cm robežās (Ilomets *et al.* 2010). Suga labi adaptējusies dažādiem mitruma režīmiem un, acīmredzot, periodiskām ūdens līmeņa svārstībām, kā vairums kalcifilo augu sugu, kas aug mitrās vietās. Tomēr jārēķinās, ka pārmērīgs sausums vai mitrums samazina augu vitalitāti.

Ļoti nopietns drauds sugas pastāvēšanai ir zemā sēkļu kvalitāte, kas samazina *S. esthonica* iespējas vairoties ģeneratīvi. Daļēji to kompensē auga spēja vairoties veģetatīvi – no viena auga iegūstot ap sešiem veģetatīvajiem dzinumiem, tomēr nav īsti skaidrs, kādi apstākļi uzlabotu auga spēju veidot ģeneratīvos dzinumus, jo ziedu skaits ir mazs. Arī citu augu saglabāšanas stratēģijas izstrādē sugas vairošanās īpatnību un potenciāla noteikšana varētu būt nozīmīga.

Secinājumi

1. Izmantojot sēklas, audu kultūrā iespējams ieviest dažādu *Saussurea* sugu augus, ko var izmantot tālākos pētījumos. Atkarībā no sugas sēklas uzdīgst piecu līdz trīsdesmit piecu dienu laikā.
2. *In vitro* kultūrās dažādiem citokinīnu dabas savienojumiem ir atšķirīga ietekme: 6-benzilaminopurīns veicina dzinumumu proliferāciju, N6-(delta 2-izopentenil)-adenīns zemās koncentrācijās veicina sakņu veidošanos, kinetīna koncentrāciju palielinot nemainās proliferācija un sakņu skaits.
3. Novērotās atšķirības pētījumos dabiskos apstākļos starp Apšuciema un Popes augiem saistītas ar kompleksu ilgstošu un pastāvīgu vides apstākļu ietekmi.
4. Sabalansēts substrāta sastāvs bez pārmērīgiem dzelzs un mangāna daudzumiem labvēlīgi ietekmē *Saussurea esthonica* augu augšanu un vitalitāti kontrolētos apstākļos.
5. *Saussurea esthonica* adaptējusies mainīgam augsnes mitruma režīmam. Augam labvēlīgāka ir mēreni mitra līdz mitra augsne.
6. Nelabvēlīgu apstākļu salīdzinoši nelielā ietekmē samazinās *Performance Index* un RC/ABS, kas saistīti ar aktīvo/neaktīvo reakcijas centru attiecību pret antenu hlorofilu un reakcijas centru blīvumu, bet izmaiņas maksimālajā kvantu efektivitātē (F_v/F_m) un fotoķīmijas primārajā iznākumā (F_v/F_0) neparādās.
7. *Saussurea esthonica* raksturīga gan ģeneratīvā, gan veģetatīvā vairošanās. Viens indivīds vidēji veido sešus dzinumus.
8. *Saussurea esthonica* sēklām raksturīgs sekla fizioloģiskais miera periods. Sēklas dīgst trīs līdz divdesmit vienu dienu, ar maksimālo ātrumu piecas līdz septiņas dienas. Sēklu dīgtspēju ietekmē sēklu izmērs un diedzēšanas apstākļi.
9. No ģenētiskā viedokļa, *Saussurea esthonica* populācijas Latvijā ir pietiekoši stabilas, un ģenētiskās daudzveidības zudums tās neapdraud.
10. *Saussurea* ģints filoģenēzes pētījumos iespējams izmantot iPBS un ITS analīzes. *Saussurea discolor* un *Saussurea alpina* veido vienu klasteri ar *Saussurea esthonica*. *Saussurea pulchella*, *Saussurea albescens* un *Saussurea candicans* veido atsevišķu klasteri, *Saussurea pygmaea* atrodas atsevišķi no pārējām pētītajām sugām.
11. *Saussurea esthonica* ir filoģenētiski tuva Itālijas un Norvēģijas alpu rūgtlapēm, bet atšķiras no Austrijas alpu rūgtlapēm. Iespējams, tas saistīts ar citu alpu rūgtlapes pasugu Austrijā.

Aizstāvēšanai izvirzītās tēzes

1. Sugas bioloģijas, t.sk., ģenētikas un fizioloģijas vispusīga izpēte dabiskos un kontrolētos apstākļos ir būtiska tās saglabāšanas stratēģijas izstrādāšanā.
2. Aizsargājamo augu uzglabāšana *in vitro* nodrošina ģenētiskā materiāla saglabāšanu ilgtermiņā, kā arī darbojas kā izejmateriāls sugas izpētei, neapdraudot dabisko populāciju.
3. Ja vides apstākļu nelabvēlīgās izmaiņas ir nelielas, tad izmaiņas augu vitalitātē uzrāda hlorofila *a* fluorescences rādītāji *Performance Index* un *RC/ABS*.

Pateicības

Izsaku pateicību darba vadītājam Dr. habil. biol., prof. Ģ. Ieviņam un zinātniskajiem konsultantiem Dr. biol. D. Kļaviņai un Dr. biol. D. Ruņģim par sniegto palīdzību darba tapšanā.

Izsaku pateicību LVMI „Silava” Ģenētisko resursu centra darbiniekiem Dr. chem. Ilzei Veinbergai, Anitai Gailei, Angelikai Voronovai, Annai Koricai, Kristai Kānbergai-Siliņai, Linardam Ļubinskim par sniegto palīdzību un atbalstu.

Izsaku pateicību LVMI „Silava” darbiniekiem Dacei Auzenbahai, Dr. silv. Tālim Gaitniekam, Dārtai Kļaviņai, Dr. sc. ing. Mudrītei Daugavietei, Dr. silv. Imantam Baumanim, Dr. biol. Austrai Āboliņai, Ausmai Koricai un Ojāram Polim par sniegto palīdzību.

Izsaku pateicību Dr. Mallei Lehtai no Igaunijas Dabaszinātņu universitātes par sniegto palīdzību apsekojot populācijas Igaunijā.

Izsaku pateicību NBD sēklapmaiņas kuratorei Anitai Rozei par palīdzību sēklu saņemšanā no ārvalstu botāniskajiem dārziem, kā arī botāniskajiem dārziem, kas atsaucās lūgumam (Bundesgarden (Austrija), Reikjavikas HB (Īslande), Bonnas HBU (Vācija), Grācas HBU (Austrija), Šauļu HBU (Lietuva), Okamoto Ofuna HB (Japāna), HB Alpino Paradisia (Itālija), Gēteborgas HB (Zviedrija), VladivostokasHBA (Krievija), Turīnas HBU direction de „Chanousia” (Itālija), Talinas HB (Igaunija), P. J. Šafārik Universitāres BD (Slovākija), Sanktpēterburgas HBIB (Krievija), Oslo universitātes BD (Norvēģija), HB Akureiri (Īslande)) un atsūtīja sēklas pētniecībai.

Izsaku pateicību LU Bioloģijas fakultātes Augu fizioloģijas katedras darbiniekiem Dr. biol. Inetai Samsonai, Dr. biol. Unai Andersonai, Dr. biol. Jevgenijai Ņečajevai, Dr. biol. Dacei Megrei par sniegto palīdzību darba tapšanā.

Izsaku pateicību LU BI Augu minerālās barošanās laboratorijas kolektīvam par substrātu un augu analīzi un Dr. biol. Andim Karlsonam par substrātu receptūras izstrādi.

Paldies Dr. biol. Ģertrūdei Gavrilovai un Dr. biol., Dr. habil. ģeogr. Mārim Laiviņam par palīdzību uzsākot darbu.

Literatūras saraksts

- Abadía J., Morales F., Abadía A. 1999. Photosystem II efficiency in low chlorophyll, iron-deficient leaves. *Plant and Soil* 215: 183-192.
- Adams III W.W., Winter K., Schreiber U., Schramel P. 1990. Photosynthesis and chlorophyll fluorescence characteristics in relationship to changes in pigment and element composition of leaves of *Platanus occidentalis* L. during autumnal leaf senescence. *Plant Physiology* 93: 1184-1190.
- Adumitresei L., Zamfirache M.M., Olteanu Z., Boz I. 2011. Observations on the foliar assimilating pigments content for wild and garden roses. *Journal of Plant Development* 18: 47-54.
- Aliyev J.A., Mirzoyev R.S. 2010. Photosynthesis and productivity of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Proceedings of ANAS (Biological Sciences)* 65: 60-70.
- Ægisdóttir H.H., Kuss P., Stöcklin J. 2009. Isolated populations of a rare alpine plant show high genetic diversity and considerable population differentiation. *Annals of Botany* 104: 1313-1322.
- Agarwal M., Shrivastava N., Padh H. 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports* 27: 617-631.
- Andrušaitis G. (redaktors) 2003. *Latvijas Sarkanā Grāmata. 3. sējums. Vaskulārie augi*. Rīga. 691 lpp.
- Arora R., Bhojwani S. S. 1989. *In vitro* propagation and low temperature storage of *Saussurea lappa* C.B. Clarke – an endangered medicinal plant. *Plant Cell Reports* 8: 44-47.
- Arya S.K., Roy B.K. 2011. Manganese induced changes in growth, chlorophyll content and antioxidants activity in seedlings of broad bean (*Vicia faba* L.). *Journal of Environmental Biology* 32: 707-711.
- Baker N.R., Rosenqvist E. 2004. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany* 55: 1607-1621.
- Baldwin B.G. 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1: 3-16.
- Baligar V.C., Fageria N.K., He Z.L. 2001. Nutrient use efficiency in plants. *Communication in Soil Science and Plant Analysis* 32: 921-950.
- Barrett S.C.H., Kohn J.R. 1991. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. In: *Genetics and Conservation of Rare Plants*. Ed. Falk D.A., Holsinger K.E. Oxford University Press, New York, Oxford 3-30.
- Baskin J.M., Baskin C.C. 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research* 14: 1-16.
- Benson E.E., Danaher J.E., Pimbley I.M., Anderson C.T., Wake J.E., Daley S., Adams L.K. 2000. *In vitro* micropropagation of *Primula scotica*: a rare Scottish plant. *Biodiversity and Conservation* 9: 711-726.
- Bertrand M., Poirier I. 2005. Photosynthetic organisms and excess of metals. *Photosynthetica* 43: 345-353.
- Bewley J.D. 1997. Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9: 1055-1066.
- Bilz M., Kell S.P., Maxted N., Lansdown R.V. 2011. *European Red List of Vascular Plants*. Luxembourg: Publications Office of the European Union. 130 p.
- Birks H.J.B., Willis K.J. 2008. Alpines, trees, and refugia in Europe. *Plant Ecology and Diversity* 1: 147-

160.

- Boucher N., Carpentier R. 1999. Hg²⁺, Cu²⁺, and Pb²⁺-induced changes in photosystem II photochemical yield and energy storage in isolated thylakoid membranes: a study using simultaneous fluorescence and photoacoustic measurements. *Photosynthesis Research* 59: 167-174.
- Bouma T.J., Nielsen K.L., Koutstaal B. 2000. Sample preparation and scanning protocol for computerised analysis of root length and diameter. *Plant and Soil* 218: 185-196.
- Broadley M.R., White P.J., Hammond J.P., Zelko I., Lux A. 2007. Zinc in plants. *New Phytologist* 173: 677-702.
- Bu H., Chen X., Xu X., Liu K., Jia P., Du G. 2007. Seed mass and germination in an alpine meadow on the eastern Tsinghai-Tibet plateau. *Plant Ecology* 191: 127-149.
- Burda K., Kruk J., Schmid G.H., Strzalka K. 2003. Inhibition of oxygen evolution in photosystem II by Cu (II) ions is associated with oxidation of cytochrome b₅₅₉. *Biochemical Journal* 371: 597-601.
- Butola J.S., Samant S.S. 2010. *Saussurea* species in Indian Himalayan region: diversity, distribution and indigenous uses. *International Journal of Plant Biology* 1: 43-51.
- Byers D.L. 1998. Effect of cross proximity on progeny fitness in a rare and a common species of *Eupatorium* (Asteraceae). *American Journal of Botany* 85: 644-653.
- Cakmak I. 2002. Plant nutrition research: priorities to meet human needs for food in sustainable way. *Plant and Soil* 247: 3-24.
- Caputo P. 1997. DNA phylogeny in plants: history and new perspectives. *Lagascalia* 19: 331-344.
- Carpentier R. 2005. Influence of high light intensity on photosynthesis: photoinhibition and energy dissipation. Chapter 19 in *Handbook of Photosynthesis* ed. Pessaraki M. Marcel Dekker, New York 327-342.
- Cerabolini B., De Andreis R., Ceriani R. M., Pierce S., Raimondi B. 2004. Seed germination and conservation of endangered species from the Italian Alps: *Physoplexis comosa* and *Primula glaucescens*. *Biological Conservation* 117: 351-356.
- Chapin F.S. III 1980. The mineral nutrition of wild plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 11: 233-260.
- Chapin F.S. III, Schulze E.D., Mooney H.A. 1990. The ecology and economics of storage in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 21: 423-447.
- Chen H., Qualls R. G., Miller G. C. 2002. Adaptive responses of *Lepidium latifolium* to soil flooding: biomass allocation, adventitious rooting, aerenchyma formation and ethylene production. *Environmental and Experimental Botany* 48: 119-128.
- Chuenboonngarm N., Charoonsote S., Bhamarapavati S. 2001. Effect on BA and 2-iP on shoot proliferation and somaclonal variation of *Gardenia jasminoides* Ellis *in vitro* culture. *Science Asia* 27: 137-141.
- Clua A., Orsini H., Beltrano J. 2009. Incidence of variable flooding period on *Lotus tenuis* biomass production and leaf senescence. *Lotus Newsletter* 39: 13-20.
- Corrêa A., Strasser R.J., Martins-Loução M.A. 2006. Are mycorrhiza always beneficial? *Plant and Soil* 279: 65-73.
- Das K.K., Panda D., Sarkar R.K., Reddy J.N., Ismail A.M. 2009. Submergence tolerance in relation to variable floodwater conditions in rice. *Environmental and Experimental Botany* 66: 425-434.
- Demmig-Adams B., Gilmore A.M., Adams III W.W. 1996. *In vivo* functions of carotenoids in higher plants. *FASEB Journal* 10: 403-412.
- Dhar U., Joshi M. 2005. Efficient plant regeneration protocol through callus for *Saussurea obvallata* (DC.) Edgew. (Asteraceae): effect of explant type, age and plant growth regulators. *Plant Cell Reports* 24: 195-200.
- Dickore W.B. 2001. Observations of some *Saussurea* (Compositae-Cardueae) of W Kunlun, Karakorum and W Himalaya. *Edinburgh Journal of Botany* 58: 15-29.

- Ding L., Wang K.J., Jiang G.M., Biswas D.K., Xu H., Li L.F., Li Y.H. 2005. Effects of nitrogen deficiency on photosynthetic traits of maize hybrids released in different years. *Annals of Botany* 96: 925-930.
- Duffy K.J., Scopece G., Cozzolino S., Fay M.F., Smith R.J., Stout J.C. 2009. Ecology and genetic diversity of the dense-flowered orchid, *Neotinea maculata*, at the centre and edge of its range. *Annals of Botany* 104: 507-516.
- Edson J.L., Wenny D.L., Leege-Brusven A.D., Everett R.L. 1997. Using micropropagation to conserve threatened rare species in sustainable forests. *Journal of Sustainable Forestry* 5: 279 -291.
- Ek T., Suško U, Auziņš R. 2002. Mežaudžu atslēgas biotopu inventarizācija. Metodika. Rīga. 76 lpp. http://www.vmd.gov.lv/doc_upl/metodika_2002%284%29.pdf
- Ella E.S., Kawano N., Ito O. 2003. Importance of active oxygen-scavenging system in the recovery of rice seedlings after submergence. *Plant Science* 165: 85-93.
- Ellison A.M. 2001. Interspecific and intraspecific variation in seed size and germination requirements of *Sarracenia* (Sarraceniaceae). *American Journal of Botany* 88: 429 - 437.
- Fageria N.K., Baligar V.C., Li Y.C. 2008. The role of nutrient efficient plants in improving crop yields in the twenty first century. *Journal of Plant Nutrition* 31: 1121-1157.
- Fageria N.K., Moreira A. 2011. The role of mineral nutrition on root growth of crop plants. In: *Advances in Agronomy* vol. 10. Ed. Sparks D.L., Burlington, Academic Press. 251-331.
- Fargašová A. 1998. Root growth inhibition, photosynthetic pigments, and metal accumulation in *Sinapis alba* as the parameters for trace metals effect determination. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 61: 762-769.
- Fargašová A. 2004. Toxicity comparison of some possible toxic metals (Cd, Cu, Pb, Se, Zn) on young seedlings of *Sinapis alba* L. *Plant, Soil and Environment* 50: 33-38.
- Fay M.F. 1992 Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 28:1-4.
- Ferreira K.N., Iverson T.M., Maghlaoui K., Barber J., Iwata S. 2004. Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science* 303: 1831-1838.
- Fjellheim S., Rognli O.A. 2005. Molecular diversity of local Norwegian meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.) populations and Nordic cultivars – consequences for management and utilisation. *Theoretical and Applied Genetics* 111: 640-650.
- Fühner C., Runge M. 2009. Are Fe and P availabilities involved in determining the occurrence and distribution of *Calluna vulgaris* (L.) Hull in semi-arid grasslands on calcareous soils? *Plant Soil* 316: 161-176.
- Gailīte A., Kļaviņa D., Ievinsh G. 2010. *In vitro* propagation of an endangered plant *Saussurea esthonica*. *Environmental and Experimental Biology* 8: 43-48.
- Galmés J., Abadía A., Medrano H., Flexas J. 2007. Photosynthesis and photoprotection responses to water stress in the wild-extinct plant *Lysimachia minoricensis*. *Environmental and Experimental Botany* 60: 308-317.
- Gamon J.A., Surfus J.S. 1999. Accessing leaf pigment content and activity with reflectometer. *New Phytologist* 143: 105-117.
- Gaspar T., Kevers C., Penel C., Greppin H., Reid D.M., Thorpe T.A. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 32: 272-289.
- Geissler K., Gzik A. 2008. The impact of flooding and drought on seeds of *Cnidium dubium*, *Gratiola officinalis*, and *Juncus atratus*, three endangered perennial river corridor plants of Central European lowlands. *Aquatic Botany* 89: 283-291.
- Grandbastien M.A. 1998. Activation of plant retrotransposons under stress conditions. *Trends in Plant Science* 3:181-187.

- Grime J.P., Thompson K., Hunt R., Hodgson J.G., Cornelissen J.H.C., Rorison I.H., Hendry G.A.F., Ashenden T.W., Askew A.P., Band S.R., Booth R.E., Bossard C.C., Campbell B.D., Cooper J.E.L., Davison A.W., Gupta P.L., Hall W., Hans D.W., Hannah M.A., Hillier S.H., Hodgkinson D.J., Jalili A., Liu Z., Mackey J.M.L., Mathews N., Mowforth M.A., Neal A.M., Reader R., J., Reiling K., Ross-Fraser W., Spencer R.E., Sutton F., Tasker D.E., Thorpe P.C., Whitehouse J. 1997. Integrated screening validates primary axes of specialisation in plants. *Oikos* 79: 259-281.
- Groenendaal J. M. van, Klimeš L., Klimešová J., Hendriks R.J.J. 1996. Comparative ecology of clonal plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Biological Sciences* 351: 1331-1339.
- Guo M., Gao M., Liu C.-Z. 2007. *In vitro* propagation of an endangered medicinal plant *Saussurea involucrata* Kar. et Kir. *Plant Cell Reports* 26: 261-265.
- Hänsch R., Mendel R.R. 2009. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current Opinion in Plant Biology* 12: 259-266.
- Hensen I., Oberprieler C. 2005. Effects of population size on genetic diversity and seed production in the rare *Dictamnus albus* (Rutaceae) in Central Germany. *Conservation Genetics* 6: 63-73.
- Hensen I., Oberprieler C., Wesche K. 2005. Genetic structure, population size, and seed production of *Pulsatilla vulgaris* Mill. (Ranunculaceae) in Central Germany. *Flora* 200: 3-14.
- Hensen I., Wesche K. 2006. Relationships between population size, genetic diversity and fitness components in the rare plant *Dictamnus albus* in Central Germany. *Biodiversity and Conservation* 15: 2249-2261.
- Hermans C., Smeyers M., Rodriguez R.M., Eyletters M., Strasser R.J., Delhaye J.P. 2003. Quality assessment of urban's trees: a comparative study of physiological characterisation, airborne imaging and on site fluorescence monitoring by the OJIP-test. *Journal of Plant Physiology* 160: 81-90.
- Hidayati S.N., Baskin J.M., Baskin C.C. 2000. Dormancy-breaking and germination requirements of seeds of four *Lonicera* species (Caprifoliaceae) with underdeveloped spatulate embryos. *Seed Science Research* 10: 459-469.
- Hill M.O., Preston C.D., Roy D.B. 2004. PLANTATT - attributes of British and Irish plants: status, size, life history, geography and habitats. Online Atlas of the British and Irish Flora <http://www.brc.ac.uk/plantatlas/index.php?q=plant/saussurea-alpina>.
- Holsinger K.E., Gotlieb L.D. 1991. Conservation of rare and endangered plants: Principles and prospects. In: Falk D.A., Holsinger K.E. (eds) *Genetics and conservation of rare plants*. Oxford University Press, New York, pp 195-208.
- Holobiuc I., Blindu R. 2007. *In vitro* culture introduction for *ex situ* conservation of some rare plant species. *Romanian Journal of Biology – Plant Biology* 51-52: 13-23.
- Hunt L.P. 2001. Low seed availability may limit recruitment in grazed *Atriplex vesicaria* and contribute to its local extinction. *Plant Ecology* 157: 53-67.
- Ieviņa B., Rostoks N., Ieviņš Ģ. 2009. Jūrmalas zilpodzes *Eryngium maritimum* L. Latvijas populācijas ģenētiskās daudzveidības analīze. *Latvijas veģetācija* 18: 13-24.
- Ilomets M., Truus L., Pajula R., Sepp K. 2010. Species composition and structure of vascular plants and bryophytes on the water level gradient within a calcareous fen in North Estonia. *Estonian Journal of Ecology* 59: 19-38.
- Ingelög T., Andersson R., Tjernberg M. 1993. Red Data Book of the Baltic Region. Part 1. – Swedish Threatened Species Unit, Uppsala. 95 pp.
- Jackson M. B., Colmer T. D. 2005. Response and adaptation by plants to flooding stress. *Annals of Botany* 96: 501-505.
- Jacquemyn H., Brys R., Hermy M. 2002. Patch occupancy, population size and reproductive success of a forest herb (*Primula elatior*) in a fragmented population. *Oecologia* 130: 617-625.

- Jayasuriya K. M. G., Baskin J. M., Baskin C. C. 2009. Sensitivity cycling and its ecological role in seeds with physical dormancy. *Seed Science Research* 19: 3-13.
- Johnson T. S., Narayan S. B., Narayana D. B. A. 1997. Rapid *in vitro* propagation of *Saussurea lappa*, an endangered medicinal plant, through multiple shoot cultures. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 33: 128-130.
- Joshi M., Dhar U. 2003. *In vitro* propagation of *Saussurea obvallata* (DC.) Edgew. – an endangered ethnoreligious medicinal herb of Himalaya. *Plant Cell Reports* 21: 933 - 939.
- Jutila H.M. 2003. Germination in Baltic coastal wetland meadows: similarities and differences between vegetation and seed bank. *Plant Ecology* 166: 275-293.
- Kalendar R., Antonius K., Smýkal P., Schulman A.H. 2010. iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. *Theoretical and Applied Genetics* 121:1419-1430.
- Kalendar R. 2011. The use of retrotransposon-based molecular markers to analyze genetic diversity. *Ratarstvo I Povrtarstvo / Field Vegetable Crop Research* 48: 261-274.
- Kell S.P., Knüpffer H., Jury S.L., Maxted N. and Ford-Lloyd B.V. 2005. Catalogue of Crop Wild Relatives for Europe and the Mediterranean. University of Birmingham, Birmingham, UK. Available online via the Crop Wild Relative Information System (CWRIS – <http://www.pgrforum.org/cwriscwrisc.asp>)
- Kermonde A.R. 2005. Role of abscisic acid in seed dormancy. *Journal of Plant Growth Regulation* 24: 319-344.
- Khan A.A. 1968. Inhibition of gibberellic acid-induced germination by abscisic acid and reversal by cytokinins. *Plant Physiology* 43: 1463-1465.
- Khan M.A., Gul B., Weber D.J. 2004. Action of plant growth regulators and salinity on seed germination of *Ceratoides lanata*. *Canadian Journal of Botany* 82: 37-42.
- Khan M.A., Ungar I.A. 1997. Alleviation of seed dormancy in the desert forb *Zygophyllum simplex* L. from Pakistan. *Annals of Botany* 80: 395-400.
- Klimeš L. 2008. Clonal splitters and integrators in harsh environments of the Trans-Himalaya. *Evolutionary Ecology* 22: 351-367.
- Klimeš L., Klimešová J. 1999. CLO-PLA2 – a database of clonal plants in central Europe. *Plant Ecology* 141: 9-19.
- Klimešová J., Doležal J., Dvorský M., de Bello F., Klimeš L. 2011. Clonal growth forms in Eastern Ladakh, Western Himalayas: classification and habitat. *Folia Geobotanica* 46: 191-217.
- Klimešová J., Klimeš L. 2006. Clo-Pla3 – a database of clonal growth architecture of Central European plants. <http://clopla.butbn.cas.cz/>
- Kļaviņa D., Gailīte A., Ievinsh G. 2006. Initial responses of explants from rare and endangered costal plant species during initiation of tissue culture. *Acta Universitatis Latviensis* 710: 81-91.
- Kļaviņa D., Gailīte A., Jakobsons G., Ņečajeva J., Gavrilova Ģ. 2004. Tissue culture technology in conservation of threatened plant species in Latvia. *Acta Universitatis Latviensis* 676: 183-188.
- Kļaviņa D., Šmite D. 2009. Collection of threatened plants of Latvia in National Botanic Garden. *Baltic Botanic Gardens in 2007-2008*. Rīga, Latvija 61-65.
- Kozłowski T.T. 2002. Physiological-ecological impacts of flooding on riparian forest ecosystems. *Wetlands* 22: 550-561.
- Kühne C., Bartsch N. 2007. Germination of acorns and development of oak seedlings (*Quercus robur* L.) following flooding. *Journal of Forest Science* 53: 391-399.
- Kumar A., Bennetzen J.L. 1999. Plant retrotransposons. *Annual Review of Genetics* 12: 479-532.
- Kuroha T., Satoh S. 2007. Involvement of cytokinins in adventitious and lateral root formation. *Plant Root* 1: 27-33.
- Lambers H., Chapin III F.S., Pons T.L. 2008. *Plant Physiological Ecology*. Second ed. Springer Science+Business Media, LLC 610 p.

- Lande R. 1988. Genetics and demography in biological conservation. *Science* 241: 1455-1460.
- Laplace L., Benkova E., Casimiro I., Maes L., Vanneste S., Swarup R., Weijers D., Calvo V., Parizot B., Herrera-Rodriguez M. B., Offringa R., Graham N, Dumas P., Friml J., Bogusz D., Beckman T., Bennett M. 2007. Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. *Plant and Cell* 19: 3889–3900.
- Lauterbach D., Ristow M., Gemeinholzer B. 2012. Population genetics and fitness in fragmented populations of the dioecious and endangered *Silene otites* (Caryophyllaceae). *Plant Systematics and Evolution* 298: 155-164.
- Law W., Salick J., Knight T.M. 2010. The effects of pollen limitation on population dynamics of snow lotus (*Saussurea medusa* and *S. laniceps*, Asteraceae): threatened Tibetan medicinal plants of the eastern Himalayas. *Plant Ecology* 210: 343-357.
- Lee J., Baldwin B.G., Gottlieb L.D. 2002. Phylogeny of *Stephanomeria* and related genera (Compositae – Lactuceae) based on analysis of 18S-26S nuclear rDNA ITS and ETS sequences. *American Journal of Botany* 89:160-168.
- Li R., Guo P., Baum M., Grando S., Ceccarelli S. 2006. Evaluation of chlorophyll content and fluorescence parameters as indicators of drought tolerance in barley. *Agricultural Sciences in China* 5: 751-757.
- Liao C.T., Lin C.H. 2001. Physiological adaptation of crop plants to flooding stress. *Proceedings of the National Science Council ROC(B)* 25: 148-157.
- Lipschitz S. (Липшиц С.) 1979. Род *Saussurea* DC. Наука, Leningrad. 283 pp. (In Russian).
- Luijten S.H., Dierick A., Oostermeijer J.G. B., Raijmann L.E.L., den Nijs H.C.M. 2000. Population size, genetic variation and reproductive success in a rapidly declining, self-incompatible perennial (*Arnica montana*) in the Netherlands. *Conservation Biology* 14: 1776-1787.
- Luijten S.H., Kéry M., Oostermeijer J.G. B., den Nijs H.(J.)C.M. 2002. Demographic consequences of inbreeding and outbreeding in *Arnica montana*: a field experiment. *Journal of Ecology* 90: 593-603.
- Macek P., Rejmánková E., Houdková K. 2006. The effect of long-term submergence on functional properties of *Eleocharis cellulosa* Torr. *Aquatic Botany* 84: 251-258.
- Maļceva M., Vikmane M., Stramkale V. 2011. Changes of photosynthesis-related parameters and productivity of *Cannabis sativa* under different nitrogen supply. *Environmental and Experimental Biology* 9: 61-69.
- Maļceva M., Vikmane M., Stramkale V., Stramkalis A. 2009. Slāpekļa mēslojuma izmantošanas efektivitāte galviņkāpostiem. *Proceedings of the 7th International Scientific and Practical Conference Environment. Technology. Resources. Vol. 1: 125-132.*
- Martins L. 2006. Systematics and biogeography of *Klasea* (Asteraceae-Cardueae) and synopsis of the genus. *Botanical Journal of the Linnean Society* 152: 435-464.
- Martins L., Hellwig F.H. 2005. Phylogenetic relationships of the enigmatic species *Serratula chinensis* and *Serratula forrestii* (Asteraceae – Cardueae). *Plant Systematics and Evolution* 255: 215-224.
- Massacci A., Jones H.G. 1990. Use of simultaneous analysis of gas-exchange and chlorophyll fluorescence quencing for analysing the effects of water stress on photosynthesis in apple leaves. *Trees* 4: 1-8.
- Maxwell K., Johnson G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51: 659-668.
- Mengel K., Kirkby E.A. 2001. *Principles of Plant Nutrition*. 5th ed. Kluwer Academic Publishers, the Netherlands. 849 p.
- Mikulík J., Vinter V. 2002. Evaluating factors affecting germination of *Dianthus superbis* L. subsp. *superbus*. *Acta Universitatis Palackinae Olomucensis Facultas Rerum Naturalium (2001-2002) Biologica* 39-40: 13-18.
- Misra A., Tyler G. 1999. Influence of soil moisture on soil solution chemistry and concentrations of

- minerals in the calcicoles *Phleum phleoides* and *Veronica spicata* grown on a limestone soil. *Annals of Botany* 84: 401-410.
- Misra A., Tyler G. 2000. Effect of wet and dry cycles in calcareous soil on mineral uptake of two grasses, *Agrostis stolonifera* L. and *Festuca ovina* L. *Plant and Soil* 24: 297-303.
- Mohammed G.H., Zarco-Tejada P., Miller J. R. 2003. Applications of chlorophyll fluorescence in forestry and ecophysiology. Chapter 3 in *Practical Application of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology*. Ed. De Ell I.R., Toivonen P.M.A. Kluwer academic publishers. Boston / Dordrecht/ London. 80-124.
- Mondini L., Noorani A., Pagnotta M.A. 2009. Assessing plant genetic diversity by molecular tools. *Diversity* 1: 19-35.
- Morales F., Abadía A., Abadía J. 1991. Chlorophyll fluorescence and photon yield of oxygen evolution in iron-deficient sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. *Plant Physiology* 97: 886-893.
- Morales F., Belkhdja R., Abadía A., Abadía J. 2000. Photosystem II efficiency and mechanisms of energy dissipation in iron-deficient, field-grown pear trees (*Pyrus communis* L.). *Photosynthesis Research* 63: 9-21.
- Mölken T. van, Jorritsma-Wienk L.D., Hoek P.H.W. van, Kroon H. 2005. Only seed size matters for germination in different populations of the dimorphic *Tragopogon pratensis* subsp. *pratensis* (Asteraceae). *American Journal of Botany* 92: 432-437.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Murata N., Takahashi K., Nishiyama Y., Allakhverdiev S.I. 2007. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochimica et Biophysica Acta* 1767: 414 - 421.
- Narits A., Leht M., Paal J. 2000. Taxonomic status of *Saussurea alpina* subsp. *esthonica* (Asteraceae): phenetical analysis. *Annales Botanici Fennici* 37: 197-206.
- Naumann J.C., Young D.R., Anderson J.E. 2007. Linking leaf chlorophyll fluorescence properties to physiological responses for detection of salt and drought stress in coastal plant species. *Physiologia Plantarum* 131: 422-433.
- Naumann J.C., Anderson J.E., Young D.R. 2008. Linking physiological responses, chlorophyll fluorescence and hyperspectral imagery to detect salinity stress using the physiological reflectance index in the coastal shrub, *Myrica cerifera*. *Remote Sensing of Environment* 112: 3865-3875.
- Netto A.T., Campostrini E., de Oliveira J.G., Bressan-Smith R.E. 2005. Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll a fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves. *Scientia Horticulturae* 104: 199-209.
- Newman D., Tallmon D.A. 2001. Experimental evidence for beneficial fitness effects of gene flow in recently isolated populations. *Conservation Biology* 15: 1054-1063.
- Nishio J.N. 2000. Why are higher plants green? Evolution of the higher plant photosynthetic pigment complement. *Plant Cell and Environment* 23: 539-548.
- Nixon P.J., Michoux F., Yu J., Boehm M., Komenda J. 2010. Recent advances in understanding the assembly and repair of photosystem II. *Annals of Botany* 106: 1-16.
- Nikolić R., Mitić N., Miletić R., Nešković M. 2006. Effects of cytokinins on *in vitro* seed germination and early seedling morphogenesis in *Lotus corniculatus* L. *Journal of Plant Growth Regulation* 25: 187-194.
- Oostermeijer J.G.B., Luijten S.H., Den Nijs J.C.M. 2003. Integrating demographic and genetic approaches in plant conservation. *Biological Conservation* 113: 389-398.
- Ovalde A. 2011. Optimization of plant mineral nutrition revisited: the roles of plant requirements, nutrient interactions, and soil properties in fertilization management. *Environmental and Experimental Biology* 9: 1-8.
- Otronen M., Rosenlund H.M. 2001. Morphological asymmetry and chlorophyll fluorescence in Scots

- pine (*Pinus sylvestris*): responses to variation in soil moisture, nutrients and defoliation. *Annales Botanici Fennici* 38: 285-294.
- Otte M.L. 2001. What is stress to a wetland plant? *Environmental and Experimental Botany* 46: 195-202.
- Oukarroum A., Madidi S., Schansker G., Strasser R.J. 2007. Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll a fluorescence OLKJIP under drought stress and re-watering. *Environmental and Experimental Botany* 60: 438-446.
- Pakalne M. 2008. Purva biotopi un to aizsardzība. Grām.: Pakalne M. (red.) Purvu aizsardzība un apsaimniekošana īpaši aizsargājamās dabas teritorijās Latvijā. Jelgavas tipogrāfija, Rīga, 8-19.
- Panda D., Rao D.N., Sharma S.G., Strasser R.J., Sarkar R.K. 2006. Submergence effects on rise genotypes during seedling stage: probing of submergence driven changes of photosystem II by chlorophyll a fluorescence induction O-J-I-P transients. *Photosynthetica* 44: 69-75.
- Paunescu A. 2009. Biotechnology for endangered plant conservation: a critical overview. *Romanian Biotechnological Letters* 14: 4095-4103.
- Peakall, R. and Smouse P.E. (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- Pezeshki S.R. 2001. Wetland plant responses to soil flooding. *Environmental and Experimental Botany* 46: 299-312.
- Pierik R., Millenaar F.F., Peeters A.J.M., Voesenek L.A.C.J. 2005. New perspectives in flooding research: the use of shade avoidance and *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany* 96: 533-540.
- Pinior A., Grunewaldt-Stöcker G., von Alten H., Strasser R.J. 2005. Mycorrhizal impact on drought stress tolerance of rose plants probed by chlorophyll a fluorescence, proline content and visual scoring. *Mycorrhiza* 15: 596-605.
- Poczai P., Hyvönen J., 2010. Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetics: problems and prospects. *Molecular Biology Reports* 37: 1897-1912.
- Probert R.J., Daws M.I., Hay F.R. 2009. Ecological correlates of *ex situ* seed longevity: a comparative study on 195 species. *Annals of Botany* 104: 57-69.
- Qu X., Baskin J.M., Wang L., Huang Z. 2008. Effects of cold stratification, temperature, light and salinity on seed germination and radicle growth of the desert halophyte shrub, *Kalidium capsicum* (Chenopodiaceae). *Plant Growth Regulation* 54: 241-248.
- Raab-Straube E. 2003. Phylogenetic relationships in *Saussurea* (Compositae, Cardueae) *sensu lato*, inferred from morphological, ITS and trnL-trnF sequence data, with a synopsis of *Himalaiella* gen. nov., *Lipschitziella* and *Frolovia*. *Willdenowia* 33: 379-393.
- Reed D.H. 2005. Relationship between population size and fitness. *Conservation Biology* 19: 563-568.
- Reed D.H., Frankham R. 2002. Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology* 17: 230-237.
- Richardson A.D., Duigan S.P., Berlyn G.P. 2002. An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. *New Phytologist* 153: 185-194.
- Riņķis G., Ramane H. 1989. Kā barojas augi. Rīga, Avots, 152 lpp.
- Rusch G.M., Wilmann B., Klimešová J., Evju M. 2011. Do clonal and bud bank traits vary in correspondence with soil properties and resource acquisition strategies? Patterns in Alpine communities in the Scandian mountains. *Folia Geobotanica* 46: 237-254.
- Sakalauskienė S., Šabajevienė G., Lazauskas S., Brazaitytė A., Samuolienė G., Urbonavičiūtė A., Sakalauskaitė J., Ulinskaitė R., Duchovskis P. 2008. Complex influence of different humidity and temperature regime on pea photosynthetic indices in VI-VII organogenesis stages. Scientific Works of the Lithuanian Institute of Horticulture and Lithuanian University of Agriculture. *Sodininkystė ir Daržininkystė* 27: 199-207.

- Sarkar R.K., Panda D., Rao D.N., Sharma S.G. 2004. Chlorophyll fluorescence parameters as indicators of submergence tolerance in rice. *International Rice Research Notes* 29: 66-68.
- Sammul M., Kull K., Niitla T., Möls T. 2004. A comparison of plant communities on the basis of their clonal growth patterns. *Evolutionary Ecology* 18: 443-467.
- Samsone I., Andersone U., Vikmane M., Ieviņa B., Pakarna G., Ievinsh G. 2007. Nondestructive methods in plant biology: an accurate measurement of chlorophyll content by a chlorophyll meter. *Acta Universitatis Latviensis* 723: 145-154.
- Sarasan V., Cripps R., Ramsay M.M., Atherton C., McMichen M., Prendergast G., Rowntree J.K. 2006. Conservation *in vitro* of threatened plants – progress in the past decade. *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 42: 206-214.
- Sayed O.H. 2003. Chlorophyll fluorescence as a tool in cereal crop research. *Photosynthetica* 41: 321-330.
- Schemske D.W., Husband B.C., Ruckelshaus M.H., Goodwillie C., Parker I.M., Bishop J.G. 1994. Evaluating approaches to the conservation of rare and endangered plants. *Ecology* 75: 584-606.
- Schlemmer M.R., Francis D.D., Shanahan J.F., Schepers J.S. 2005. Remotely measuring chlorophyll content in corn leaves with differing nitrogen levels and relative water content. *Agronomy Journal* 97:106-112.
- Schmidt K., Jensen K. 2000. Genetic structure and AFLP variation of remnant populations in the rare plant *Pedicularis palustris* (Scrophulariaceae) and its relation to population size and reproductive components. *American Journal of Botany* 87: 678-689.
- Schulman A.H. 2007. Molecular markers to assess genetic diversity. *Euphytica* 158: 313-321.
- Schwiebächer E., Navarro-Cano J.A., Neuner G., Erschbamer B. 2011. Seed dormancy in alpine species. *Flora* 206: 845-856.
- Sharma R.K., Sharma S., Sharma S.S. 2006. Seed germination behaviour of some medicinal plants of Lahaul and Spiti cold desert (Himachal Pradesh): implications for conservation and cultivation. *Current Science* 90: 1113-1118.
- Shi Z., Raab-Straube E. von, Greuter W., Martins L. 2011. Cardueae. In: Wu Z. Y., Raven P. H., Hong D. Y., eds., *Flora of China* vol. 20-21 (Asteraceae). Science Press (Beijing) & Missouri Botanical Garden Press (St Louis), 42-194.
- Shimono A., Washitani I. 2004. Seedling emergence patterns and dormancy / germination physiology of *Primula modesta* in a subalpine region. *Ecological Research* 19: 541-551.
- Šingliarova B., Chrtek J., Mraz P. 2008. Loss of genetic diversity in isolated populations of an alpine endemic *Pilosella alpicola* subsp. *ullepitschii*: effect of long-term vicariance or long-distance dispersal? *Plant Systematics and Evolution* 275: 181-191.
- Sonboli A., Stroka K., Osaloo K.S., Oberprieler C. 2012. Molecular phylogeny and taxonomy of *Tanacetum* L. (Compositae, Anthemideae) inferred from nrDNA ITS and cpDNA trnH-psbA sequence variation. *Plant Systematics and Evolution* 298: 431-444.
- Sosnová M., Diggelen R. van, Klimešová J. 2010. Distribution of clonal growth forms in wetlands. *Aquatic Botany* 92: 33-39.
- Stevanović V., Vukojičić S., Šinžar-Sekulić J., Lazarević M., Tomović G., Tan K. 2009. Distribution and diversity of Arctic-Alpine species in the Balkans. *Plant Systematics and Evolution* 283: 219-235.
- Stöcklin J., Kuss P., Pluess A.R. 2009. Genetic diversity, phenotypic variation and local adaptation in the alpine landscape: case studies with alpine plant species. *Botanica Helvetica* 119: 125-133.
- Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Srivastava A. 2004. Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. In: Papageorgiou G.C., Govindjee Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis. Springer, Dordrecht, 321-362.
- Strasser R.J., Srivastava A., Tsimilli-Michael M. 2000. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. Chapter 25 in: Yunus M., Pathre U., Mohanty P. (eds.) *Probing*

- Photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation. Taylor & Francis, London, 445-483.
- Subotić A., Jevremović S., Grubišić D. 2009. Influence of cytokinins on *in vitro* morphogenesis in root cultures of *Centaureum erythraea* – valuable medicinal plant. *Scientia Horticulturae* 120: 386-390.
- Taiz L., Zeiger E. 2006. *Plant Physiology*. Fourth edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts P. 764.
- Tamm A., Kull K., Sammul M. 2002. Classifying clonal growth forms based on vegetative mobility and ramet longevity: a whole community analysis. *Evolutionary Ecology* 15: 383-401.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Thach L.B., Shapcott A., Schmidt S., Critchley C. 2007. The OJIP fast fluorescence rise characterizes *Graptophyllum* species and their stress responses. *Photosynthesis Research* 94: 423-436.
- Thompson K. 1987. Seeds and seed banks. *New Phytologist* 106 (Suppl.): 23-34.
- Torresán A., Kesteloot J., Castaño F., Rodríguez R., Colabelli M. 1996. Use of immature seed germination technique as an alternative to *in vitro* culture of sunflower (*Helianthus annuus* L.) embryos. *Euphytica* 91:1-3.
- Tsaliki M., Diekmann M. 2011. Population size, pollination and reproductive success in two endangered *Gentista* species. *Flora* 206: 246-250.
- Tyler G. 1996. Mineral nutrient limitations of calcifuge plants in phosphate sufficient limestone soil. *Annals of Botany* 77: 649-656.
- Uddling J., Gelang-Alfredsson J., Piiki K., Pleijel H. 2007. Evaluating the relationship between leaf chlorophyll concentration and SPAD-502 chlorophyll meter readings. *Photosynthesis Research* 91: 37-46.
- van Kooten O., Snel J.F.H. 1990. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynthesis Research* 25: 147-150.
- Varshney R.K., Graner A., Sorrells M.E. 2005. Genomics-assisted breeding for crop improvement. *Trends in Plant Science* 10: 621-630.
- Velázquez M., Campillo M.C. del, Torrent J. 2004. Temporary flooding increases iron phytoavailability in calcareous vertisols and inceptisols. *Plant and Soil* 266: 195-203.
- Voesenek L.A.C.J., Benschop J.J., Bou J., Cox M.C.H., Groeneveld H.W., Millenaar F.F., Vreeburg R.A.M., Peeters A.J.M. 2003. Interactions between plant hormones regulate submergence-induced shoot elongation in the flooding-tolerant dicot *Rumex palustris*. *Annals of Botany* 91: 205-211.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. and Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.
- Wang Y.-J., Liu J.-Q. 2004. Phylogenetic analyses of *Saussurea* sect. *Pseudoeriocoryne* (Asteraceae: Cardueae) based on chloroplast DNA trnL-F sequences. *Biochemical Systematics and Ecology* 32: 1009-1023.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, New York, 315-322.
- Williamson A., Conlan B., Hillier W., Wydrzynski T. 2011. The evolution of Photosystem II: insights into the past and future. *Photosynthesis Research* 107: 71-86.
- Wydrzynski T.J. 2008. Water splitting by Photosystem II—where do we go from here? *Photosynthesis Research* 98: 43-51.
- Yamamoto F., Sakata T., Terazawa K. 1995. Physiological, morphological and anatomical responses of *Fraxinus mandshurica* seedlings to flooding. *Tree Physiology* 15: 713-719.
- Zengin F.K. 2006. The effects of Co^{2+} and Zn^{2+} on the contents of protein, abscisic acid, proline and

-
- chlorophyll in bean (*Phaseolus vulgaris* cv. Strike) seedlings. *Journal of Environmental Biology* 27: 441-448.
- Zhou X.-J., Liang Y., Chen H., Shen S.-H., Jing Y.-X. 2006. Effects of rhizobia inoculation and nitrogen fertilization on photosynthetic physiology of soybean. *Photosynthetica* 44: 530-535.
- Zohlen A., Tyler G. 1997. Differences in iron nutrition strategies of two calcifuges, *Carex pilulifera* L. and *Veronica officinalis* L. *Annals of Botany* 80: 553-559.
- Zohlen A., Tyler G. 2004. Soluble inorganic tissue phosphorus and calcicole-calcifuge behaviour of plants. *Annals of Botany* 94: 427-432.