

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE
MOLEKULĀRĀS BIOLOĢIJAS KATEDRA

Ložņu āboliņa (*Trifolium repens* L.) Karpatu kalnu un
Latvijas populāciju ģenētiskās daudzveidības salīdzinājums

Bakalaura darbs

Autore: Sandra Dombrovska

Stud.apl.nr. sd16016

Darba vadītāja: Dr.biol. Dace Grauda

RĪGA 2019

KOPSAVILKUMS

Sandra Dombrovska (2019): Ložņu āboliņa (*Trifolium repens* L.) Karpatu kalnu un Latvijas populāciju ģenētiskās daudzveidības salīdzinājums.

Ložņu āboliņš (*Trifolium repens* L.) ir viens no plaši izmantotajiem lopbarības augiem visā pasaulē. Izmantots kā modeļobjekts. Bakalaura darba mērķis ir salīdzināt Karpatu kalnu savvaļas populāciju un šķirnes "Daile" materiālu daudzveidību un retrotranspozonu kustību pēc UV gaismas stresora ietekmes. Bakalaura darba izstrādes laikā tika izdalīts DNS no 117 izkaltētiem paraugiem. Tika veikta iPBS analīze, klasteru analīze, UV-B starojuma ietekmes analīze. Rezultāti liecina, ka šķirnes "Daile" populācija iedalās divās atsevišķās grupās un Slovērijas genotipam ir izveidojušies aizsardzības mehānismi pret UV-B starojumu.

Atslēgas vārdi: *Trifolium repens*, ložņu āboliņš, UV-B starojums, iPBS, retrotranspozoni.

SUMMARY

Sandra Dombrovska (2019): The comparison of genetic diversity of white clover (*Trifolium repens* L.) from the Carpathian mountains and the Latvian populations.

White clover (*Trifolium repens* L.) is one of the widely used forage plants in the world. Used as model object. The aim of the Bachelor's thesis is to compare the diversity of the Carpathian Mountains wild populations and variety "Daile" and the movement of retrotransposons after UV-B radiation. DNA was extracted from 117 dried samples. iPBS analysis, cluster analysis and UV-B radiation analysis were performed. The results show that the population of the variety "Daile" is divided into two groups and the Slovak genotype has developed protection mechanisms against UV-B radiation.

Keywords: *Trifolium repens*, white clover, UV-B radiation, iPBS, retrotransposons.

SATURS

APZĪMĒJUMU SARAKSTS	5
IEVADS.....	6
1. LITERATŪRAS APSKATS.....	7
1.1. <i>Trifolium repens</i> apraksts	7
1.1.1. <i>Trifolium repens</i> morfoloģiskais un ģenētiskais apraksts, sistemātika	7
1.1.2. <i>Trifolium repens</i> izplatība Latvijā un pasaulē	9
1.1.3. <i>Trifolium repens</i> augšanas apstākļu raksturojums	10
1.2. <i>In vitro</i> kultūras	10
1.3. Molekulāro marķieru sistēmas	11
1.3.1. Retrotranspozoni kā viens no molekulāro marķieru veidiem.....	13
1.3.2. iPBS metode	14
1.4. Polimerāzes ķēdes reakcija (PCR).....	14
1.5. Gela elektroforēze	15
1.6. Plūsmas citometrija	15
2. MATERIĀLI UN METODES	17
2.1. Materiāli	17
2.1.1. Taksonu nosaukumu nomenklatūra.....	17
2.2. Metodes	17
2.2.1. Paraugu iegūšana	17
2.2.2. Sēklu sterilizēšana un diedzēšana.....	18
2.2.3. Sēklu audzēšana <i>in vitro</i>	18
2.2.4. DNS izdalīšana	18
2.2.5. PCR reakcijas	18
2.2.6. Gela elektroforēze	19
2.2.7. Plūsmas citometrija	19
3. REZULTĀTI.....	20

3.1. DNS izdalīšana	20
3.2. UV-B starojuma ietekmes eksperiments	20
3.3. iPBS analīze	21
3.4. Praimeru PIC vērtība	22
3.5. Klasteru analīze	23
3.6. UV-B starojuma ietekmes rezultāti	25
4. DISKUSIJA.....	29
5. SECINĀJUMI	32
6. PATEICĪBAS	33
7. LITERATŪRAS SARAKSTS	34

APZĪMĒJUMU SARAKSTS

cDNS – komplimetārā DNS

cM – centi morgani

CTAB – heksadeciltrimetilamonija bromīds

DNS – dezoksiribonukleīnskābe

dNTP – deoksinukleotīdi

EDTA – etilēndiamīntetraetiķskābe

FCM – plūsmas citometrs

In situ – uz vietas

In vitro – dzīvā organismā

In vivo – ārpus dzīvā organisma

LTR-RT – garo sekvenču atkārtojumu retrotranspozoni

Mbp – mega bāzu pāri

Non-LTR-RT – īso sekvenču atkārtojumu retrotranspozoni

PCR – polimerāzes ķēdes reakcija

rpm – rotācijas minūtē

RT – retrotranspozoni

tRNA – transporta RNS

UV – ultravioletais starojums

UV-B – ultravioletais B starojums

IEVADS

Ložņu āboliņš (*Trifolium repens* L.) ir viens no svarīgākajiem un plaši izmantotajiem lopbarības augiem visā pasaulē, un tas ir labi pielāgojies mērenajam klimatam. Zālāji un ganības aizņem aptuveni divas trešdaļas no pasaules lauksaimniecības zemēm. Tiem ir būtiska loma pārtikas ražošanas, ekosistēmu pakalpojumu, piemēram, ūdensapgādes, bioloģiskās daudzveidības nodrošināšanā un oglekļa piesaistīšanā. Lopbarības augi ir zālāju svarīgākā sastāvdaļa (Bartolini et al. 2006; Ravagnani et al. 2012).

Trifolium repens ir svarīga loma kultivētās ganībās pateicoties tā ražībai un kvalitātei lopbarības iegūšanā. Augs spēj ātri un plaši izplatīties, kas ir viena no svarīgākajām īpašībām lopbarības augu izvēlē. Lai attīstītu labāku *Trifolium repens* šķirni, ir vajadzība raksturot tā ģenētisko populāciju dažādību. Suga ir plaši izplatīta pilsētu apstādījumos, vietās, ar augstu vides piesārņojuma līmeni, tāpēc tā ir viena no piemērotākajām, ko izmantot pētījumos par sugas adaptāciju vides faktoru maiņas ietekmē (Zhu et al. 1996; Mather 2000; Bartolini et al. 2006; Zhang et al. 2007; Williams 2014).

Bakalaura darba mērķis ir salīdzināt ložņu āboliņa (*Trifolium repens* L.) Karpatu kalnu savvaļas populāciju un Latvijas šķirnes "Daile" materiālu daudzveidību un retrotranspozonu kustību pēc UV gaismas stresora ietekmes, ierosinot ģenētiskās izmaiņas. Mērķa sasniegšanai ir izvirzīti šādi uzdevumi:

1. Iestādīt *in vitro* kultūrā *Trifolium repens* sēklas no Slovākijas gēnu bankas un Latvijas šķirnes "Daile".
2. Iestādītos stādus sadalīt divās vienādās daļās, vienu no tām apstrādājot ar UV-B starojumu, bet otru audzējot bez apstarošanas ar UV-B starojumu - kontrolei.
3. No iegūtajiem augiem izdalīt DNS un veikt iPBS analīzi.
4. Veikt DNS izdalīšanu un iPBS analīzi ievāktajiem materiāliem no *Trifolium repens* savvaļas populācijas Ukrainā.
5. Veikt klastera analīzi, lai novērtētu ģenētisko daudzveidību starp bakalaura darbā analizētajām populācijām.
6. Veikt analīzi UV-B starojuma ietekmei.

Bakalaura darba izvirzītā hipotēze: starp Latvijas un augstkalnu apgabalu genotipiem ir būtiskas atšķirības.

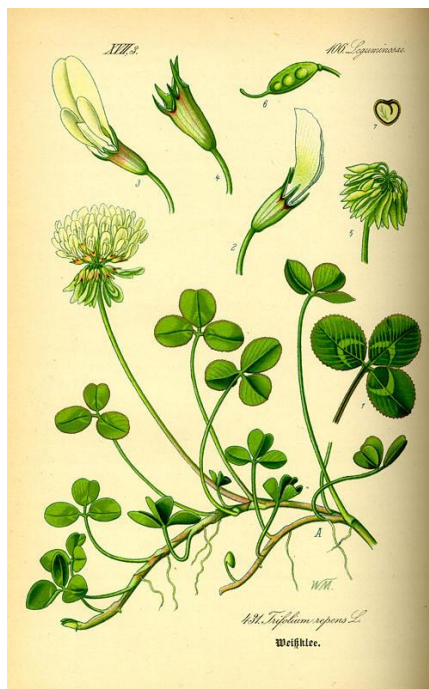
1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. *Trifolium repens* apraksts

1.1.1. *Trifolium repens* morfoloģiskais un ģenētiskais apraksts, sistemātika

Ložņu āboliņš *Trifolium repens* L. (syn. *Amoria repens* (L.) C.Presl) ir tauriņziežu (*Leguminosae*; syn. *Papilionaceae*; syn. *Fabaceae*) dzimtas augs. Tā ir viena no lielākajām augu dzimtām. Ir zināmas 17600-18200 sugas. Tauriņziežu dzimtā ir daudz vērtīgu lopbarības un pārtikas augu. Latvijā savvaļā ir zināmas 105 sugas (Bumbure u.c. 1957; Allen and Allen 1981).

Trifolium sp. ģints augi ir daudzgadīgi vai viengadīgi. Pasaulē ir zināmas 250 šīs ģints sugas, no kurām 10 ir lauksaimniecīgi nozīmīgas, piemēram, sarkanais āboliņš *Trifolium pratense* L., ložņu āboliņš *Trifolium repens* L., un zemeņu āboliņš *Trifolium fragiferum* L. Tiem ir vidēja lieluma taisns, ložņājošs vai pacils stumbrs. Retos gadījumos stumbra nav. Lapas sastāv no trijām lapiņām, ar lapas kātu saaugušām pielapēm. Augi ir svešapputes. Ziedi veidoti galviņās vai ķekaros. Retos gadījumos augļus neveido vidējie ziedi. Ziedi var būt balti, sarkani, brūni, dzelteni, rožaini. Vainaglapu nadziņi bieži ir saauguši. Ir deviņas putekšņlapas, kuras ir saaugušas stobriņā un viena – brīva. Sēdoša sēklotne. Ādaina pāksts. Sēklas no vienas līdz sešām katrā pākstī (Bumbure u.c. 1957; Ravagnani et al. 2012; Haerinasab et al. 2016).



1. attēls. *Trifolium repens* morfoloģija (Stueber 2007).

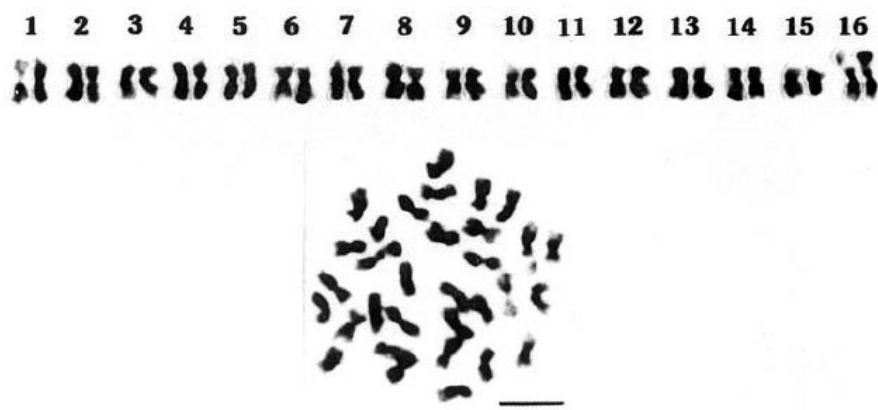
Figure 1. Morphology of *Trifolium repens* (Stueber 2007).

Daudzgadīgā *Trifolium repens* stublājs un lapas ir kailas, stublājs ir guļošs. Lapas saliktas pa trīs – olveidīgas. Lapiņu maliņa ir ar sīkzobainu malu un jomu galā. Uz katras no lapiņām pamanāms gaišs sirpjveida plankums. Ziedi sakārtoti blīvā galviņā – viena katrā ziednesī. Ziednesim nav lapas. Mietveida sakne. Lielas, plati lancetiskas, plēvainas, nosmailotas, bālganas, ar violetām dzīslām pielapes. Ziedu kāti ir garāki par lapām (1. att.). Tie ir pūkaini. Vainaglapas var būt bālgani zeltainas, rožainas, zaļganas, bet lielākoties baltas. Noziedējušas vainaglapas ir rudā krāsā. Zied no maija līdz oktobrim (Bumbure u.c. 1957; Zhang et al. 2007; Priedītis 2014).

No ekoloģijas viedokļa *Trifolium repens* ir selektīvs attiecībā pret citiem augiem savā platībā, tomēr dažos avotos aprakstīts, ka tas meklē "kaimiņus". Tomēr šī suga relatīvi ar citām nav īpaši dominējoša savā augšanas platībā (Jari 1997).

Sugas vairojas gan klonāli, gan ar sēklām, gan ar apputeksnētāju - *Bombus sp.* un *Apis mellifera* L. līdzdalību. Augam ir ložņājošs stublājs, kas ļauj tam plaši izplatīties. Liela loma sēklu izplatībai ir arī putniem, zālēdājiem un vējam. Kā jau tauriņziežu dzimtas augs, *Trifolium repens* dzīvo simbiozē ar slāpekli fiksējošām baktērijām (Hargreaves et al. 2009; Williams 2014).

Trifolium repens ir 16 pāri hromosomu (2. att.). Augs ir tetraploīds – dubults diploīds ($2n=4x=32$). Tam ir 1C genoms ar garumu 956 Mbp un kopējo lokusu skaitu ap 1200 cM. Ir atklāti divi *Trifolium repens* diploīdie priekšteči – *Trifolium occidentale* Schreb. un *Trifolium pallescens* Schreb. *Trifolium repens* ir dabā ģenētiski izolēta suga, bet ir konstatēti 11 citi taksoni - hibrīdi. Šie hibrīdi var tikt hibrīdizēti arī mākslīgi, sniedzot iespēju veidot klimatiskajiem apstākļiem elastīgākas *Trifolium repens* sugas. Tā kā *Trifolium repens* ir augs, kuram patīk mitra, auglīga augsne, šīs sugas starpsugu hibrīdu veidošanā ir liels potenciāls, lai izveidotu šķirnes ar labākām īpašībām, kas spētu pielāgoties neauglīgām, sausām augsnēm daudzās pasaules vietās (Zhu et al. 1996; Zhang et al. 2007; Ravagnani et al. 2012; Williams 2014).

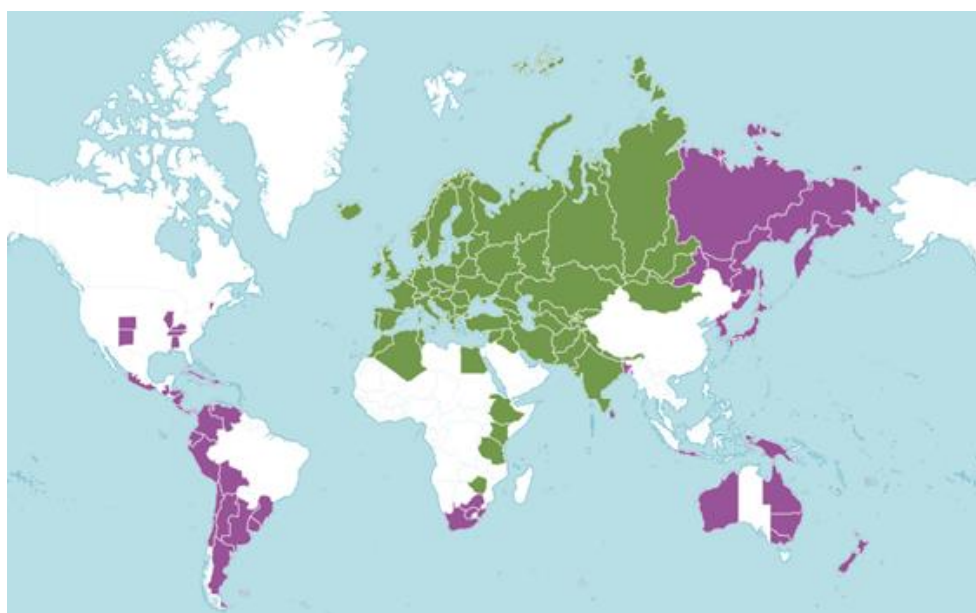


2. attēls. *Trifolium repens* hromosomas (Zhu et al. 1996).

Figure 2. Chromosomes of *Trifolium repens* (Zhu et al. 1996).

1.1.2. *Trifolium repens* izplatība Latvijā un pasaulē

Trifolium repens ir raksturīgs temperātajai zonai Eiropā, Āzijā un Vidusjūrā. Sugas plašā izplatība nosaka sugas daudzveidību. Augs ir kosmopolītisks, tam ir vairākas pasugas (3. att.). Šo sugu sāka kultivēt jau 1930-to gadu sākumā. Mūsdienās Jaunzēlande ir lielākais reģions, kur iegūst *Trifolium repens* sēklas pārdošanai visā pasaulē (50-55% no visām saražotajām šīs sugas sēklām) (Mather 2000; Zhang 2007; Hargreaves et al. 2009; Priedītis 2014).



3. attēls. *Trifolium repens* izplatība pasaulē (zaļš – dabiskais areāls, violets – cilvēka inducēta izplatība) (Anonīms 2015).

Figure 3. *Trifolium repens* distribution in the world (green – native distribution, purple – introduced) (Anonymous 2015).

1.1.3. *Trifolium repens* augšanas apstākļu raksturojums

Trifolium repens augšanai ir optimāla mitra un auglīga augsne. Vasarā ganībās augoši augi ir pakļauti augstam ultravioletajam-B (UV-B) starojumam. UV-B viļņu garuma diapazons ir no 280 nm līdz 320 nm. Ozona noārdīšanās stratosfērā un daudzi citi antropogēni un biotiskie faktori pēdējo gadu laikā palielināja ultravioletā-B starojuma intensitāti. UV-B starojums augos var radīt gan tiešus bojājumus, gan ietekmēt auga bioķīmiskos procesus, kas piedalās auga regulācijā. UV-B starojums var būtiski ietekmēt auga morfoloģiju, piemēram, tieksmi veidot mazākas lapas. Augiem pēc UV-B starojuma ietekmes ir novērojama samazināta lapu masa. UV starojums, iedarbojoties uz nukleīnskābēm, var radīt ne tikai letālus efektus, bet arī ģenētiskās izmaiņas - mutācijas. UV starojuma mutāciju ātruma palielināšanās augos ir labi dokumentēta. (Lacis 1973; Jansen 1998; Hofmann and Campbell 2012; Williams 2014).

1.2. *In vitro* kultūras

Augu augšana un attīstība *in vitro* kultūrā ir atkarīga no vairākiem faktoriem: ģenētiskā algoritma, barības vielām – mikro un makro elementiem, cukuriem, fizikāla rakstura augšanas faktoriem – gaismas, temperatūras, pH, skābekļa un oglekļa dioksīda koncentrācijas, kā arī dažādām organiskās izcelsmes vielām – regulatoriem, vitamīniem. No ģenētiskā algoritma ir atkarīgs, piemēram, kāda temperatūra ir vajadzīga optimālai augšanai un attīstībai. Šo algoritmu nosaka arī fizikālie un ķīmiskie apstākļi. Ir zināms, ka bez barības vielām un ūdens augi nespēs pilnvērtīgi attīstīties ne *in vitro*, ne *in vivo*. Cukuri ir vajadzīgi, jo ne visas auga daļas ir pilnīgi autotrofas. Fizikālie faktori ir nepieciešami ne tikai *in vitro*, bet arī *in vivo*, jo regulē ūdens uzņemšanu un transpirāciju, fotosintēzi, augšanu un vairošanos. Dažādi regulatori un vitamīni ir vajadzīgi mazās koncentrācijās, jo tie sekmē optimālu šūnu dalīšanos (Fay 1994; Pierik 1997).

Darba veikšanā ļoti liela loma ir sterilitātes ievērošanai. Svarīgākais solis augu audu kultūras audzēšanā ir asepsija – atbrīvošanās no visiem traucējošiem mikroorganismiem. Darbu parasti veic laminārboksā. Tajā regulāri tiek veikta filtrēta gaisa plūsma virzienā pret veicēju. Virsmas regulāri procesa laikā jātīra ar 96% spirtu (70% neder, jo tiek atstāti smalki ūdens pilieni, kas mēdz radīt nesterilus apstākļus). Virsmu slaucīšanai ir jāizmanto drāna, kas pēc sevis neatstāj pārpalikumus, piemēram, šķiedru gabaliņus (Pierik 1997; Chawla 2003).

Priekšmetu un vielu sterilizēšanai visbiežāk izmanto autoklāvu. Autoklāvs ir relatīvi dārga iekārta, kurā ar spiediena un augstās temperatūras palīdzību tiek iznīcināti visi mikroorganismi, tomēr tie netiek aizvākti. Autoklāvā temperatūra parasti ir 115°- 135°. Autoklāvēšanas mīnusi ir tādi, ka tiek izmainīts vielas vai šķīduma pH, kā arī dažas vielas un

reaģenti var zaudēt savu aktivitāti. Šķīdumu sterilizēšanu var veikt filtrējot ar filtrsterilizatoru, kad caur filtra porām cauri neizlaiž mikroorganismus un vīrusus. Šī metode ir veiksmīga reaģentiem un vielām, kas nav karstumizturīgas. Plastikas priekšmetus, kurus nav iespējams nosterilizēt ar autoklāvēšanu parasti iepērk jau sterilos iepakojumos. Šie priekšmeti tiek sterilizēti ar gamma stariem (Fay 1994; Pierik 1997).

1.3. Molekulāro marķieru sistēmas

Ģenētiskie marķieri tiek klasificēti četrās kategorijās - morfoloģiskie marķieri, citoloģiskie marķieri, proteīnu/izozīmu marķieri un DNS marķieri. Ģenētiskos marķierus augu ģenētiskās dažādības raksturošanai un kultūru šķirņu uzlabošanai izmanto jau sen. DNS marķieru sistēmas 1980. gados krasi uzlabojās, kas deva iespēju veikt jaunus kultūraugu pētījumus, tādējādi veidot augstvērtīgas šķirnes ar vēlamajiem gēniem vai gēnu kombinācijām. DNS marķieri tiek uzskatīti par labāku metodi par tradicionālo morfoloģiju un uz proteīniem balstītiem marķieriem, jo tie ir neitrāli, uzticami, bagātīgā skaitā, ērti, automatizēti un cenas ziņā relatīvi lēti. Gadu laikā DNS marķieru tehnoloģija visvairāk tiek balstīta uz PCR (polimerāžu ķēdes reakciju). Molekulārie marķieri ir būtiski augu un dzīvnieku selekcijas un bioloģiskās daudzveidības pētījumos. Ir izstrādātas vairākas metodes, kas balstītas uz DNS reģiona amplifikācijas principu (Chawla 2003; Kalendar et al. 2010; Bahadur et al. 2015).

Molekulāro marķieru sistēmas ir daudz un dažādas. Piemēram, RAPD (random amplified polymorphic DNA) marķieru analīze ir viena no molekulāro marķieru metodēm, kas balstīta uz PCR. Tā ir relatīvi vienkāršākā molekulāro marķieru sistēma. Šajā metodē atlasa vienu īsu oligonukleotīdu (dekameru) jeb praimeru, kurš piestiprinās DNS fragmentiem, kuri ir nejauši sadalīti visā genomā. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) marķieru metode balstās uz nukleīnskābes hibridizācijas metodi. Polimorfisma pamatā ir mutācija, kas robežojas vietās vai starp tām, kas rada atšķirības fragmentētajos produktos. RFLP marķieri ir konkrētu lokusu specifiski un lielākoties kodominanti un ar augstu reprodukcijas līmeni. Tā ir stabila marķieru sistēma dažādu sugu sintēzes analīzēm. Šai metodei nav nepieciešamība pēc sarežģītām iekārtām, tomēr ir nepieciešams liels daudzums ļoti kvalitatīva DNS un īpaši labas tehniskās ierīces (Chawla 2003; Bahadur et al. 2015).

Mikrosatelīti (sample sequence repeats (SSRs)) ir tandēmiski sakārtoti 1-6 nukleotīdu atkārtojumi ar dažādiem atkārtojuma motīvu garumiem (A, T, AT, GA, AGG, AAAC). Motīvu atkārtotības numurs ir apzīmēts ar n. AT₉, piemēram, nozīmē, ka AT nukleotīds ir tandēmi sakārtots viens pēc otra deviņas reizes. Konkrētas sugas genomā, kad šī atkārtotība ir konstatēta gēnā, tā veido mikrosatelītu. DNS sekvences, kas robežojas ar mikrosatelītu ir

unikālas un ir dokumentētas. Šīs sekvences ir izmantotas PCR, lai veidotu primerus noteiktam mikrosatelītu lokusam. Šai metodei ir nepieciešams neliels DNS daudzums un to var viegli automatizēt. Mikrosatelīti ir plaši izplatīti augu un dzīvnieku gēnos, kuriem ir augsts ģenētiskās variācijas līmenis, pamatojoties uz tendēmiski atkārtājamo vienību dažādību lokusā. Mikrosatelīti kā marķieri ir kodominanti dabā. Augu genomu analīzē šo metodi izmanto plaši. Šie marķieri ir ar augstu reproduktivitāti starp vienas sugas populācijām un daudzos gadījumos arī starp sugām un ģintīm (Chawla 2003; Zhang 2007; Bahadur et al. 2015).

Transpozonus 1940. gados atklāja ievērojama citoģenētiķe Barbara McClintock, pētot parasto kukurūzu (*Zea mays* L.), par ko 1983. gadā saņēma Nobela prēmiju. Agrāk šie elementi tika uzskatīti par parazitiskām, nevajadzīgām DNS struktūrām. Transpozoni jeb transpozīcijas elementi ir mobilas ģenētiskās vienības ar daudzveidīgu struktūru un transpozīcijas mehānismiem. Transpozoni aizņem lielu daļu no eukariotu genoma un to kustība un uzkrāšanās ir galvenais veids, kas veido gēnu un genomu struktūru gandrīz visiem organismiem. Tiem ir divi veidi - retrotranspozoni un DNS transpozoni. Retrotranspozoni ir sastopami visbiežāk. Transpozoniem ir svarīga loma molekulārajās analīzēs, jo tie spēj reaģēt uz vides izmaiņām (Feschotte and Pritham 2007; Bui and Grandbastien 2012; Hoen and Bureau 2012; Pelissier and Mathieu 2012; Casacuberta and Gonzalez 2013; Alzohairy 2016).

Dažādiem organismiem atšķiras genoma lielums. Ja ir evolucionāri sarežģītāka suga, tas vēl nenozīmē, ka genoma lielumam jābūt lielākam par evolucionāri zemāku taksonu. Šī atšķirība starp organisma sarežģītību, kas tiek izteikta gēnu skaita un izmēra variācijā, tiek saukta par "C-vērtības paradoksu". Daudzās monofilētiskās taksonomiskajās grupās ir novērots paradokss - genoma izmēri parasti atšķiras ļoti maz. Piemēram, zīdītājiem, kas dzīvoja 70-113 miljonu gadu atpakaļ ir ļoti līdzīga garuma genoms ap 3000 Mbp. Rāpuļu, tajā skaitā putnu, kas attīstījās 240 miljonu gadu atpakaļ, ir tikai 1000-2000 Mbp. Sēnēm tikai 200 Mbp, kaut arī tās ir attīstījušās 700-1200 miljonu gadu atpakaļ. Atšķirībā no iepriekšminēto taksonu genomiem, augu genomi rāda specifiski lielu izmēru dažādību pat ļoti tuvradniecīgām sugām (Schulman and Wicker 2013).

Ar DNS sekvenēšanas palīdzību kļuva skaidrs, ka lielāko eukariotu genomu daļu neveido tikai proteīnus kodējoši gēni, bet gan dažādi atkārtojumu elementi, piemēram, transpozoni. Lielos genomos, piemēram, kukurūzas *Zea mays* L., tie veido vairāk nekā 80% no genoma lieluma. Dažiem taksoniem šo elementu ir tikai pāris, kamēr citiem to ir simtiem. Genomikas un ģenētiskie pētījumi sniedz labāku izpratni par transpozonu funkcionalitāti epiģenētikā, kur

tie “apslāpē” konkrētu šūnu tipu funkcijas un attīstības posmus sugas evolūcijā (Kalendar et al. 2010; Pelissier and Mathieu 2012; Schulman and Wicker 2013).

1.3.1. Retrotranspozoni kā viens no molekulāro marķieru veidiem

Retrotranspozoni (RT) ir galvenās sastāvdaļas lielākajai daļai eukariotu genomu. Tie ir izklidēti visā genomā un to pārpilnība korelē ar saimniekorganisma genoma lielumu. “Kopēšanas – ielīmēšanas” princips sastāv no trim molekulārajiem soļiem. Pirmais - RNS kopijas transkripcija no genoma retrotranspozoniem, otrais - reversā transkripcija uz cDNS, trešais - reintegrācija jaunā genoma lokusā. Ir vairāki pētījumi, kas pierāda, ka retrotranspozoni aktivējas, kad augs ir kāda stresora ietekmē (Kalendar et al. 2010; Bui and Grandbastien 2012; Alzohairy 2016).

Ievietošanas mērķa vieta ir relatīvi nejauša un neatkarīga. Tā atšķiras atkarībā no auga taksona, tomēr daži retrotranspozoni veido kopas vai arī tiem ir tendence apvienoties ap hromosomu centromērām vai telomērām (Alzohairy 2016).

Ir divas retrotranspozonu grupas atkarībā no garo sekvenču atkārtojumu (LTR) esamības vai neesamības. Pirmā grupa ir garo sekvenču atkārtojumu retrotranspozoni (LTR-RT) un īso sekvenču atkārtojumu retrotranspozoni (non-LTR-RT). LTR retrotranspozoni augos ir aktīvāki un to ir bagātīgākā daudzumā par otru retrotranspozonu grupu. Īso sekvenču retrotranspozoni ir atrodamī visos eukariotos, īpaši mugurkaulniekos un dažos sēņu taksonos, bet augos tie atrodamī daudz mazāk. Garo sekvenču atkārtojumu retrotranspozoni sastāv no divām galvenajām apakšgrupām – *Ty1-copia* (ar augstu kopiju numuru) un *Ty3-gypsy* (ar augstu transponēšanas aktivitāti) retrotranspozoni. Gan *Ty1-copia*, gan *Ty3-gypsy* LTR-RT satur regulējošas gēnu sekvences, piemēram CAAT boksu (piemēram, CCATT), TATA boksu (piemēram, TGGCTATAAATAG), transkripcijas sākumu (piemēram, CCCATGG), poliadenilācijas signālu (piemēram, AATAAG) un poliadenilācijas sākumu (piemēram, TAGT). Šie visi domēti ir svarīgi un nepieciešami retrotranspozonu replikācijai un integrācijai. LTR-RT garais iekšējais domēns (*Gag-Pol region*) kodē strukturālos proteīnus no vīrusveidīgajām daļiņām, kuras iekapsulē retrotranspozona RNS kopiju un enzīmus - reverso transkriptāzi un integrāzi (9. piel.). Hromosomu rekombinācijas procesā meiotiskās profāzes laikā retrotranspozoni zaudē savu aktivitāti. Rezultātā veidojas, piemēram, LARD (lieli retrotranspozonu atvasinājumi), TRIM (mazi sekvenču atkārtojumu retrotranspozoni) un patstāvīgie-LTR (sekvencē ir 5' un 3' LTR) (Webdel et al. 2012; Schulman and Wicker 2013; Schulman 2015; Bahadur et al. 2015; Alzohairy 2016).

Ir vairāki veidi uz PCR balstīto LTR-RT “svītrkodēšanas” (angļu valodā – *barcoding*) metodēm - RBIP (uz retrotranspozoniem balstīts ievietošanas polimorfisms), IRAP (starp retrotranspozoniem paplašinātais polimorfisms), iPBS (starp praimeriem saistošā sekvenca), REMAP (retrotranspozona-mikrosatelīta paplašinātais polimorfisms) un SSAP (sekvencai specifisks paplašinātais polimorfisms) (10. piel.). Retrotranspozonu veidu struktūra un kopiju skaits ir atkarīgs no saimniekorganisma genoma evolūcijas vēstures. Retrotranspozoni tiek pētīti visās ģenētikas pētījumu jomās un genomikā organismu taksonu noteikšanā. Lai noteiktu retrotranspozonu polimorfismu, tiek pielietotas marķieru sistēmas, kas balstītas uz sekvenču amplificēšanu starp retrotranspozona sekvenču galiem, piemēram, garo sekvenču atkārtojumu retrotranspozonu (LTR) un blakus esošās genoma DNS (Kalendar 2010; Alzohairy 2016).

1.3.2. iPBS metode

iPBS metodi bieži lieto, lai parādītu retrotranspozonu polimorfismu. Nepieciešamība pēc sekvenču informācijas ir priekšnosacījums, lai veidotu LTR-RT balstītus molekulāros “svītrkodus”. iPBS mēdz pārvarēt šo problēmu. Praimeru saistošā sekvenca (PBS) LTR reģionam ir daļa no iekšējā retrotranspozona domēna, kurš ir ļoti konservatīvs reģions priekš dubultošanās ar tRNA, notiekot atpakaļejošai transkripcijai retrotranspozona dzīves ciklā. PCR pastiprināšana notiek starp diviem iestarpinātiem PBS no blakus esošiem LTR-RT. Metode ir balstīta uz praktiski universāla tRNA komplementa klātbūtni kā reversās transkriptāzes saistīšanās vieta (PBS) LTR retrotranspozonos. Šī metode der gan *Gypsy*, gan *Copia* LTR retrotranspozoniem, kā arī LARD un TRIM elementiem visos augu un dzīvnieku valsts sugu genomos. Šī metode izrādījusi veiksmīga DNS analīzēm bez nepieciešamības zināt sekvenču secību. Tā kā augu LTR-RT ir bieži iestarpināti, miksēti, apgriezti vai atdalīti genomā, LTR-RT var būt viegli pastiprināti, izmantojot konservatīvus iPBS primerus. iPBS sekvenču var arī lietot, lai noteiktu citus retrotranspozonus, kad retrotranspozonu blīvums genomā ir augsts. Retrotranspozonu kustības un rekombinācijas var tikt novērotas, jo jaunie ievietojumi vai rekombinācijas būs polimorfas, kas parādīsies tikai augu līnijās, kurās notika ievietošanās vai rekombinācija (Kalendar et al. 2010; Alzohairy 2016).

1.4. Polimerāzes ķēdes reakcija (PCR)

DNS fragmenti var tik pavairoti jeb amplificēti vairākkārtīgi izmantojot PCR jeb polimerāzes ķēdes reakciju. PCR pamatojas uz daļēji konservatīvajām DNS replikācijām, ko prokariotu un eikariotu šūnās veic DNS polimerāzes. Polimerāzes ķēdes reakcijas rezultāts ir pavairots izvēlētais DNS fragments. Jābūt zināmām DNS fragmenta robežām. PCR izšķir 3 posmus: denaturācija, pievienošana, sintēze. Pirmajā posmā notiek dubultspirāles denaturācija

pie 94°C. Otrajā posmā īsi vienpavediena DNS fragmenti jeb praimeri pievienojas denaturētajai vienpavediena DNS 35°-65°C atkarībā no izvēlēta praimera. Trešajā posmā pie DNS un praimera kompleksa pievienojas polimerāze, kura pie 72°C veic DNS sintēzi, kas ir identiska izejas sekvencai. Šāda veida ciklus atkārto vairākkārtīgi, tādējādi jaunizveidotās dubultspirāles tiek pavairotas vēlreiz un vēlreiz. Ciklu daudzums tiek izvēlēts pēc metodes vajadzības (Newton et al. 1999; Chawla 2003).

1.5. Gela elektroforēze

Elektroforēze agarozes gelā ir standartmetode DNS un RNS fragmentu atdalīšanai, identificēšanai un attīrīšanai. Gela elektroforēze ir ātrākā un vienkāršākā metode DNS dažāda garuma fragmentu atdalīšanai, kurus nevar atdalīt ar citām metodēm, kā, piemēram, blīvuma gradienta centrifugēšanu (density gradient centrifugation). Turklāt, DNS fragmentu atrašanās vietu gelā var noteikt tieši, krāsojot ar zemas koncentrācijas fluorescējošu etīdija bromīdu. Atrašanās vietas var labi redzēt zem ultravioletās gaismas. Ja ir nepieciešamība, DNS fragmentu joslas var izolēt no gela un izmantot tālākiem pētījumiem (Ong and Mink 1989; Chawla 2003).

Agarozes ir lineārs polimērs, ko iegūst no jūras aļģēm. Komerciāli pieejamā agarozes nav pilnīgi tīra, jo tai ir dažādi piemaisījumi kā polisaharīdi, proteīni un sāļi. Agarozes ar piemaisījumiem var ietekmēt DNS fragmentu migrāciju un DNS var tikt izmantots kā substrāts fermentu reakcijās. Agarozes tiek izšķīdināta buferī un izkausēta, līdz tiek iegūts dzidrs, caurspīdīgs šķīdums. Izkausētais šķīdums tiek ieliets veidnē, kas var būt dažādas formas, porainības (4-10%) un izmēra. Veidne ar šķīdumu tiek atstāta sacietēšanai. Pēc sacietēšanas veidojas matrica, kuras blīvumu nosaka agarozes koncentrācija. Ja gelam tiek pieslēgta elektriskā strāva, DNS, kas ir negatīvi uzlādēta, migrē uz anodu. Ir pieejami vairāki buferi, piemēram, TAE (Tris-acetāts), TBE (Tris-borāts), TPE (Tris-fosfāts) un sārmu buferi ar pH diapozonu 7,5-7,8. Elektroforēzi parasti veic istabas temperatūrā. Gels vēlāk tiek iekrāsots ar fluorescējošo etīdija bromīdu un zem ultravioletās gaismas ir iespēja gelu nofotografēt ar digitālo kameru (Ong and Mink 1989; Chawla 2003).

1.6. Plūsmas citometrija

Plūsmas citometriju (FCM) augu izpētē plaši sāka izmantot 1973. gadā. Maza, moderna un cenas ziņā relatīvi lēta iekārta kā plūsmas citometrs ir daudzparametru rīks, kurš, mērot fluorescenci un gaismas izkliedi, spēj viegli un ātri veikt dzīvu vai žāvētu augu paraugu augstas precizitātes genoma lieluma un endoploīdijas mērījumus. Tas ir noderīgs rīks šūnu ciklu pētījumos. FCM paraugam jābūt šķidrās suspensijas veidā. Strādājot ar augiem rodas problēmas ar to šūnu ķīmisko sastāvu, jo šūnas rada plašu sekundāro metabolītu klāstu un var ietekmēt

noteiktu šūnu sastāvdaļu iekrāsošanu, kā arī tiem var piemīt autofluorescence. Ja nav nepieciešama analīze šūnu līmenī, interesejošās mērķa organellas tiek atsevišķi izolētas un apstrādātas (Shapiro 2005; Doležel et al. 2007).

Fluorescence ir visizplatītākais optiskais parametrs (FCM). Tā ir fizikāla pārādība, kurā organiska vai neorganiska viela absorbē noteiktas krāsas (noteikta viļņu garuma un enerģijas) gaismu un izstaro citas krāsas gaismu ar zemāku enerģiju un tādējādi garāku viļņa garumu. Krāsu molekulas, kas spēj veikt šādu gaismas (enerģijas) konversiju tiek sauktas par fluorohromiem. Fluorohromu skaits turpina pieaugt. Tos var iedalīt trijās grupās: nukleīnskābju krāsvielas (DAPI, *Hoechst* krāsvielas, propīdija jodīds), olbaltumvielu krāsvielas (Teksasas sarkanais, fluoresceīns, alofikocianīns), funkcionālās zondes priekš šūnu aktivitātes *in situ* monitoringa (oksonols, cianīns). Ir svarīgi, lai atšķirība tiktu absorbēta un izstarotie gaismas viļņa garumi (Stoksa pāreja) ir pietiekami, lai tos ar optisko filtru palīdzību varētu atdalīt (Shapiro 2005; Doležel et al. 2007).

Fluorescējošo signālu noteikšana no krāsotām daļiņām šķidrā suspensijā ir iespējama divu mehānismu dēļ. Pirmais ir saistīts ar fluorohroma uzkrāšanos iekrāsotajā reģionā, kas kontrastē krāsvielu koncentrācijā starp mērķi un fonu, bet otrs ir kvantu efektivitātes palielinājums (attiecība starp emitēto un absorbēto fotonu skaitu), ja fluorohroma molekula atrodas konkrētā vidē. Piemēram, propīdija jodīda un DAPI kvantu efektivitāte palielinās par no 30 līdz 100 reizēm pēc saistīšanās ar nukleīnskābi salīdzinot ar ūdens šķīdumu (Shapiro 2005; Doležel et al. 2007).

2. MATERIĀLI UN METODES

2.1. Materiāli

Bakalaura darbs tika izstrādāts Latvijas Universitātes Bioloģijas institūtā no 2018. gada 12. septembra līdz 2019. gada 26. maijam. Darbā izmantotie palīgmateriāli, programmatūras, iekārtas, vielas un reaģenti ir apkopoti pielikumā (3., 4., 5., 6., piel.).

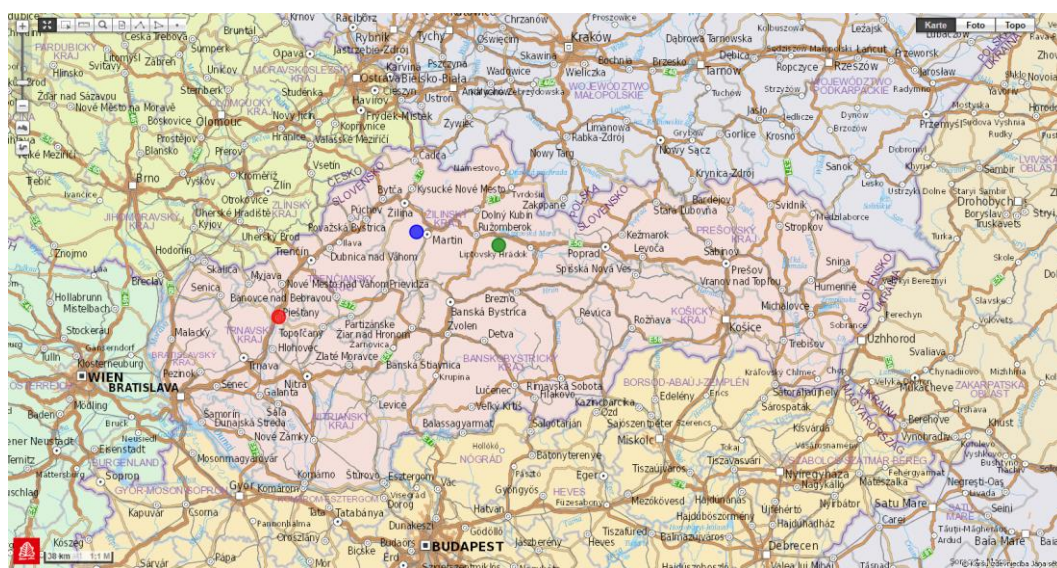
2.1.1. Taksonu nosaukumu nomenklatūra

Bakalaura darbā augu taksonu nomenklatūra ir pēc Latvijas vaskulāro augu floras taksonu saraksta (Gavrilova, Šulcs 1999). Augu taksonu nosaukumi latviešu valodā ir pēc grāmatas „Latvijas augi” (Priedītis 2014).

2.2. Metodes

2.2.1. Paraugu iegūšana

Darbā izmantoti savvaļā ievāktu sēkļu otrā paudze no Slovākijas Kultūraugu sēkļu gēnu bankas (Gene Bank of the Slovak Republic) kolekcijas (4. att.) un Ukrainā (Jaremče) ievāktie lapu paraugi, kā arī Latvijas komercšķirnes “Daile” mazumtirdzniecībā pieejamais sēkļu materiāls.



4. attēls. Izmantotie *Trifolium repens* genotipi no Slovākijas Kultūraugu sēkļu gēnu bankas (sarkans – Pještjani, zils – Bystrička, zaļš – Dubrava) (Valsts zemes dienests 2012).

Figure 4. Used *Trifolium repens* genotypes from Gene Bank of the Slovak Republik (red – Pještjani, blue – Bystrička, green – Dubrava) (Valsts zemes dienests 2012).

2.2.2. Sēklu sterilizēšana un diedzēšana

Sēklu sterilizēšana tika veikta pēc (Chawla 2003) metodes, to modificējot. Process tika veikts laminārboksā sterilos apstākļos. Sēklas tika iesietas vieglā neilona materiālā. Tās uz 30 minūtēm tika ievietotas vārglāzē ar kālija permanganātu (KMnO₄ 0,7% šķīdumu ūdenī). Pēc šī soļa sēklas tika četras reizes skalotas ar autoklāvētu dejonizētu ūdeni. Tad 30 minūtes tika mērcētas vārglāzē ar neatšķaidītu balinātāju. Vēlreiz skalotas ar autoklāvētu dejonizētu ūdeni.

2.2.3. Sēklu audzēšana *in vitro*

Sēklas no Slovērijas Kultūraugu sēklu gēnu bankas un Latvijas komercšķirnes “Daile” tika iesētas *in vitro* kultūrā 18.01.2019. L2 barotnē dīgsti tika pārsēti pēc mēneša 18.02.2019.

L2 Barotne tika izvēlēta, pamatojoties uz *Trifolium pratense* audzēšanu *in vitro* kultūrā (Taylor and Quesenberry 1996), jo detalizēti *in vitro* pētījumi ar *Trifolium repens* netika atrasti (konkrēti – tā audzēšanas barotņu sastāvs). Izmantotajā avotā L2 barotne tika specializēti modificēta priekš *Trifolium pratense*, balstoties uz pētījumiem no 125 tās sugas variācijām. Salīdzinot ar citām barotnēm, piemēram, MS vai B5, šī satur vairāk Ca, Mg, K un P. Mikroelementu daudzums arī ir augstāks. *Trifolium pratense* ir vistuvāk radniecīga suga *Trifolium repens* (Zhang 2007), tāpēc tika izvēlēta tieši šī barotne (7. piel.). Barotne tika pagatavota nestirilos apstākļos, pēc pagatavošanas tā tika autoklāvēta.

Pārstādīšana tika veikta laminārboksā – sterilos apstākļos. Pirms laminārboksa lietošanas tas tika sagatavots, visus tajā esošos priekšmetus apstarojot ar UV gaismu, tādējādi iznīcinot visus mikroorganismus, kas varētu ietekmēt rezultātus, radot infekciju barotnē. Laminārboksā izmantotās metāla pincetes un skalpeļi tika sterilizēti ar lodīšu sterilizatoru ik pēc 3-5 augu apstrādes. Ķermenis ik pēc 10-15 minūšu darba tika sterilizēts ar 96% spirtu.

2.2.4. DNS izdalīšana

DNS izdalīšanai tikai izmantots modificēts CTAB DNS izdalīšanas protokols (Doyle and Doyle 1987) (2. piel.).

2.2.5. PCR reakcijas

PCR praimeru tika izvēlēti pamatojoties uz (Avotiņš 2017), lai būtu iespēja turpināt pētījumu, sekojoši – iPBS 2076 (5'-GCTCCGATGCCA-3') un iPBS 2079 (5'-AGGTGGCGCCA-3').

PCR tika izmantoti 30 cikli. Denaturācijai tika izmantota 95,0° temperatūra, praimeru pievienošanai 50,1°C temperatūra un DNS polimerāzes darbībai, sintēzei 68,0°C un 72°C

temperatūra. Uzglabāšanas temperatūra bija 4,0°C. Praimeru pievienošanās temperatūra tika izvēlēta pēc literatūras avota (Kalendar et al. 2010).

2.2.6. Gela elektroforēze

Tika veidots ~6-7 mm biezs gels. Gela matricas izmērs bija 20x20 cm. Uz šo tilpumu tika izmantots 240 ml 1xTAE bufera un 4,08 g 1,7% agarozes (1. piel.). Šķīdums tika kausēts mikroviļņu krāsnī līdz pilnīgi caurspīdīgai konsistencei. Pēc kausēšanas šķīdums tika atdzesēts ūdens vannā līdz 60°C. Tad iepildīts atbilstošā formā. Kabatiņu skaits, kas gelā veido bedrītes PCR produkta iepildīšanai bija 25.

Elektroforēzes vanna tika uzpildīta ar 1xTAE buferi. Pēc bufera iepildīšanas tika ievietots gels. Tika izveidota PCR produkta un krāsas maisījums – 25 µl PCR produkta un 5 µl krāsas. Bedrītēs tika iepildīts 20 µl produkta un krāsas maisījuma. Trijās bedrītēs tika ievietoti 5 µl garuma marķiera. Elektriskajā blokā PCR produktu analīzei tika iestatītas 18 stundas pie 40 V sprieguma.

Pēc 18 stundu gara procesa gels tika krāsots 40 min etīdija bromīda šķīdumā (5µg/l). Pēc krāsošanas gels tika skalots dejonizētā ūdenī 15 minūtes. DNS fragmenti tika vizualizēti un fiksēti ar digitālo fotokameru UV gaismas kamerā.

2.2.7. Plūsmas citometrija

Paraugu sagatavošanai tika izmantota viena, aptuveni vienāda izmēra *Trifolium repens* lapa (~0,5 cm²). Materiāls tika ievietots 2 ml stobriņā, kurā ievietota viena metāla lodīte. Vienu minūti ar 37 apgriezieniem sekundē paraugi tika smalcināti ar homogenizatoru. Paraugiem tika pievienots 1 ml bufera šķīduma un tad tas tika laists cauri sterilam filtram kodolu atdalīšanai plūsmas citometrijai paredzētajos stobriņos. Paraugam pievienoja 1 ml ekstrakcijas buferšķīduma. Tika ieturēts inkubācijas periods, kurš ilga divas minūtes. Izfiltrētajam paraugam pievienots 1 µl Rnāzes A, pēc kā tas tika samaisīts 10 sekundes, izmantojot vorteksu. Novorteksētajam paraugam pievienots 12 µl propīdija jodīda šķīdums, paraugs tika atkārtoti samaisīts 10 sekundes. Stobriņi tika ievietoti statīvā un ietīti folijā. Krāsošanas ilgums ilgst vismaz vienu stundu. Paraugi uzglabāti ledusskapī (+4°C).

Pirms darba ar plūsmas citometru, sertificēts speciālists veica tā kalibrāciju. Paraugu analizēšana tika veikta, izmantojot zilo lāzeru (488 nm).

3. REZULTĀTI

3.1. DNS izdalīšana

Bakalaura darba izstrādes laikā tika izdalīts DNS no 117 *Trifolium repens* izkaltētiem paraugiem, lai noteiktu ģenētisko daudzveidību. No Slovākijas tika apskatīti trīs dažādi genotipi (Pještjani, Bystrička un Dubrava), no Ukrainas viens (Jaremče) un no Latvijas tika apskatīta *Trifolium repens* šķirne “Daile”. No Pještjani tika izdalīti 36 paraugi, no Bystrička 11 paraugi, no Dubrava – 15 paraugi, no Jaremče – 16 paraugi, bet no Latvijas šķirnes “Daile” – 39 paraugi.

DNS tika izdalīta ar modificētu CTAB protokolu (Doyle and Doyle 1987) gan svaigiem paraugiem no Bystrička un Dubrava genotipiem, gan kaltētajiem paraugiem no Jaremče, Pještjani un “Daile”. No Jaremče un “Daile” paraugi tika izdalīti divas reizes – gan pirms, gan pēc apstarošanas ar UV-B starojumu, arī kontrolei.

3.2. UV-B starojuma ietekmes eksperiments

Pirms sēklu diedzēšanas *in vitro* kultūrā tās tika diedzētas Petri platē ar autoklāvētu ūdeni un filtrpapīru. Sēklām tika konstatēta zema dīgtspēja (1. tab.). *Trifolium repens* sēklas audzējot nestirilos apstākļos no 120 sēklām uzdīga 40 sēklas – 33%. Diedzējot *in vitro* sēklu dīgtspēja acīmredzami uzlabojās.

18.01.2019. sterilā Petri platē tika iesētas 400 sēklas no pieciem (80 no katra) Slovākijas genotipiem (agars 0,6%, pH 5,8). Pēc divām nedēļām (18.02.2019.) 160 dīgsti (10 katrā *in vitro* kultivācijas traukā) no četriem labāk izdīgušiem genotipiem tika pārstādītas L2 barotnē (~160 ml, pH 5,8). Pēc mēneša aklimatizācijas un augšanas L2 barotnē eksperimentam tika izvēlēts Pještjani genotips un Latvijas šķirne “Daile”. Divi *in vitro* kultivācijas trauki ar 20 īpatņiem (10 katrā) no Pještjani un divi *in vitro* kultivācijas trauki ar 20 īpatņiem “Daile” tika izmantoti apstarošanai ar UV-B starojumu, kā arī divi *in vitro* kultivācijas trauki ar 20 īpatņiem gan no Pještjani, gan “Daile” tika izmantoti kā kontrole.

Pirms apstarošanas no katra īpatņa tika paņemtas divas īstās lapas un ievietotas filtrpapīrā kaltēšanai noslēgtā plastikāta maisiņā ar silikagelu. Apstarošana ar UV-B starojumu tika veikta 5 dienas pēc kārtas vienu stundu vienā un tajā pašā laikā no 9:00 līdz 10:00. Vēlreiz tika ievāktas 2 jaunas īstās lapas gan apstarotajiem īpatņiem, gan kontroles variantam un ievietotas noslēgtā maisiņā ar silikagelu paraugu kaltēšanai.

Trifolium repens dīgtspēja nestirilos apstākļos.

Table 1

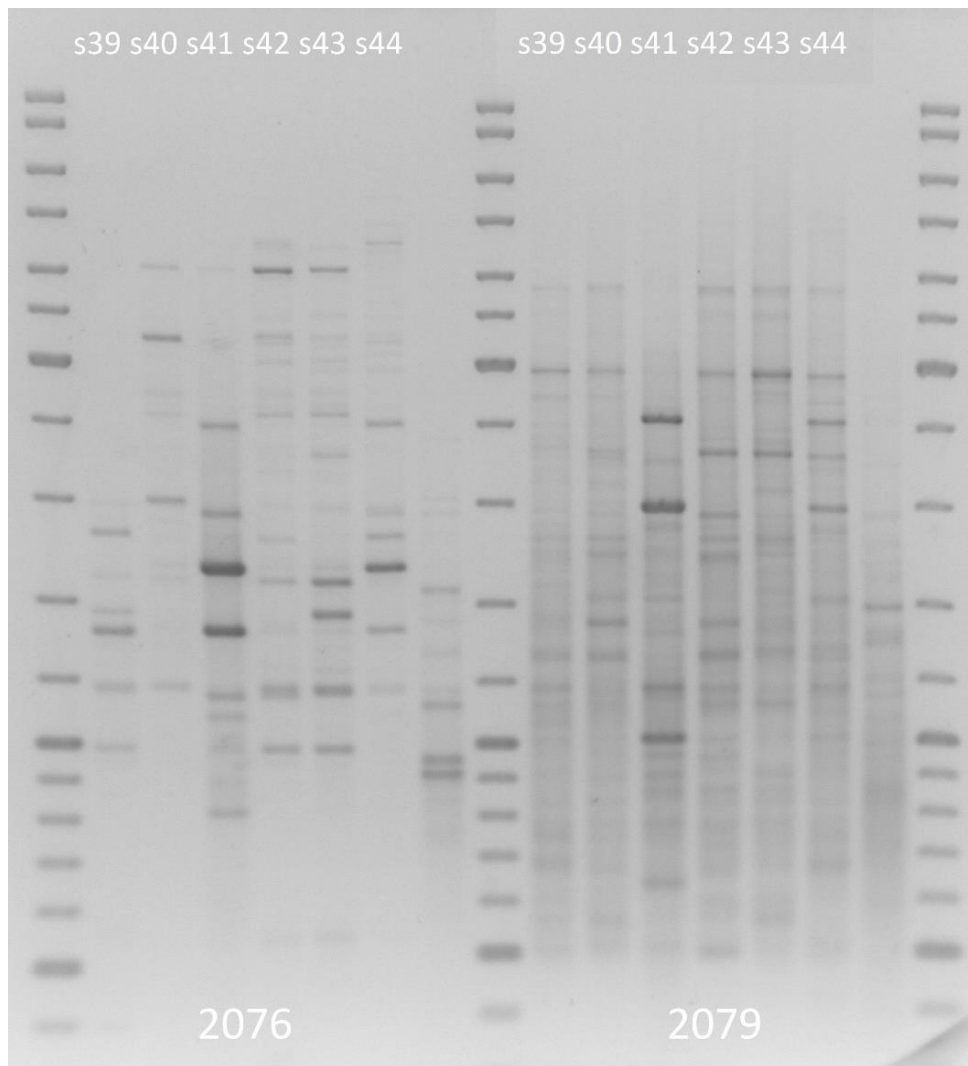
Germination of *Trifolium repens* under unsterile conditions.

Genotips	Iesēto sēklu skaits	Izdīgušo sēklu skaits
S1	10	2
S2	10	10
S3	10	4
S4	10	3
S5	10	6
S6	10	0
S7	10	3
S8	10	3
S9	10	2
S10	10	5
S11	10	1
LV12	10	1

3.3. iPBS analīze

Ģenētiskā daudzveidība noteikta ar iPBS metodi, kas ir balstīta uz retrotranspozoniem. Tika izvēlēti iPBS 2076 un iPBS 2079 praimeru, balstoties uz Kalvja Avotiņa maģistra darbu (Avotiņš 2017), kurā tika veikta praimeru atlase konkrēti *Trifolium repens* sugai. Pēc DNS izdalīšanas tika veikta PCR reakcija, pēc kuras elektroforēze ilga 18 stundas pie 40V.

Pēc gela bildēm pašrocīgi tika izveidota matrica (Microsoft Office Excel), kurā attēloti paraugā redzami fragmenti jeb lokusi. Ar iPBS 2076 praimeru tika konstatēti 32 lokusi, bet ar iPBS 2079 tika konstatēti 35 lokusi (kopā 77). Katram īpatnim lokusi tika analizēti pēc pašizvēlēta etalona (5. att.).



5. attēls. PCR produkti iPBS 2076 un iPBS 2079 praimerim.

Figure 5. PCR products of iPBS 2076 and iPBS 2079 primers.

3.4. Praimeru PIC vērtība

PIC vērtības formula ir $PIC_i = 2 * f_i * (1 - f_i)$, kur i -praimeris un f -alēles frekvence (Roldan-Ruiz et al. 2000; Soengas et al. 2006). iPBS 2076 PIC vērtība ir 0,42848, bet iPBS 2079 PIC vērtība ir 0,48966 (2. tab.).

Praimeris 2076

Alēles klātbūtne – 1164(3744)

Alēles frekvence – 0,31089

PIC – 0,42848

Praimeris 2079

Alēles klātbūtne – 1753(4095)

Alēles frekvence – 0,42808

PIC – 0,48966

Izmantoto praimeru PIC vērtība.

Table 2

PIC value of used primers.

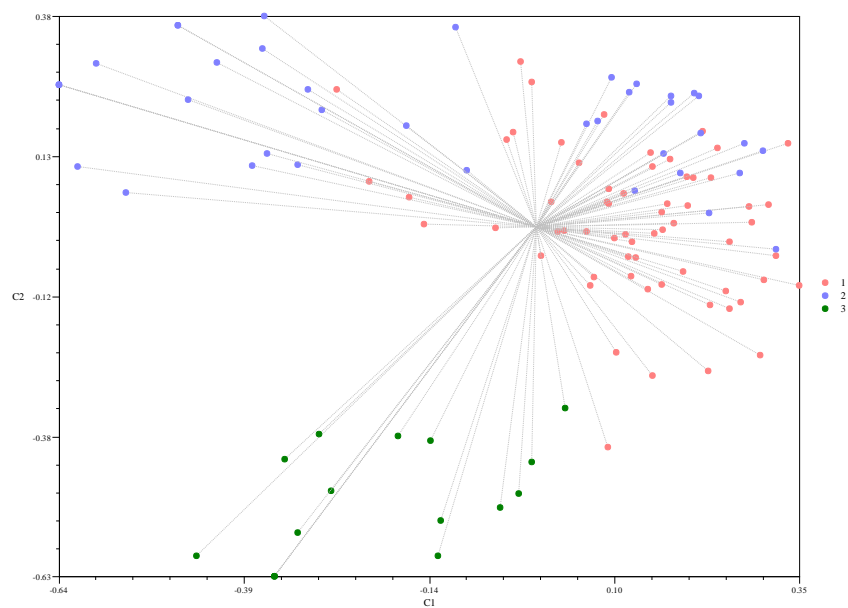
Praimeri	iPBS 2076	iPBS 2079
PIC	0,42848	0,48966

3.5. Klasteru analīze

Lai veiktu klasteru analīzi tika lietota programma NTSYSpc, kas pēc vajadzīgo parametru ievadīšanas aprēķināja kvadrātisko distanci starp populācijām, izveidojot PCA jeb pricipiālās komponentes analīzes grafiku. Analīze tika veikta atsevišķi iPBS 2076 praimerim (6. att.), iPBS 2079 praimerim (7. att.) un abiem praimeriem kopā (8. att.). Sarkans aplis rakturo īpatņus no Slovākijas, zilais aplis – īpatņus no Latvijas, bet zaļais – no Ukrainas.

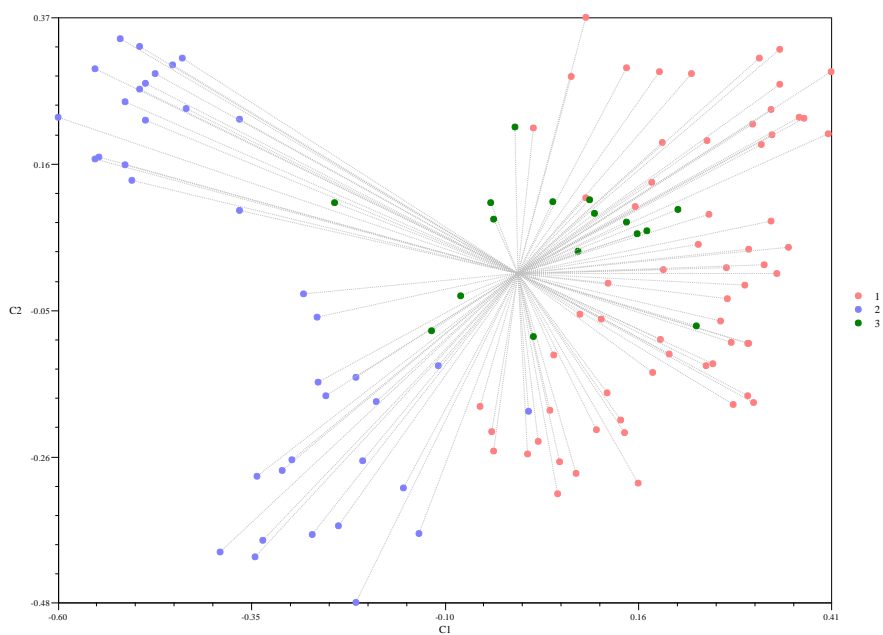
Pēc grafikiem var redzēt populāciju sadalījumu. Ar iPBS 2076 Latvijas populāciju var iedalīt divās atsevišķās grupās, no kurām viena veido atsevišķu kopu, bet otra apvienojas ar kopu no Slovākijas (kura veido atsevišķu kopu). Paraugi no Ukrainas arī veido atsevišķu kopu. Ar iPBS 2079 Latvijas populācija iedalās divās atsevišķās kopās, Slovākijas populācija veido atsevišķu kopu, kurā iekļaujas arī Ukrainas populācija. Pēc grafika, kurš veidots kopīgi gan iPBS 2076, gan iPBS 2079 praimerim var skaidri redzēt, ka Latvijas populācija iedalās divās atsevišķās kopās, bet Slovākijas un Ukrainas populācijas veido divas atsevišķas kopas.

Ir būtiski norādīt, ka paraugi no Ukrainas tika izvēlēti gan no pilsētvides, gan dabiskas vides, tomēr analīzē netika konstatētas acīmredzamas atšķirības.



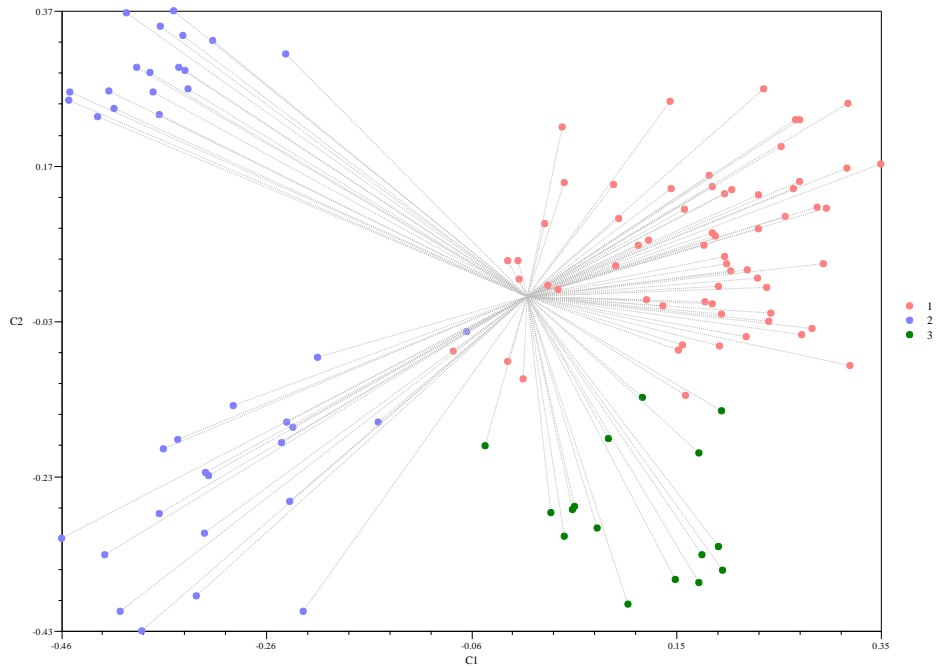
6. attēls. Klasteru sadalījums izmantojot iPBS 2076 praimeru (sarkans – Slovākija, zils – Latvija, zaļš – Ukraina).

Figure 6. Cluster distribution using iPBS 2076 primer (red - Slovakia, blue - Latvia, green - Ukraine).



7. attēls. Klasteru sadalījums izmantojot iPBS 2079 praimeru (sarkans – Slovākija, zils – Latvija, zaļš – Ukraina).

Figure 7. Cluster distribution using iPBS 2079 primer (red - Slovakia, blue - Latvia, green - Ukraine).

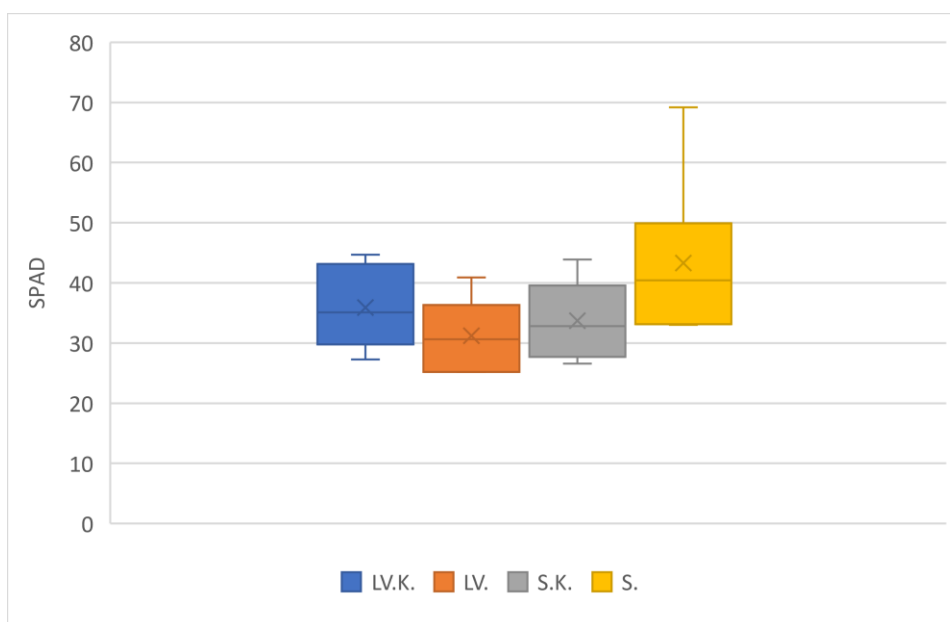


8. attēls. Klasteru sadalījums izmantojot iPBS 2076 un iPBS 2079 praimerus (sarkans – Slovākija, zils – Latvija, zaļš – Ukraina).

Figure 8. Cluster distribution using iPBS 2076 and iPBS 2079 primers (red - Slovakia, blue - Latvia, green - Ukraine).

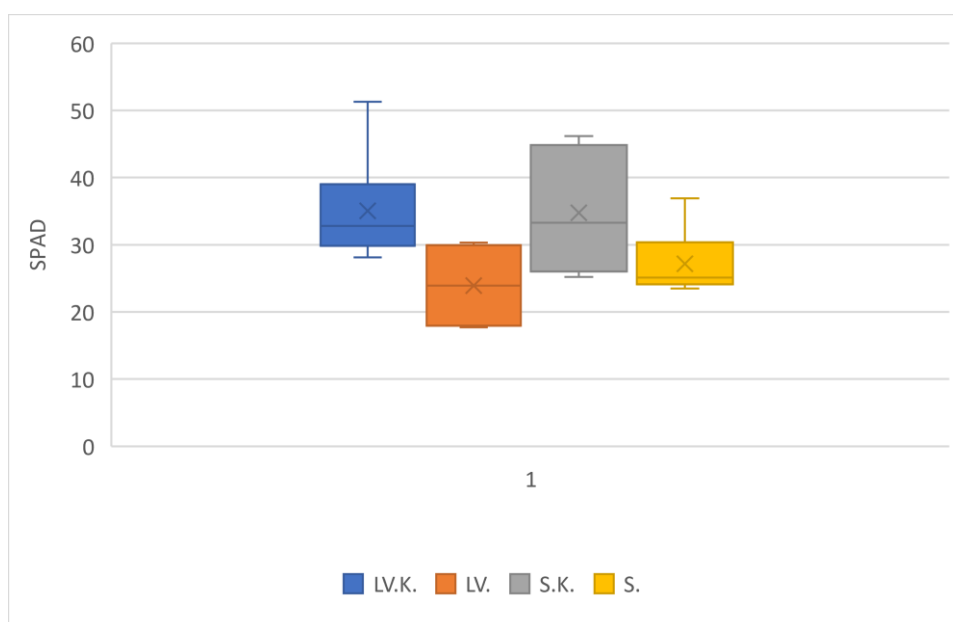
3.6. UV-B starojuma ietekmes rezultāti

Pirms apstarošanas tika izmērīta SPAD vērtība sešām lapām no katra *in vitro* kultivācijas trauka – gan turpmāk apstarotajam, gan kontroles variantam (9. att.). Pēc apstarošanas paraugi nedēļu tika audzēti inkubācijas kamerās. Pēc aklimatizācijas tika veikti atkārtoti SPAD vērtību mērījumi tieši tām pašām lapām (10. att.). Var novērot būtiskas atšķirības – Latvijas paraugiem pirms apstarošanas 50% no visām vērtībām vidēji bija no 26 līdz 37, bet pēc apstarošanas no 19 līdz 30. Slovākijas paraugiem pirms apstarošanas ar UV-B starojumu SPAD vērtības bija no 32 līdz 50, bet pēc – no 25 līdz 30. Latvijas kontroles variantam vērtības pirms apstarošanas bija intervālā no 30 līdz 43, bet pēc apstarošanas no 30 līdz 40. Savukārt Slovākijas kontroles variantam pirms apstarošanas 29 līdz 40, bet pēc – 28-45. Var novērot būtisku SPAD vērtību samazinājumu konkrēti ar UV-B starojumu apstarotajiem paraugiem, savukārt kontroles variantā SPAD vērtības ir aptuveni līdzīgas.



9. attēls. *Trifolium repens* SPAD vērtības pirms apstarošanas ar UV-B.

Figure 9. *Trifolium repens* SPAD values before irradiation with UV-B.



10. attēls. *Trifolium repens* SPAD vērtības pēc apstarošanas ar UV-B.

Figure 10. *Trifolium repens* SPAD values after irradiation with UV-B.

T-tests jeb Stjudenta t-tests tiek veikts, lai veiktu analīzi, cik līdzīgas vai atšķirīgas ir divas vai vairākas paraugkopas savā starpā. T-tests ir parametriska metode, kuras dati nāk no ģenerālkopas, kas atbilst normālajam sadalījumam. Šī metode ir jutīga pret ekstrēmām vērtībām, tomēr nelielas nobīdes no normālā sadalījumu rezultātu būtiski neietekmē. Tests tika pielāgots atkarīgām paraugkopām. T-testa formula ir $t = \frac{x_1 + x_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$, kur X_1 - pirmās paraugkopas

vidējais aritmētiskais un X_2 - otrās paraugkopas vidējais aritmētiskais, s_1^2 - pirmās paraugkopas dispersija, s_2^2 - otrās paraugkopas dispersija, n_1 - pirmās paraugkopas apjoms un n_2 - otrās paraugkopas apjoms (Elferts 2016). Testa veikšanai tika ņemti plūsmas citometrijas dati (585/29 mean vērtība 2C variantam) pirms un pēc apstrādes ar UV-B starojumu gan kontroles variantam, kad paraugi tika paņemti reizē ar apstrādātajiem paraugiem, kontroli neapstrādājot ar UV-B starojumu, gan ar UV-B apstarotajiem paraugiem. Pēc rezultātiem var spriest, ka kontroles variantam atšķirības nav būtiskas (p-value = 0,9572), bet ar UV-B starojumu apstarotajiem paraugiem atšķirības ir būtiskas (p-value = 5,07e-05) (11. att.). Būtiskuma līmenis ir 0,5.

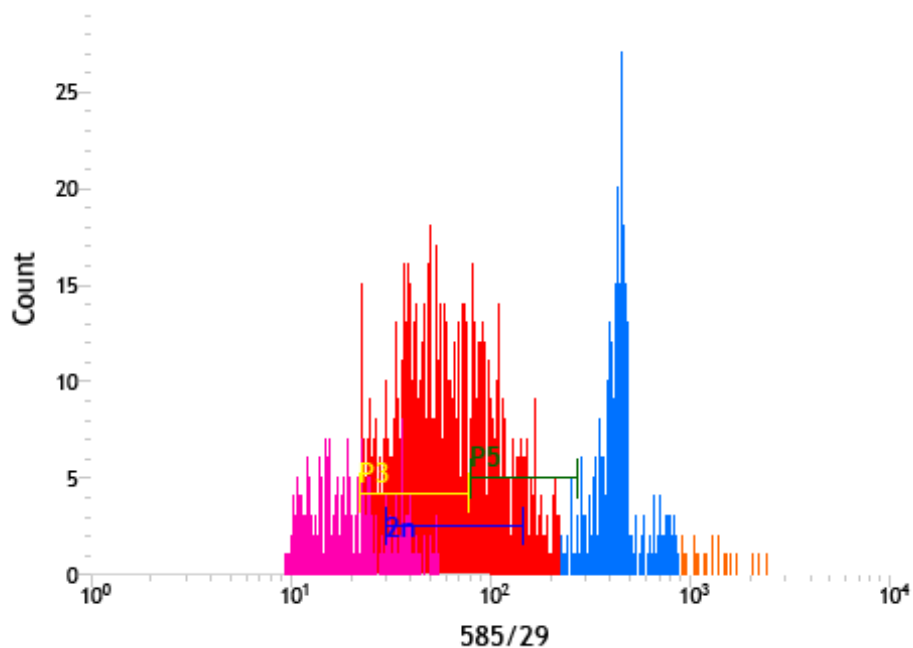
```
data: sandra$Pirms and sandra$Pec
t = -0.05495, df = 11, p-value = 0.9572
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -10.263603  9.763603
sample estimates:
mean of the differences
 -0.25
```

```
data: sandra1$Pirms and sandra1$Pec
t = -6.4004, df = 11, p-value = 5.078e-05
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -14.222765 -6.943901
sample estimates:
mean of the differences
 -10.58333
```

11. attēls. T-testa rezultāti.

Figure 11. Results of T-test.

Tika veikta *Trifolium repens* ploiditātes noteikšana, izmantojot plūsmas citometru. Šis darba posms tika veikts kā izmēģinājums, ar nolūku to turpināt maģistra darbā. Var novērot, ka *Trifolium repens* ir miksploīds (12. att.).



12. attēls. *Trifolium repens* miksploīdija (rozā – 2C-, sarkans – 2C, zils – 3C, oranžs – 4C).

Figure 12. Mixoploidy of *Trifolium repens* (pink – 2C-, red – 2C, blue – 3C, orange – 4C).

Gan Latvijas, gan Slovākijas kontroles variantiem izmaiņas lokusu skaitā netika konstatētas. Pēc nedēļas apstrādes ar UV-B starojumu Latvijas šķirnes “Daile” visi 18 paraugi tika konstatēti degradējušies, bet no 18 Slovākijas paraugiem 11 paraugiem konstatēti daži lokusu zudumi (8. piel.) viens paraugs bija pilnīgi degradējies, bet sešos paraugos netika novērojamas nekādas izmaiņas.

4. DISKUSIJA

Molekulārie marķieri ir būtiska ģenētiskās analīzes daļa, jo tos var izmantot dažādās nozarēs. Retrotranspozoni aizņem lielu daļu eukariota genoma. Tie spēj sevi transponēt genomā bez savu pirmatnējo sekvenču dzēšanas, tāpēc tos var izmantot kā veiksmīgus molekulāros marķierus. Retrotranspozoni aktivējas šūnu attīstības, diferenciacijas, hromatīna nestabilitātes un kāda stresora ietekmes rezultātā (Kalendar et al. 2017). Bakalaura darba mērķis bija salīdzināt ložņu āboliņa (*Trifolium repens* L.) Karpatu kalnu savvaļas populāciju un Latvijas šķirnes "Daile" materiālu daudzveidību un retrotranspozonu kustību pēc UV gaismas stresora ietekmes, ierosinot ģenētiskās izmaiņas. Iepriekš veikti pētījumi par UV-B starojuma ietekmi uz vairoga zileni (*Vaccinium corymbosum* L.) (Inostroza-Blancheteau et al. 2014), tomēr pētījums balstījās uz bioķīmiskām izmaiņām. Pētījumi par UV-B starojuma ietekmi uz retrotranspozonu kustību netika atrasti, tāpēc metodika balstījās uz pieminēto avotu.

Mainoties vides apstākļiem retrotranspozoni spēj pārvietoties genomā (Casacuberta et al. 2013). Paraugus apstrādājot ar UV-B starojumu tika panākta vides apstākļu maiņa, kā rezultātā dažiem Slovākijas paraugiem konstatēts retrotranspozonu pārvietošanās. Vērts pieminēt, ka visi ar UV-B starojumu apstarotie Latvijas paraugi konstatēti degradējušies, tāpēc ir nepieciešamība turpmākajiem pētījumiem par UV-B starojuma ietekmi uz retrotranspozonu kustību izveidot metodiku, kas būtu optimāla arī tām *Trifolium repens* populācijām, kas ikdienā nav pakļautas augstam UV-B starojumam.

Trifolium repens ģenētiskās daudzveidības pētījumi izmantojot iPBS analīzi Latvijas Universitātes Bioloģijas institūtā Vides ģenētikas laboratorijā tika uzsākti 2013. gadā (Avotiņš 2017). Citi šīs sugas pētījumi, izmantojot iPBS analīzi, netika atrasti. PIC (Polymorphic Information Content) ir vērtība, ko izmanto, lai pamatotu praimera lietojamību. Šī vērtība raksturo dominantos marķierus, kādi ir uz retrotranspozoniem balstītie marķieri. Vērtībai jābūt amplitūdā no 0 līdz 0,5. Jo augstāka vērtība, jo labāks pielietojums, lai pētītu ģenētisko daudzveidību (Roldan-Ruiz et al. 2000; Soengas et al. 2006). Abiem marķieriem ir pietiekami liela PIC vērtība (iPBS 2076=0,42848, bet iPBS=2079 0,48966), lai tos izmantotu tālākiem pētījumiem. Šajā darbā tika analizētas *Trifolium repens* populācijas no Ukrainas, Slovākijas un Latvijas šķirnes "Daile", bet pieminētajā avotā populācijas no Polijas, Šveices, Grieķijas, Austrijas, Čehijas un Latvijas. Vērts pieminēt, ka Latvijas populācija tika analizēta gan no pilsētvides, gan dabiskā vidē augošiem īpatņiem. Pēc rezultātiem varēja secināt, ka gandrīz visas (izņemot Austrijas) populācijas ir iedalāmas atsevišķās kopās.

Pēc klasteru analīzes var secināt, ka Latvijas *Trifolium repens* šķirne "Daile" iedalās divās atsevišķās kopās, Slovērijas populācijas veido vienu vienotu kopu un Ukrainas populācija iedalās atsevišķi.

Trifolium repens šķirne "Daile" tika iekļauta Latvijas šķirņu katalogā 2001. gada pirmajā janvārī. Termins, uz kādu šķirne tiek iekļauta katalogā ir 2030. gada 31. decembris. "Daile" tika selekcionēta Latvijā APP Agrolesursu un ekonomikas institūtā (Valsts augu aizsardzības dienests 2009.) Pētījuma rezultāti liecina, ka Latvijas *Trifolium repens* šķirne "Daile" populācija iedalās divās kopās. Šķirnes veidošanas procesā kā izlases kritērijs netiek izmantota ģenētiskā vienveidība, augi tiek atlasīti pēc līdzīgām fenotipiskām pazīmēm, tādējādi šķirni var uzskatīt par populāciju. Papildus šķirnes mainību varēja ietekmēt sakrustošanās ar savvaļas populācijām šķirnes ekspluatācijas laikā (Bumbure u.c. 1957). Ar plūsmas citometru analizējot relatīvi nelielu indivīdu skaitu (49 paraugi), varēja konstatēt, ka ir novērojama miksploīdija. Literatūrā minēts (Zhang et al. 2007), ka *Trifolium repens* ir tetraploīds. Ir nepieciešami turpmākie pētījumi.

Trifolium repens sēklu dīgšanu un augu augšanu pozitīvi ietekmē temperatūras pazemināšanās un paaugstināts gaisa mitruma līmenis. Augšana turpinās, kad temperatūra naktī sasniedz sasaldšanas temperatūru (Zhang 2007). Auga zemā dīgspēja var tikt skaidrota ar dīgšanai nepiemērotiem vides apstākļiem. Pještjani pilsētas vidējā gaisa temperatūra gadā ir 15°C. Vidējais nokrišņu daudzums ir 52 mm (Microsoft 2019). Latvijā vidējā gaisa temperatūra gadā ir 5,9°C. Vidējais nokrišņu daudzums ir 53 mm (Latvijas vides, ģeoloģijas un meteoroloģijas centrs 2013). Vidējais nokrišņu daudzums abām eksperimentā izmantotajām populācijām savā starpā būtiski neatšķiras, bet ir būtiskas atšķirības starp vidējām gaisa temperatūrām – Slovērijas genotipam tā ir lielāka, atsevišķos mēnešos pat līdz 10°C, kas ir relatīvi liela atšķirība. Tas liecina par būtiski atšķirīgiem augšanas vides apstākļiem.

UV-B starojumam (280-315 nm) ir būtiska ietekme uz bioloģiskajiem procesiem, un to spēcīgi absorbē ozons (gan stratosfērā, gan apakšējā atmosfērā). UV-B starojums izraisa DNS molekulas bojājumus, kas noved pie dzīvo organismu bioloģisko un fizioloģisko procesu negatīvām izmaiņām (McKenzie et al. 2007). Ultravioletais starojums kalnos ir īpaši intensīvs - jo augstāk virs jūras līmeņa, jo lielāks UV starojums. UV starojums kļūst intensīvāks par 2% ik pēc aptuveni 300 metru augstuma, jo gaiss kļūst retinātāks. UV starojuma mērīšanai izmanto ultravioletā starojuma indeksu sistēmu, kas tika radīta 1994. gadā, kurā 1-2 ir zema UV starojuma intensitāte, 3-5 vidēja, 6-7 augsta, 8-10 ļoti augsta, 11+ ekstrēma. UV starojums ir nozīmīgs vides faktors alpu augiem. Tas var ietekmēt augu morfoloģiskās un fizioloģiskās

reakcijas, kas svārstās no izmaiņām stubbra augstumā un ziedu attīstībā līdz citoplazmas viskozitātei, fotosintēzei un barības vielu uzņemšanai. Ir maz pētījumu par saules UV ietekmi uz augiem. Alpu augi ar laiku pielāgojas augstam UV starojumam savā augšanas vidē, tomēr vēl nav bijis pētījumu par mehānismiem, kā šie augi spēj aizsargāties no UV iedarbības. Ja pieņem, ka UV starojums ir vispārēji nelabvēlīgs vides faktors, tad ir pamatoti pieņemts, ka augi ir attīstījuši aizsardzības mehānismus (United States Environmental Protection Agency 2004; Caldwell 2015). Eksperimenta par UV-B starojumu rezultātus var skaidrot ar to, ka *Trifolium repens* Slovērijas genotips jau ir izstrādājis aizsardzības mehānismus no UV-B starojuma ietekmes, tāpēc ir redzami tikai daži retrotranspozonu pārvietojumi. Tomēr *Trifolium repens* Latvijas šķirne "Daile" tika selekcionēta Latvijas vides apstākļiem, kur salīdzinoši ar augstkalnu apgabaliem nav tik intensīvs UV starojums, tāpēc ir ievērojama būtiska DNS degradācija visiem paraugiem. Salīdzināšanai 2019. gada 25. maijā Pještjani pilsētā UV indekss ir 6, bet Rīgā 4, bet 26. maijā UV indekss Pještjani pilsētā ir 5, bet Rīgā 3 (WeatherOnline 2019). Datu apkopojums pa mēnešiem un/ vai gadiem nav atrodams. Bet pēc literatūras var spriest, ka Pještjani pilsētā UV indekss ir lielāks. UV starojums inhibē fotosintēzi. Tiek izmainīts elektronu transports fotosistēmā II un ietekmēta tilokoīdu membrāna (Caldwell 1981). SPAD mērītāja vērtības liecina par to, ka abos genotipos UV-B starojums ietekmēja hlorofila daudzumu – tas samazinājās, salīdzinot ar kontroles variantu.

Veicot turpmākos pētījumus par UV ietekmi uz retrotranspozonu kustību *Trifolium repens*, nepieciešams veikt metodes izstrādi, lai noteiktu, cik lielai ir jābūt UV-B intensitātei un laika periodam, lai novērotu retrotranspozonu kustību, bet nenotiktu DNS degradācija.

5. SECINĀJUMI

1. Hipotēze apstiprinājās - starp Latvijas un augstkalnu apgabalu genotipiem ir būtiskas atšķirības: Slovēkijas populācijas un Ukrainas populācija iedalās atsevišķās kopās, bet *Trifolium repens* komercšķirnes “Daile” populācija iedalās divās kopās. Lai noskaidrotu iemeslu nepieciešami turpmākie pētījumi, jo to var ietekmēt vairāki faktori.
2. *Trifolium repens* šķirne “Daile” ir neizturīga pret UV-B starojumu, salīdzinot ar augstkalnos augošo materiālu no Slovēkijas. Slovēkijas genotipam ir izveidojušies aizsardzības mehānismi pret UV-B starojumu.
3. Analizētajiem *Trifolium repens* augiem konstatētas šūnu grupas ar dažādu ploīditāti.
4. Apstarošana ar UV-B starojumu stundu dienā nedēļu pēc kārtas ir pietiekami ilgs laiks, lai novērotu retrotranspozonu kustību, tomēr nepieciešami tālāki pētījumi un metodiski uzlabojumi secinājumu konkrētīzēšanai.

6. PATEICĪBAS

Izsaku pateicību bakalaura darba tapšanā darba vadītājai Dacei Graudai par padomiem, labojumiem bakalaura darba tapšanas laikā, kā arī iespēju izstrādāt bakalaura darbu Latvijas Universitātes Bioloģijas institūtā. Paldies pētniekiem Andrai Miķelsonei, Nikolei Krasņevskai un Kārlim Žagatam par palīdzību darba metožu apgūšanā.

7. LITERATŪRAS SARAKSTS

- Allen O. N., Allen E. K. 1981. The leguminosae : a source book of characteristics, uses and nodulation. Macmillan, 746 pp.
- Alzohairy A. M. 2016. LTR-retrotransposons based markers. Research Gate, 41-44.
- Avotiņš K. 2017. Baltā āboliņa *Trifolium repens L.* ģenētiskās daudzveidības noteikšana Eiropas populācijās. Maģistra darbs, Latvijas Universitāte, Bioloģijas fakultāte.
- Bahadur B., Rajam M. V., Krishnamurty K. V. 2015. Plant Biology and Biotechnology. Volume II: Plant Genomics and Biotechnology. Springer India, 768 pp.
- Bartolini f., Dall'Agnol M., Schifino-Wittmann M. T. 2006. Molecular charecterization of the USDA white clover (*Trifolium repens L.*) core collection by RAPD markers. Springer, 53:1081-1087.
- Bui Q. T., Grandbastien M. A. 2012. LTR Retrotransposons as Controlling Elements of Genome Response to Stress? Springer-Verlag Berlin Heidelberg, DOI 10.1007/978-3-642-31842-9_14.
- Bumbure M., Galenieks P., Jaudzeme V., Līvena Dz., Pētersone A. 1957. Latvijas PSR Flora III. Latvijas valsts izdevniecība, 459 lpp.
- Caldwell M. M. 2015. Solar ultraviolet radiation as an ecological factor for alpine plants. Ecological Monographs, Vol. 38, No. 3, 243-268 pp.
- Caldwell, M. M. 1981. Plant Response to Solar Ultraviolet Radiation. Physiological Plant Ecology I, 169–197.
- Casacuberta E., Gonzalez J. 2013. The impact of transposable elements in environmental adaptation. Molecular Ecology, 22, 1503–1517.
- Chawla H. S. 2003. Plant biotechnology. A Practical Approach. Science Publishers, 302 pp.
- Doležel J., Greilhuber J., Suda J. 2007. Flow Cytometry with Plant Cells. Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes. WILEY-VCH, 455 pp.
- Fay M. F. 1994. In what situations is in to plant conservation? Biodiversity and Conservation 3, 176-183.
- Feschotte C., Pritham E. J. 2007. DNA Transposons and the Evolution of Eukaryotic Genomes. Annu Rev Genet, 41: 331–368.

- Gavrilova Ģ., Šulcs V. 1999. Latvijas vaskulāro augu flora. Taksonu saraksts. LU Bioloģijas institūts, Botānikas laboratorija, 136 lpp.
- Haerinasab M., Rahiminejad M. R., Ellison N. W. 2016. Transferability of Simple Sequence Repeat (SSR) Markers Developed in Red Clover (*Trifolium pratense* L.) to Some *Trifolium* Species. Iran. J. Sci. Technol. Trans. Sci., 40:59–62.
- Hargreaves S., Macted N., Hirano R., Abberton M., Skot L., Ford-Lloyd B. V. 2010. Islands as refugia of *Trifolium repens* genetic diversity. Springer, 11:1317-1326.
- Hoen D. R., Bureau T. E. 2012. Transposable Element Exaptation in Plants. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, DOI 10.1007/978-3-642-31842-9_12.
- Hofmann R. W., Campbell B. D. 2012. Leaf-level responses to ultraviolet-B radiation in *Trifolium repens* populations under defoliation pressure. Elsevier, Environmental and Experimental Botany 78, 64-69.
- Inostroza-Blancheteau C., Reyes-Diaz M., Arellano A., Latsague M., Acevedo P., Loyla R., Arce-Johnson P., Alberdi M. 2014. Effects of UV-B radiation on anatomical characteristics, phenolic compounds and gene expression of the phenylpropanoid pathway in highbush blueberry leaves. Plant Physiology and Biochemistry 85, 85-95.
- Jansen M. A. K., Gaba V., Greenberg B. M. 1998. Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. Elsevier Science, April, Vol.3., No. 4.
- Jari O. 1997. Plant neighbour diversity. Journal of Vegetation Science 8: 255-258.
- Kalendar R. N., Aizharkyn K. S., Khapilina O. N., Amenov A. A., Tagimanova D. S. 2017. Plant diversity and transcriptional variability assessed. Вавиловский журнал генетики и селекции, 21(1):128-134.
- Kalendar R., Antonius K., Smykal P., Schulman A. H. 2010. iPBS: a universal method for DNA Wngerprinting and retrotransposon isolation. Theor Appl Genet, 121:1419–1430.
- Lacis A. A. 1973. A Parameterization for the Absorption of Solar Radiation in the Earth's Atmosphere. Computer Sciences Corporation, New York, 10025.
- Mather, R. D. J., Melhuisk, D. T., Herlyhi, M. 2000. Trends in the global marketing of white clover cultivars. Grassland Res. Practice Ser., 11 (6), 7–14.
- McKenzie R. L., Aucamp P. J., Bais A. F., Bjorn L. O., Ilyas M. 2007. Changes in biologically-active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. Photochem. Photobiol. Sci., 6, 218–231.

- Newton C. R., Graham A., Ellison J. S. 1999. PCR, second edition. Springer-Verlag, HKMJ Vol 5 No 3.
- Ong C. A., Mink G. I. 1989. Evolution of Agarose Gel Electrophoresis for Resolving Nucleoprotein Components of Prunus Necrotic Ringspot Virus. The American Phytopathological Society, Vol 79, No 5.
- Pelissier T., Mathieu O. 2012. Glue for Jumping Elements: Epigenetic Means for Controlling Transposable Elements in Plants. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, DOI 10.1007/978-3-642-31842-9_8.
- Pierik R. L. M. 1997. *In vitro* culture of higher plants. Kluwer Academic Publishers, 348 pp.
- Priedītis N. 2014. Latvijas augi. Gandrs, 892 lpp.
- Ravagnani A., Abberton M. T., Skot L. 2012. Development of Genomic Resources in the Species of *Trifolium* L. and Its Application in Forage Legume Breeding. Agronomy, 2, 116-131.
- Roldan-Ruiz I., Dendauw J., Van Bockstaele E., Depicker A., De Loose M. 2000. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). Kluwer Academic Publishers, Molecular Breeding 6: 125–134.
- Schulman A. H. 2015. Topics in Current Genetics. Chapter 5 Hitching a Ride: Nonautonomous Retrotransposons and Parasitism as a Lifestyle. Research Gate, DOI: 10.1007/978-3-642-31842-9_5.
- Schulman A. H., Wicker T. 2013. A Field Guide to Transposable Elements. Plant Transposons and Genome Dynamics in Evolution, First Edition. John Wiley & Sons, Inc.
- Shapiro H. M. 2005. Practical Flow Cytometry. WILEY-LISS, 680 pp.
- Soengas P., Velasco P., Padilla G., Ordas A., Carrea M. E. 2006. Genetic relationships among *Brassica napus* crops based on SSR markers. Hort Science 41(5):1195-1199.
- Taylor N. L., Quesenberry K. H. 1996. Red clover science. Current plant science and biotechnology in agriculture. Kluwer Academic Publishers, 226 pp.
- Webdel J. F., Greilhuber J., Doležel J., Leitch I. J. 2012. Plant Genome Diversity. Volume 1: Plant Genomes, Their Residents and Their Evolutionary Dynamics. Springer, 279 pp.
- Williams W. M. 2014. *Trifolium repens* interspecific hybridisation: widening the white clover gene pool. Crop & Pasture Science, 65, 1091–1106.

Zhang Y., Sledge M. K., Bouton J. H. 2007. Genome mapping of white clover (*Trifolium repens* L.) and comparative analysis within the *Trifolieae* using cross-species SSR markers. *Theor Appl Genet*, 114:1367–1378.

Zhu J. M., Ellison N. W., Rowland R. E. 1996. Chromosomal localization of a tandemly repeated DNA sequence in *Trifolium repens* L. *Cell research*, 6, 39-46.

Citi avoti:

Anonymous. 2015. Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew. <http://www.plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:523626-1#sources>

Elferts Didzis. 2016. Praktiskā biometrija. Nodaļa 7. Paraugkopu salīdzināšana. https://bookdown.org/delferts/PBB_gramata/PBB_gramata.pdf

Kurt Stueber. 2007. Flora von Deutschland Österreich und der Schweiz (1885). http://caliban.mpipz.mpg.de/thome/band3/tafel_115.html

Latvijas vides, ģeoloģijas un meteoroloģijas centrs. 2013. Mēnešu klimatiskais raksturojums. <https://www.meteo.lv/lapas/laika-apstakli/klimatiska-informacija/latvijas-klimats/menesu-klimatiskais-raksturojums/?nid=564>

Microsoft. 2019. Pieštjani, Slovakia. Historical Weather. Temperature. Rainfall. <https://www.msn.com/en-us/weather/today/pie%C5%A1%C5%A5anytrnavaslovakia/weather?q=pie%C5%A1%C5%A5anytrnava&form=PRWLAS&iso=SK&el=CaTnUOXANp%2bq2MQAwNszCA%3d%3d>

United States Environmental Protection Agency. 2004. A guide to the UV index. <https://www.epa.gov/sites/production/files/documents/uviguide.pdf>

Valsts augu aizsardzības dienests. 2009. Latvijas augu šķirņu katalogs. <http://www.vaad.gov.lv/sakums/registri/augu-skirnes/latvijas-augu-skirnes-katalogs.aspx/>

WeatherOnline. 2019. Piešt'any UV index. Riga UV index. <https://www.weatheronline.co.uk/>

PIELIKUMI

1. pielikums

Agarozes gēla koncentrācija DNS izmēra izšķirtspējai

Appendix 1

Agarose gel concentration for DNA size resolution

Gēla izmērs (cm)	1xTAE bufera tilpums (ml)	Agarozes daudzums (g)				Ķemmišu skaits
		1,0%	1,5%	1,7%	3,0%	
10 X 7	50	0,5	0,75	0,85	1,5	16
10 X 10	70	0,7	1,05	1,19	2,1	16 x 2
15 X 7	70	0,7	1,05	1,19	2,1	20
15 x 10	90	0,9	1,35	1,53	2,7	20; 20 x 2;
15 X 15	135	1,35	2,025	2,295	4,05	20 x 2; 30 x 2
20 x 10	120	1,2	1,8	2,04	3,6	20; 25; 30; 36; 40; 50
20 X 20	240	2,4	3,6	4,08	7,2	20(+); 25(+); 30(+); 36(+); 40(+); 50(+)

Modificēts CTAB DNS izdalīšanas protokols (Doyle and Doyle 1987)

Appendix 2

Modified CTAB DNA release protocol (Doyle and Doyle 1987)

1. Auga sauso materiālu sasmalcina ar homogenizatoru. (1 min, 37 apgriezieni minūtē).
2. Pie sasmalcinātā materiāla pievieno 800 µl CTAB buferi un ievieto termomikserī pie +60°C uz vienu stundu pie rotācijas 300 rpm (rotācijas minūtē).
3. Noņem no termomiksera un pievieno vienu tilpumu (800 µl) hloroforma izoamilalkohola (24:1) un uzmanīgi sajauc.
4. Centrifugē 20 min pie 13200 rpm apgriezieniem.
5. Noņem ar pipeti ūdens fāzi un pārvieto uz citu stobriņu.
6. Pievieno 480 µl aukstu (no saldētavas) izopropanolu un uzmanīgi sajauc (~16 reizes).
7. Centrifugē 10 min pie 13200 rpm apgriezieniem.
8. Nolej šķidrumu, atstājot DNS nogulsnes.
9. Pievieno 500 µl mazgāšanas bufera un uzmanīgi sajauc. Tad atstāj to 20 min istabas temperatūrā.
10. Centrifugē 5 min pie 13200 rpm apgriezieniem.
11. Nolej šķidrumu, saglabājot nogulsnes.
12. Pievieno 500 µl skalošanas šķīduma un uzmanīgi sajauc.
13. Centrifugē 5 min pie 13200 rpm apgriezieniem.
14. Nolej šķidrumu, saglabājot nogulsnes.
15. Žāvē istabas temperatūrā ~20 min.
16. Pievieno 50 µl TE buferi.

CTAB buferis (10 ml):

- 0,5 ml 2M Tris;
- 0,2 ml EDTA (0,5 M);
- 1,4 ml NaCl (5 M);
- 1 ml CTAB (10%);
- 0,1 ml merkaptotetanolis;
- 6,8 ml molekulārais ūdens.

Mazgāšanas buferis:

- 80 ml 95% etanols;
- 20 ml 1 M nātrija acetāts.

Skalošanas buferis:

- 80 ml 95% etanols;
- 133 µl 7,5 M amonija acetāts;
- atšķaida ar molekulāro ūdeni līdz 100 ml.

TE: (autoklāvē)

- 1 ml 1 M Tris pH 8,0;
- 0,1 ml 0,5 M EDTA ph 8,0;
- atšķaida ar molekulāro ūdeni līdz 100 ml.

3. pielikums

Izmantotie palīgmateriāli

Appendix 3

Used consumables

Palīgmateriāla nosaukums	Firmas nosaukums	Modelis/ artikuls
Pipešu uzgaļi 2,0 ml	SARSTEDT	72.695.400
Pipešu uzgaļi 1000 µl	SARSTEDT	70.762
Pipešu uzgaļi 200 µl	SARSTEDT	70.760.002
Pipešu uzgaļi 5 ml	SARSTEDT	70.1183.022
Pipešu uzgaļi 20 µl	SARSTEDT	70.1116
Statīvi	-	-
Sterilas petri plates ar ventilāciju 92x16mm	SARSTEDT	82.1473.001
Parafilm 4IN.x125FT. ROLL	PARAFILM	PM-996
10 ml sterilas pipetes	GOSELIN	GPL10E1N
Uzgaļu statīvi	Sppendorf, STARSTEDT	-
<i>In vitro</i> kultivācijas trauks	Duchefa Biochemie	S1682
Metāla pincete	-	-
Metāla skalpelis	-	-
1,5 ml stobriņš	SARSTEDT	72.690.550
2 ml stobriņš	SARSTEDT	72.695.400
Silikagels (indikatorgels) 2-5 mm	LLG Labware	9.042.581
Dažāda tilpuma kolbas, mērcilindri	-	-
Filtrpapīrs	-	-
Alumīnijs	-	-
Sterils filtrs (Cell Strainer) 40 µm Nylon	FALCON	3523040

Agarozes gela ķemmīte, forma, gumijas	-	-
Citometrijas stobriņi	FALCON	352063

4. pielikums

Izmantotās vielas un reaģenti

Appendix 4

Used substances and reagents

Vielas vai reaģenta nosaukums	Firmas nosaukums	Artikuls/ cits
iPBS koncentrāts 2076 5'-GCTCCGATGCCA-3'	BIONEER	-
iPBS koncentrārs 2079 5'-AGGTGGCGCCA-3'	BIONEER	-
DreamTaq Polymerase	ThermoScientific	00544725
DreamTaq Buffer	ThermoScientific	00273084
dNTP Mix	ThermoScientific	#R0192
Buferis (KIT)	SYSMEX	CyStain UV Ploidy
Propīdija jodīds (PI)	SIGMA	P4170
Rnāze A	ThermoScientific	EN0531
6x Orange Loading Dye Solution 1ml	Fermentas	#R0631
Garuma marķieris GeneRuler Mix	ThermoScientific	#SM0333
NaOH	Fluka	30620
HCl 0,1 M	-	-
Molekulārais ūdens	ROTH	T143.2
Hloroforms	SIGMA	C0549-1PT
Etīdija bromīds	ROTH	2218.1
EDTA	SIGMA	E5134-500G
CTAB	SIGMA	H6269-250G

TopVision agaroze	ThermoScientific	#R0492
Plant agar	Puchefa Biochemie	P1001-1000
Trizma base(TRIS)	SIGMA	T1503-1KG
NACl	Fluka Analytical	71376
Etiķskābe	SIGMA-ALDRICH	27225
2-Mercaptoethanol	ROTH	42271
Rnase A	Thermo Scientific	#EN0531
Balinātājs 5%	ACE	Classic
Etanols	-	-
Nātrija acetāts	Fluka	71183
Amonija acetāts	Fluka	096R8
2-Propanol	ROTH	6752.1

5. pielikums

Izmantotās iekārtas

Appendix 5

Used equipment

Iekārtas nosaukums	Firmas nosaukums	Modelis/ tilpums
Vortekss	BIOSAN	Combi-Spin
Vortekss	Scientific Industries	Vortex-genie 2
PCR aparāts	Applied Biosystems	Gene Amp PCR System 9700
DNA/ RNA UV-cleaner	BIOSAN	UVT - S
Maisītājs	BIOSAN	Multi Bio RS-24
Homogenizators	QIAGEN	TissueLyser LT
Mikropipete	Eppendorf	500-5000 µl
Mikropipete	Eppendorf	100-1000 µl
Mikropipete	Eppendorf	20-200 µl
Mikropipete	Eppendorf	2-20 µl
Mikropipete	Eppendorf	0,5-10 µl

Termomikseris	Eppendorf	Thermomixer comfort 1,5 ml
Centrifūga	Eppendorf	5415D
pH metrs	HANNA	HI8424
Laminārbokss	FASTER KBN	-
Velkmes skapis	-	-
Ūdens vanna	PRECISTERM	P Selecta
Lodīšu sterilizators	KELLER	Steri 350
Autoklāvs	-	-
Elektroforēzes bloks	LIFE TECHNOLOGIES	GIBRO BRL PS304
Elektroforēzes bloks	CONSORT	E132
Elektroforēzes vanna	Cleaver Scientific Ltd	-
Automātiskā pipete	Eppendorf	Easypet
Ledusskapji ar saldētavām	Whirlpool	A Class
Digitālā fotokamera	Canon	PowerShot G10, 14,7 Mpx
Mikroviļņu krāsns	Whirlpool	Easytronic M591
Plūsmas citometrs	BD FACS Jazz	-
UV-B lampa 220-240V, 50-60 Hz	FAREL	9104 023 38427
Spuldze UV-B	Philips	TL4W/ 12RS J2
SPAD portatīvais hlorofila mērītājs	Konica Minolta	502 Plus
Elektroniskie svāri	Shinko Denshi	ViBRO DJ-150S
UV gaismas kamera 230V-50 Hz, 180W	Cleaver Scientific Ltd	microDOC, D1HD

6. pielikums

Izmantotās datorprogrammas

Appendix 6

Used computer programs

Datorprogrammas nosaukums	Versija/ gads
NTSYSpC	2.1/ 2018
R Studio	3.5.2/ 2018
Microsoft Office Excel	16.0/ 2016

7. pielikums

Modificēta L2 barotne (Taylor and Quesenberry 1996)

Appendix 7

Modified L2 medium (Taylor and Quesenberry 1996)

Vielas nosaukums	Barotnes pagatavošanai izmantotais vielas daudzums (mg/l)	Firmas nosaukums	Artikuls
NH ₄ NO ₃	1000	SIGMA-ALDRICH	A3795-500G
KNO ₃	2100	Duchefa Biochemie	P0519.1000
CaCl ₂ x2H ₂ O	600	ANALYTICA	147.02
MgSO ₄ x7H ₂ O	43,5	ROTH	P027.1
KH ₂ PO ₄	325	POCH GLIWICE	74202112
Na ₂ HPO ₄	82,65	ROTH	P030.1
KI	1,0	Duchefa Biochemie	P0518.0100
H ₃ BO ₃	5,0	ROTH	P010.1

MnSO ₄ x H ₂ O	15,0	ROTH	4487.1
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	5,0	ROTH	K301.1
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,4	ACROS ORGANICS	10102-40-6
CuSO ₄ x5H ₂ O	0,1	ROTH	P025.1
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,1	ROTH	7095.1
Na ₂ EDTA	33,6	SIGMA	E6511-100G
FeSO ₄ x 7H ₂ O	25,0	ROTH	P015.1
Saharoze	25 (g/l)	SIGMA	S5391-1KG
Myo-inositol	250,0	SIGMA	I-3011
Pyroxidine-HCl	0,5	ACROS ORGANICS	58-56-0
Thiamine-HCl	2,0	ACROS ORGANICS	67-03-8
Plant agar	6 (g/l)	Puchefa Biochemie	P1001-1000

Slovākijas *Trifolium repens* zudušo lokusu skaits pēc apstrādes ar UV-B starojumu

Appendix 8

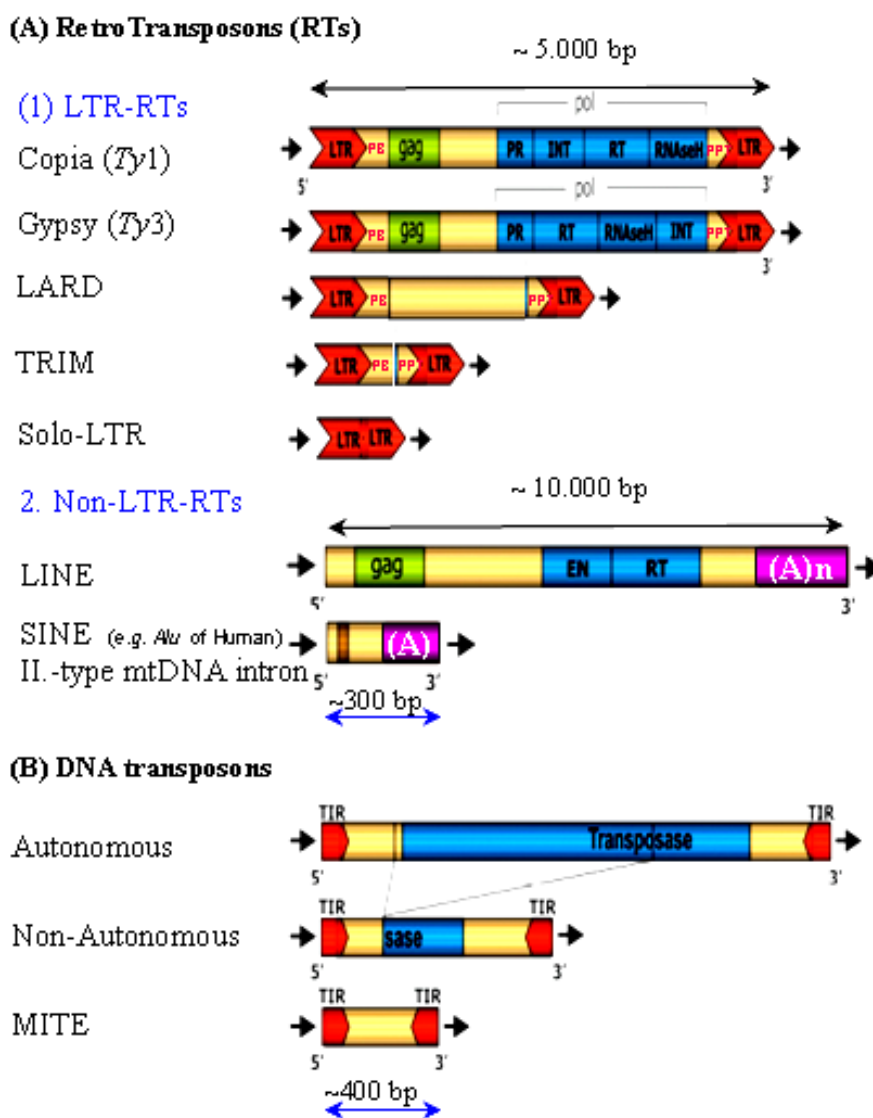
Loss of loci after irradiation with UV-B in *Trifolium repens*

Paraugs	Pazudušo lokusu skaits
S21	1
S22	2
S24	1
S25	2
S28	1
S28	1
S30	1
S31	2
S33	2
S34	4
S35	3

Transpozonu molekulārā struktūra, veids un aptuvenais garums (Alzohairy 2016)

Appendix 9

Types, molecular structures and estimated length of transposons (Alzohairy 2016)



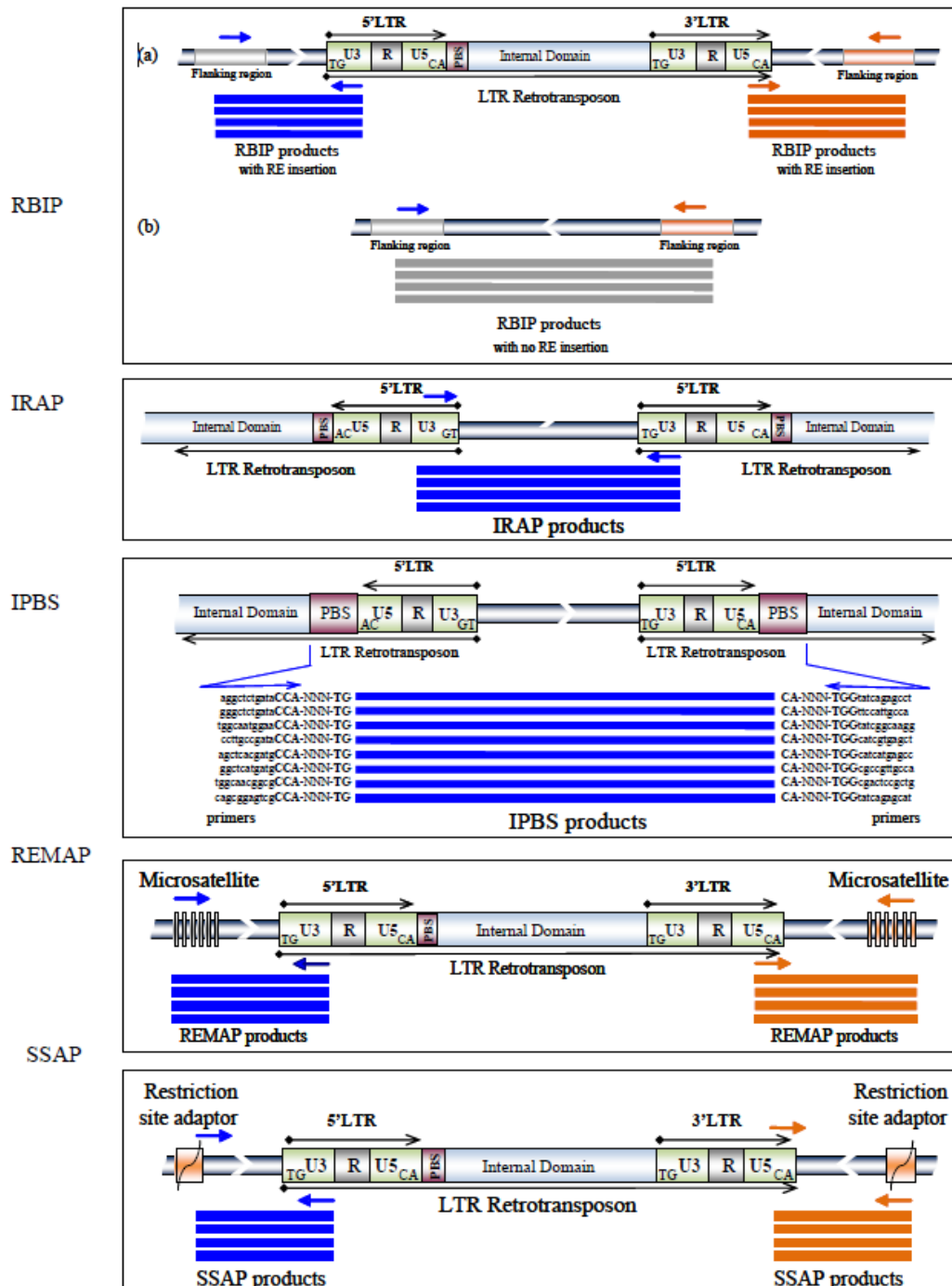
4. attēls. Transpozonu molekulārā struktūra, veids un aptuvenais garums (Alzohairy 2016).

Figure 4. Types, molecular structures and estimated length of transposons (Alzohairy 2016).

Uz PCR balstītie LTR-RT “svītrkodēšanas” metožu veidi

Appendix 10

PCR-based molecular barcoding methods of LTR-RTs



Bakalaura darbs „Ložņu āboliņa (*Trifolium repens* L.) Karpatu kalnu un Latvijas populāciju ģenētiskās daudzveidības salīdzinājums” izstrādāts LU Bioloģijas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: Sandra Dombrovska

24.05.2019.

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: Dr.biol. Dace Grauda

24.05.2019.

Recenzents:

prof., Dr. biol. Īzaks Rašals

Darbs iesniegts Bioloģijas fakultātē 27.05.2019.

Metodiķe: _____ paraksts

Darbs aizstāvēts bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē

03.06.2019. prot. Nr. _____, vērtējums _____

Komisijas sekretārs/e _____ paraksts