

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE  
MOLEKULĀRĀS BIOLOĢIJAS KATEDRA

Ložņu āboliņa (*Trifolium repens* L.) Eiropas populāciju  
ģenētiskās daudzveidības salīdzinājums

Maģistra darbs

Autore: Sandra Dombrovska

Stud. apl. nr.: sd19028

Darba vadītāja: Asoc. prof., Dr. biol. Dace Grauda

RĪGA 2021

## KOPSAVILKUMS

Sandra Dombrovska (2021): Ložņu āboliņa (*Trifolium repens* L.) Eiropas populāciju ģenētiskās daudzveidības salīdzinājums.

Ložņu āboliņam ir plašs izplatības areāls – no arktiskiem reģioniem līdz augstkalnu (6000 m) reģioniem. Tas ir plaši izplatīts arī vietās ar augstu vides piesārņojuma līmeni. Maģistra darba mērķis ir noteikt ložņu āboliņa Eiropas populāciju ģenētisko daudzveidību atkarībā no dažādiem augšanas apstākļiem. Ģenētiskās daudzveidības noteikšanai tika izmantota iPBS metode un izstrādāta metode UV-B starojuma izraisītas retrotranspozonu pārvietošanās noteikšanai.

Rezultāti liecina, ka analizētā Eiropas populācija iedalās divos lielos klāstos, atsevišķi izdaloties augstkalnu apgabalā. Secināts, ka augstkalnu reģionos izplatītās populācijas ģenētiski ir atšķirīgas no zemienēs izplatītājām. Analizētās populācijās ir novērojama miksploīdija, kas liecina par adaptāciju mainīgiem vides apstākļiem.

Atslēgvārdi: *Trifolium repens* L., PCA, iPBS, LTR retrotranspozoni, UV-B starojums.

## SUMMARY

Sandra Dombrovska (2021): The comparison of genetic diversity in the European populations of the white clover (*Trifolium repens* L.).

White clover has a wide distribution range – from the Arctic regions up to 6000 meters in high-altitude regions. It is also widespread in places with high levels of environmental pollution. The aim of the master's thesis is to determine the genetic diversity of European populations of white clover depending on different growth conditions. After iPBS analysis cluster analysis was performed, as well as a method for retrotransposon movement induced by UV-B radiation stress was developed.

The results show that the analyzed European population is divided into two clusters – the high-altitude region is divided separately. Populations distributed in the highlands have been found to be genetically distinct from those distributed in the lowlands. Mixoploidy is observed in the analyzed populations, indicating plant adaptation to changing environmental conditions.

Keywords: *Trifolium repens* L., PCA, iPBS, LTR retrotransposons, UV-B radiation.

## SATURS

APZĪMĒJUMU SARAKSTS .....	5
IEVADS.....	6
1. LITERATŪRAS APSKATS.....	7
1.1. <i>Trifolium spp.</i> ģints apraksts .....	7
1.2. Ložņu āboliņa <i>Trifolium repens</i> L. apraksts .....	7
1.2.1. Ložņu āboliņa <i>Trifolium repens</i> L. izplatība.....	9
1.3. UV-B starojuma palielināšanās kā klimata izmaiņu sekas .....	9
1.4. Ģenētiskie marķieri.....	10
1.5. Mobilie ģenētiskie elementi.....	11
1.5.1. Retrotranspozoni .....	13
1.5.1.1. Garo sekvenču atkārtojumu (LTR) retrotranspozoni .....	14
1.5.2. Uz retrotranspozoniem balstīta iPBS metode.....	16
1.6. Kallusu kultūra.....	17
1.6.1. <i>Trifolium repens</i> L. kallusu veidošana .....	17
1.7. Ploiditātes noteikšana ar plūsmas citometriju.....	17
2. MATERIĀLI UN METODES .....	21
2.1. Materiāli.....	21
2.1.1. Paraugu ievākšana .....	21
2.2. Metodes.....	22
2.2.1. DNS izdalīšana .....	22
2.2.2. PCR reakcija.....	22
2.2.3. Gēla elektroforēze .....	23
2.2.4. Datu analīze ar NTSYSpc programmu.....	23
2.2.5. <i>Trifolium repens</i> L. kallusu izveide .....	23
2.2.6. UV-B starojuma eksperimenta klonu kultūra.....	25
2.2.7. Plūsmas citometrija .....	26
2.2.8. Izmantotie resursi .....	27

3.	REZULTĀTI.....	28
3.1.	PIC vērtība .....	28
3.2.	Klāsteru analīze.....	29
3.3.	<i>Trifolium repens</i> L. kallusu veidošana.....	32
3.4.	Sēklu dīgšanas parametri .....	33
3.5.	UV-B starojuma ietekmes noteikšana.....	34
3.6.	Plūsmas citometrija.....	38
4.	DISKUSIJA.....	39
5.	SECINĀJUMI .....	43
	PATEICĪBAS.....	44
	LITERATŪRAS SARAKSTS.....	45
	PIELIKUMI .....	51

## APZĪMĒJUMU SARAKSTS

CTAB – cetrimonija bromīds

DNS – dezoksiribonukleīnskābe

dNTP – deoksinukleotīdi

EDTA – etilēndiamīntetraetiķskābe

FCM – plūsmas citometrs

*In vitro* – izolēta šunu, audu vai organismu kultivācija mākslīgi radītos, kontrolējamos apstākļos

M – vielas molārā koncentrācija

NaCl – nātrija hlorīds

PBS – reversās transkriptāzes praimera saistīšanās vieta

PCA – galvenās komponentes analīze

PCR – polimerāzes ķēžu reakcija

TAE – buferis, kurš sastāv no Tris, etiķskābes un EDTA (pH 8.3)

TE – buferis, kurš sastāv no Tris un EDTA (pH 8.0)

Tris – trishidroksimetilaminometāns

UV-B – ultravioletais B starojums

## IEVADS

Kā modeļobjektus populāciju ģenētiskos pētījumos izmanto bieži sastopamus augus ar ātras augšanas potenciālu. Ložņu āboliņš *Trifolium repens* L. spēj ātri izplatīties un tam ir plašs izplatības areāls – sākot ar arktiskiem reģioniem līdz pat 6000 metriem augstos augstkalnu reģionos. *Trifolium repens* L. ir veiksmīgs modeļobjekts, jo tas ir plaši izplatīts pilsētu apstādījumos – vietās ar augstu vides piesārņojuma līmeni, tāpēc to var izmantot sugas adaptāciju pētījumos. Arī šīs sugas ģenētika ir labi izpētīta (Zhu et al. 1996; Mather 2000; Bartolini et al. 2006; Zhang et al. 2007; Williams 2014; Gonzalez et. al. 2016).

Mērenajos platuma grādos klimata izmaiņas, tai skaitā intensīvāks UV-B starojums, rada negatīvu ietekmi uz pastāvošajām ekosistēmām, stimulējot tādu sugu savairošanos, kas samazina citu sugu izdzīvotību. Augi ir vieni no jutīgākajiem organismiem, kas uz vides izmaiņām reaģē jau genotipa līmenī. Mūsdienās ir aktuāli izvēlēties tādas pilsētvides augus, kas spētu pielāgoties klimata nosacījumiem (Hofmann and Campbell 2012; Montiel et. al. 2017; Fineschi and Loreto 2020).

Retrotranspozoni ir mobilie ģenētiskie elementi, kas spēj pārvietoties genomā, izmantojot "kopēšanas-ielīmēšanas" principu, tādējādi sevi pavairojot. Ir daudz pētījumu, kas pierāda, ka retrotranspozoni aktivējas, kad augs ir kāda stresora ietekmē. Spēja reaģēt uz vides izmaiņām retrotranspozonus padara par veiksmīgiem funkcionālajiem marķieriem, kas atbild par pielāgošanos mainīgiem vides apstākļiem. Tādēļ uz retrotranspozoniem balstītus praimerus var sekmīgi izmantot populāciju daudzveidības pētījumos (Bui and Grandbastien 2012; Casacuberta and Gonzales 2013; Borreda et. al. 2019).

Maģistra darba mērķis ir noteikt ložņu āboliņa *Trifolium repens* L. Eiropas populāciju ģenētisko daudzveidību atkarībā no dažādiem augšanas apstākļiem.

Maģistra darba izvirzītā hipotēze: dažādi augšanas apstākļi, tai skaitā paaugstināts stress, palielina *Trifolium repens* L. populāciju ģenētisko daudzveidību.

Maģistra darbā izvirzītie uzdevumi darba mērķa sasniegšanai:

1. Izdalīt DNS un veikt uz retrotranspozoniem balstītu iPBS analīzi.
2. Adaptēt metodiku *Trifolium repens* L. kallusu *in vitro* kultūru iegūšanai un kultivēšanai.
3. Pilnveidot metodiku retrotranspozonu pārvietošanās noteikšanai pēc UV-B starojuma ietekmes.
4. Veikt iegūto datu analīzi.

# 1. LITERATŪRAS APSKATS

## 1.1. *Trifolium spp.* ģints apraksts

*Leguminosae (Fabaceae)* ir trešā lielākā ziedošo augu dzimta (727 ģintis un gandrīz 20'000 sugas). *Trifolium* jeb āboliņu ģints ir viena no lielākajām šīs dzimtas ģintīm – tajā ir 255 sugas. Jau ģints nosaukumā ir parādīts, ka viena no ģints raksturīgākajām īpašībām ir lapa, kas sastāv no trīs lapiņām. Ģintī ir gan daudzgadīgi, gan viengadīgi augi, kuru morfoloģija bieži raksturojama ar noliektiem stublājiem, kas nepārsniedz 50 cm. Mazi un vidēji lieli ziedi (0,3–2,5 cm) parasti ir sakārtoti galviņās. Augļi ir pākstis, kas parasti satur no vienas līdz divām, bet var saturēt arī līdz deviņām sēklām. *Trifolium* dabiskā izplatība ietver ziemeļu un dienvidu puslodes mērenos un mazākā mērā subtropu reģionus. Āzijas dienvidaustrumos un Austrālijā šī ģints dabīgi nav izplatīta. Lielākā sugu daudzveidība ir trīs ģeogrāfiskajos reģionos: Vidusjūras baseinā, Amerikas ziemeļrietumos un Āfrikas austrumu augstienēs. *Trifolium* ģints sugas biotopi ietver gan pļavas, gan prērijas, gan atklātos mežus un pustuksnešus, kā arī Alpu virsotnes. Šo dažādo biotopu kopīgā iezīme ir augsts saules starojums, jo maza daļa no *Trifolium* ģints sugām spēj augt ēnā. Aktīvi tiek kultivētas 16 *Trifolium* ģints sugas, kas priekš vienas ģints ir raksturojams kā liels skaits (Taylor and Quesenberry 1996; Ellison et. al. 2006; Hirakawa et. al. 2016).

Hromosomu skaits ir aprakstīts 184 sugām – vairāk nekā 80% ir  $2n=16$ . Aneploīdija ir raksturīga 31 sugai. Poliploīdija ir raksturīga 24 sugām, no kurām sešas ir tetraploīdas, divas heksaploīdas un viena dodekaploīda. Ir zināms, ka 125 sugas aug simbiozē ar slāpekli fiksējošām baktērijām (Marshall et. al. 1995; Ellison et. al. 2006; Badr et. al. 2012; McClearn et. al. 2019).

## 1.2. Ložņu āboliņa *Trifolium repens* L. apraksts

*Trifolium repens* L. ir bieži pētījumos izmantots modeļobjekts. Ložņu āboliņš (1. att.) ir daudzgadīgs svešapputes augs. Tā ziedi pārsvarā ir balti, tomēr krāsa var atšķirties no rozā, līdz sarkanai un pat violetai. Tas spēj saražot lielu biomasu – no viena hektāra ir iespējams iegūt 45000–60000 kg svaigas zāles. Pēc nopļaušanas zālājs veiksmīgi atjaunojas īsā laika intervālā. Neskatoties uz plašo izplatību, tā adaptācijas diapazons ir ierobežots (Caradus 1994; Cain et. al. 1995; Cogan et. al. 2006; Badr et. al. 2012; Shang et. al. 2019).



1. attēls. Ložņu āboliņa *Trifolium repens* L. morfoloģija (Maclef 1891).

Figure 1. Morphology of white clover *Trifolium repens* L. (Maclef 1891).

*Trifolium repens* L. jeb ložņu āboliņš spēj fiksēt slāpekli, tādējādi tiek samazināts neorganiskā slāpekļa mēslošanas līdzekļu daudzums. Augstas kvalitātes lopbarības dēļ to audzē lopu ziemas barībai, īpaši piena fermās. Tas spēj palielināt piena produkciju par 15–20% (1,4 kg piena diennaktī). *T. repens* jauktā veidā kopā ar dažādām graudzālēm izmanto sēklu maisījumos laba zālāja veidošanā. To izmanto stādot ganības, veidojot ganību sienu, kā arī mauriņu ierīkošanai. Tam ir svarīga loma vilnas, piena un gaļas kvalitātē, jo tas tiek sēts kā produktīvs barības avots lopiem. *T. repens* izmanto arī kā papildus barības piedevu, jo ir konstatēts, ka tas ievērojami uzlabo piena kvalitāti. Tam ir augsta uzturvērtība, jo tajā ir augsts olbaltumvielu un minerālvielu saturs. Ir zināms, ka *T. repens* spēj uzkrāt dažādus metālus, piemēram, kadmiju un cinku. Pastāv vairāk nekā simts *T. repens* šķirņu. Vides speciālisti, parku un dārzu dizaineri visbiežāk izvēlas *T. repens*, ņemot vērā tā īpašības, piemēram, zemes laukuma blīvu pārklāšanu, izturību pret samīšanu, augšanu platumā (nevis augstumā), kā arī estētisko faktoru. Suga, turklāt, ir izturīga pret noēnojumu, tādēļ to bieži izmanto augļu dārzos,

lai veidotu zālienu laukumus (Marshall et. al. 1995; Badr et. al. 2012; McClearn et. al. 2019; Ünal et. al. 2020; Ahmad and Zeb 2021).

### **1.2.1. Ložņu āboliņa *Trifolium repens* L. izplatība**

Suga ir plaši izplatīta Eiropā, Rietumāzijā un Ziemeļāfrikā. Tiek uzskatīts, ka tā ir cēlusies Vidusjūras reģionā, agrīnā Miocēna periodā, pirms 16–23 miljoniem gadu. Pateicoties dzīvnieku un cilvēku migrācijai *T. repens* tika izplatīts visā Eiropā un Rietumāzijā. *T. repens* domestikācija sākās aptuveni 400 gadu atpakaļ. Suga mēdz aklimatizēties arī tādos pasaules reģionos, kur nokrišņu daudzums gadā pārsniedz 750 mm. Tā izplatība ir plaša, pateicoties edafiskajai tolerances – tas spēj augt gan izteikti skābā, gan kaļķainā augsnē (Ellison et. al. 2006; Williams et. al. 2012; Ahmad and Zeb 2021).

Mūsdienās ložņu āboliņš ir dabīgās floras sastāvā gan Eiropā, gan Āzijas dienvidos un dienvidrietumos, Sibīrijā, Ķīnā un Āfrikas ziemeļos. Tas ir ievests pasaules mērenākajos apgabalos, kā arī ir dabīgi sastopams Jaunzēlandē, Austrālijā, Japānā, ASV, Kanādā, Dienvidāfrikā un Dienvidamerikā. *T. repens* aug arī tropos – Indonēzijā, Papua-Jaungvinejā un Kolumbijā. Suga ir spējīga augt arī 6000 m augstumā, piemēram, Himalaju kalnos (Caradus 1994).

### **1.3. UV-B starojuma palielināšanās kā klimata izmaiņu sekas**

Klimata izmaiņas var netieši ietekmēt UV starojuma līmeni, mainot ozona, UV absorbējošo troposfēras gāzu, aerosolu un mākoņu daudzumu atmosfērā. Stratosfēras ozona noārdīšanās izraisa paaugstinātu ultravioletā-B starojuma līmeni uz zemes virsmas. Svarīgas ir arī Zemes virsmu atstarojošās izmaiņas vai nu okeānu ledus vai ledus "cepuru" kušanas, kā arī sniega segas samazināšanās dēļ. Stratosfēras atdzišana, ko izraisa paaugstināta CO<sub>2</sub> un citu gāzu koncentrācija, nākotnē izraisīs augstāku ozona koncentrāciju. Tiek prognozēts, ka klimata pārmaiņas nākotnē samazinās mākoņu daudzumu tropu un vidējos platumu grādos, galvenokārt samazinoties zemo mākoņu daudzumam. Lielākajos platumu grādos mākoņu sega prognozēta lielāka, kas palielinātu saules UV starojumu, kas, savukārt, tiktu izkliedēts atpakaļ kosmosā, tādējādi samazinātu UV starojuma intensitāti, kurš nonāk Zemes virsmā. Mākoņiem ir izšķiroša loma klimata sistēmā, neitralizējot globālo sasilšanu, tomēr tie var arī veicināt troposfēras sasilšanu, absorbējot no virsmas izdalīto infrasarkanā starojumu. Ledus un sniega segas samazināšanās var ietekmēt ekosistēmu pakļaušanu UV starojumam. Tas galvenokārt notiek divos veidos: mazāks UV starojums nonāk Zemes virsmas teritorijās, samazinātas virsmas atstarošanās dēļ; lielāka UV starojuma iedarbība teritorijās, kuras agrāk atradās zem ledus vai sniega, ja šis ledus vai sniegs samazinās vai izzūd. Šādos apstākļos vienas sezonas laikā okeāna sistēmā nonāktu par 40% vairāk saules radiācijas (Hofmann et. al. 2003; Bais et. al. 2015).

Svarīgs faktors, kas nosaka UV starojuma intensitāti uz Zemes virsmas, ir atmosfēras ozons, kas absorbē UV starojumu. Klimata pārmaiņu sekām ir liela ietekme. Pēdējo trīsdesmit gadu laikā UV starojuma intensitāti ietekmēja aerosolu un mākoņu samazināšanās, virsmas atstarošanas spējas, kā arī saules aktivitāte. Tiek prognozēts, ka līdz 21. gadsimta beigām vidējā gaisa temperatūra paaugstināsies līdz 1,5°C zemā un līdz 4,8°C augstā siltumnīcas efekta izraisīto gāzu emisijas scenārijā (IPCC 2018). Daži avoti sniedz prognozes, ka ozons līdz 2100. gadam atjaunosies, tomēr daži apraksta, ka kopš 1970. gada novērotā mākoņu seguma samazināšanās tendence Vidusjūras baseinā turpināsies arī 21. gadsimtā, vienlaikus samazinoties arī nokrišņiem un pieaugot UV starojuma intensitātei. Prognozes uz 21. gadsimta beigām (2090.–2100. gadi attiecībā pret 2010.–2020. gadiem) ir sekojošas: ozona atjaunošanās (samazinoties ozona noārdošajām vielām un palielinoties siltumnīcas efekta gāzēm) izraisīta UV starojuma samazināšanās, kas visaugstākā būtu (līdz 40%) virs Antarktīdas. Samazināšanās būtu neliela (mazāk nekā 10%) ārpus dienvidu polārajiem reģioniem. Iespējamā saules aktivitātes samazināšanās 21. gadsimtā var netieši ietekmēt UV-B starojumu uz Zemes virsmas, pateicoties izmaiņām stratosfēras ozonā; paredzētās mākoņu segas izmaiņas radītu salīdzinoši nelielas (mazāk nekā 3%) sekas, izņemot ziemeļu augstākajos platumu grādos, kur mākoņu segas palielināšanās varētu izraisīt UV starojuma samazināšanos līdz 7%; refleksivitātes samazināšanās jūras ledus kušanas dēļ Arktikā izraisītu UV starojuma samazināšanos par 2–3%. Izkususi okeāna virsma, kuru agrāk klāja ledus, būtu pakļauta pat līdz 10 reizēm spēcīgākam UV-B starojumam; paredzamā gaisa kvalitātes uzlabošanās un aerosolu samazināšanās ziemeļu puslodes apdzīvotākajos apgabalos varētu izraisīt UV starojuma pieaugumu par 10–20%, izņemot Ķīnu, kur tiek prognozēts vēl lielāks pieaugums. Prognozētais aerosola efekts dienvidu puslodē ir mazs, tomēr aerosolu samazināšanās, iespējams, ir vissvarīgākais faktors nākotnes UV intensitātes līmeņa pieaugumam apdzīvotās vietās. UV starojuma absorbcija, pateicoties ozonam ir dominējošais faktors, kas kontrolē virsmas UV-B (280-315 nm) starojuma līmeni, pie nosacījuma, ka stratosfērā nav konstatēti mākoņi un ir zems aerosola līmenis. Tomēr siltumnīcas efekta gāzu koncentrācija turpina pieaugt. Kopš 2000. gada novēro ozona slāņa atjaunošanos, tomēr mainīgā atmosfēra, mērījumu nenoteiktība un klimata pārmaiņas kavē ticamu rezultātu iegūšanu. 2010. gadā novērotas neparasti augstas ozona vērtības, tomēr 2011. gadā tās bija salīdzinoši zemas. Šo lielo variāciju dēļ ozona līmeņa pieaugums nav skaitāms kā statistiski nozīmīgs (Solecki and Marcotullio 2013; Bais et. al. 2015; Oliveira et. al. 2019; Romero-Román et. al. 2021).

#### **1.4. Ģenētiskie marķieri**

Visbiežāk izmantotie ģenētiskie marķieri ir morfoloģiskie marķieri, molekulārie marķieri (DNS vai RNS) un bioķīmiskie marķieri (izozīmi, proteīni). Labs ģenētiskais marķieris ir

polimorfs, multialēlisks, kodominants, ne-epistātisks un neitrāls. Marķieris jeb ģenētiskais marķieris ir sinonīms vārdam marķiera lokuss (*marker locus*). Gandrīz visi molekulārie polimorfismi ir neitrāli, nejūtīgi pret apkārtējo vidi: genotipu var noteikt pēc fenotipa, neatkarīgi no tā, kāda ir vides ietekme. Molekulāri polimorfismi var būt klasificēti divās kategorijās: sekvenču polimorfisms (nukleotīda aizstāšana, delēcija, insercija) un tandēmu atkātojums. Elektroforēzes attīstība 1970. gados revolucionēja populāciju ģenētiku (Vienne 1998).

### 1.5. Mobilie ģenētiskie elementi

Transpozoni jeb mobilie ģenētiskie elementi ir genoma segmenti, kuri ir spējīgi pārvietoties no vienas vietas uz citu. Šie segmenti aizņem lielāko daļu no augu genoma. Transpozoni ir daļēji neatkarīga vienība, kurai raksturīga patstāvīga eksistēšana un reproducēšanās. Tie ir analogi patogēniem, jo saimnieka organisms kalpo tikai kā dzīves cikla veikšanas iespēja. Transpozonu pārvietojumiem var būt un var arī nebūt ietekme uz saimnieka organismu. Daļu no auga organisma veido meristēmas, tāpēc, ja transpozona kustība ir notikusi meristēmas daļā, tā var ietekmēt nākamās auga pēcnācējus, jo jaunizveidotā pazīme tiek nodota tālāk. Transpozonus 1950. gados atklāja Barbara McClintock, kura ierosināja, ka šie elementi spēj kontrolēt gēnu ekspresiju un spēlē svarīgu lomu evolūcijā. Kaut gan šī koncepcija vēl vairākus gadus netika atbalstīta, sakot, ka transpozoni ir nevajadzīgas, nefunkcionālas daļas genomā, tomēr turpmākie atklājumi deva izpratni par to, ka tiem ir nozīmīga loma genoma evolūcijā vairākos līmeņos, sākot no genoma (kopējā kodola satura, hromatīna struktūras, rekombinācijas, RNAi) līdz lokālajiem efektiem (hromosomu pārkārtošanās, blakus gēnu regulēšana, atsevišķu transponējamo elementu sekvenču spēja veidot jaunus gēnus, transponējamo elementu mediētu gēnu dubultošanās). Transponējamo elementu liela mēroga amplifikācija var novest pie ļoti liela kopiju skaita augu genomā, bieži vien īsos evolūcijas termiņos. Piemēram, kukurūzā retrotranspozonu atkātojumi pēdējo 6 miljonu gadu laikā sasniedz aptuveni pusi no mūsdienu kukurūzas genoma. *Oryza australiensis* trīs LTR retrotranspozonu grupu palielināšanās pēdējo 3 miljonu gadu laikā ir divkārt palielinājusi genoma izmēru, salīdzinot ar *Oryza sativa*. Transponējamie elementi koevolucionē kopā ar savu saimniekorganismu. Dažos gadījumos tie var arī radīt priekšrocības saimniekorganismam (Awise 2004; Kejnocky et. al. 2012; Grotewold et. al. 2015).

Gandrīz visi transpozoni ir raksturoti un pētīti kultūraugos; par transpozonu ietekmi dabā ir maz informācijas. Tādējādi transpozonu ilgtermiņa ietekme dabā balstās uz laboratoriskajiem pētījumiem kultūraugos. Ir skaidrs, ka transpozoniem ir bijusi svarīga loma evolūcijā, jo tie ir mutagēni, un mutācija ir evolūcijas izejviela. Tomēr transpozonu nozīme salīdzinājumā ar citiem mutagēniem un apstākļi, kādos tie ir svarīgi, joprojām nav zināmi. Transpozona aktivitāti

var izraisīt vides stress, ar ko, domājams, saskaras lielākā daļa dabisko augu populāciju. Turklāt divu ļoti dažādu vecāku augu (piemēram, dažādu sugu) krustojums var stimulēt transpozonu pārvietošanos, iespējams, mainot DNS metilēšanas stāvokli. Laboratorijā transpozonus var aktivizēt ar mutaģenēzi, audu kultūrām un augu transformāciju. Transpozonu spēju izraisīt gēnu vai gēnu fragmentu pārvietošanos, modificēt gēnu ekspresiju un radīt jaunus gēnus var uzskatīt par noderīgu ģenētiskai uzlabošanai, kā arī par instrumentu augu fizioloģisko, bioķīmisko un ģenētisko īpašību pētīšanā (Grotewold et. al. 2015).

Transpozonu uzkrāšanās genomā paātrina organisma evolūciju. Ir aprakstīti mehānismi, kas, piemēram, baktērijās ir spējīgi atbrīvoties no transpozonu ievietojumiem. Kaut arī šie mehānismi efektīvi apklusina lielāko daļu transpozonu genomā, transpozoni periodiski izvairās no noklusināšanās un notiek amplifikācijas pārrāvumi, īpaši retrotranspozonu vidū. Citiem vārdiem sakot, transpozoni dažreiz sāk pārņemt genomu. Notikumi, kas izraisa šādu epiģenētisko darbību, nav pietiekami labi izprotami. McClintock izteica hipotēzi, ka transpozoni varētu pārvietoties, reaģējot uz vides radītu stresu, un tādējādi tie spēj nodrošināt daudzveidību dabiskā vai mākslīgā atlasē (Grotewold et. al. 2015).

Ir zināms, ka vides stress, piemēram, augsta temperatūra vai sausums, var mainīt mobilo elementu epiģenētisko kontroli un ļaut tiem palielināties kopiju skaitā. Poliploidija arī spēj veicināt transpozona aktivitāti. Kaut arī samazināta epiģenētiskā kontrole var aktivizēt visus transpozonus, biežāk tā attiecas uz vienu elementu klasi, tāpēc atsevišķai augu sugai būs raksturīgs milzīgs vienas konkrētas transpozonu grupas kopiju skaits. Parasti epiģenētiskie mehānismi ir specifiski konkrētām DNS sekvencēm. Tādējādi, kad elements pirmo reizi parādās genomā, tas netiek kontrolēts, bet, atkārtoties un sākot uzkrāties kopijām, milzīgais kopiju veidošanās skaits izraisa visu jauno elementu inaktivāciju. Pēc inaktivācijas transpozoni pakāpeniski tiek zaudēti rekombinācijas vai delēcijas dēļ. Tā kā DNS zudumu daļēji veicina rekombinācija, no tā izriet, ka transpozona zudums ir lēnāks reģionos ar zemu rekombināciju, piemēram, hromosomu galos un centromēriskajā reģionā. Šajos reģionos transponējamie elementi var saglabāties visbiežāk neaktīvā stāvoklī ilgstošu laika periodu. Neatkarīgi no tā, vai epiģenētiskie mehānismi attīstījās kā transpozonu kontroles mehānisms, vai transpozoni uzkrājas, reaģējot uz epiģenētiskajām kontrolēm (vai abos gadījumos), epiģenētika un transpozons ir cieši saistīti. Visi transpozoni sasniedz vienu efektu – inaktivē gēnu, kurā tas ievietojas. Tas var notikt dažādos veidos atkarībā no ievietojuma lokusa (Grotewold et. al. 2015).

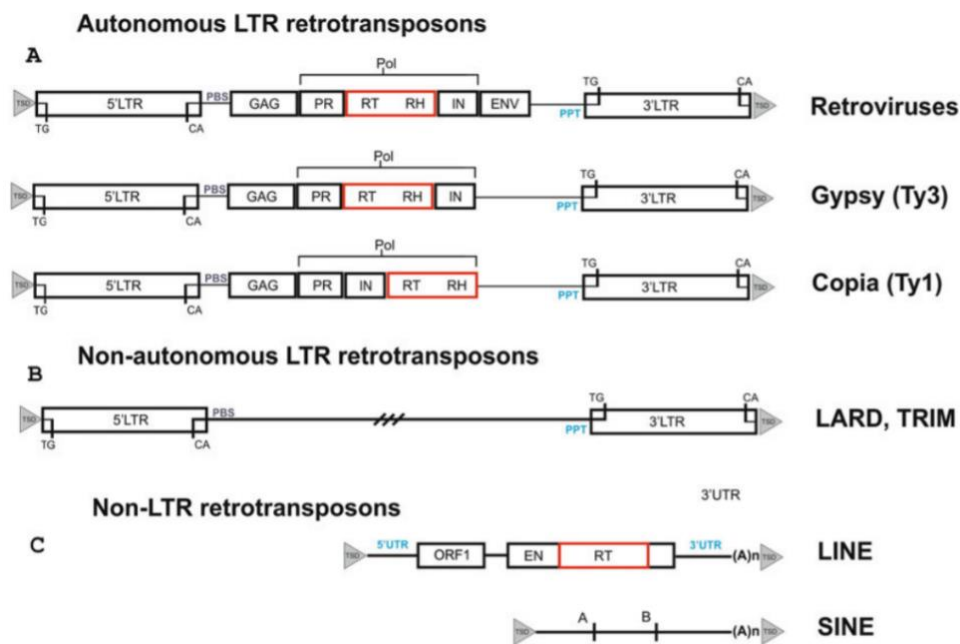
### 1.5.1. Retrotranspozoni

Galvenās transponējamo elementu klases ir “kopēšanas-ielīmēšanas” retrotranspozoni (RNS elementi), “izgriešanas-ielīmēšanas” transpozoni (DNS elementi) un helitroni. Helitroni ir maz izpētīti. Retrotranspozonus iedala I klases elementos, bet DNS elementus – II klases elementos. Pirmās klases elementi visbiežāk ir sastopami eikariotos, tomēr otrās klases elementi biežāk ir sastopami baktērijās un zemākajos eikariotos. Augos I klases elementi (īpaši LTR retrotranspozoni) aizņem lielāko daļu no visiem mobilajiem ģenētiskajiem elementiem. Gan I klases, gan II klases elementi var būt tālāk iedalīti autonomos, kas kodē transpozāzi un var vadīt paši savu kustību, un neautonomos elementos (2. att.), kuri tiek atvasināti no autonomajiem elementiem delēcijas rezultātā un var pārvietoties tikai tad, ja tam blakus ir autonomš elements. DNS elementi pārvietojas, izmantojot “izgriešanas-ielīmēšanas” principu, tādējādi sevi pārnesot uz citu vietu genomā. Šiem elementiem ir tieksme sevi pārvietot, veidojot mutācijas, visbiežāk gēnu tuvumā (Avisé 2004; Kejnocsy et. al. 2012; Grotewold et. al. 2015).

Retrotranspozoni – “kopēšanas-ielīmēšanas” elementi ir sastopami visos eikariotos, kas liecina par to seno izcelsmi. Retrotranspozoni pēc struktūras ir līdzīgi retrovīrusiem, kuriem tie ir tuvu radniecīgi. Tie sastāda 50–80% no kukurūzas genoma un 90% no kviešu genoma un pat aptuveni 40% no zīdītāju genoma, tai skaitā cilvēka. Tāpat kā retrovīrusi, retrotranspozoni satur sekvenšes, kuras kodē atgriezenisko transkriptāzi (RT) un ribonukleāzi H (RNāze H), kuri ir nepieciešami replikācijai un transkripcijai. Retrotranspozoni, tāpat kā retrovīrusi, kodē proteīnu gag (glikozaminoglikāns), kurš iekapsulē transpozona RNS blakus proteīnam, kas ir nepieciešams insercijas veikšanai genomā, veidojot vīrusveidīgu daļiņu. Atšķirībā no retrovīrusiem, retrotranspozoni nespēj pamest šūnu, kurā tie atrodas. Retrotranspozoni transkribējas uz RNS un tad veic reverso transkripciju uz DNS, pēc kā ievietojas genomā. Tā kā iepriekšējais fragments paliek genomā arī pēc replikācijas, kopiju numurs pieaug. Sakarā ar to, ka retrotranspozoni tiek transponēti replikācijas ceļā, tie var ātri uzkrāties; to skaitļi korelē ar genoma lielumu. Šiem elementiem ir tieksme uzkrāties starp gēniem, tāpēc tie ietekmē vispārīgo genoma arhitektūru (Avisé 2004; Grotewold et. al. 2015; Kalendar et. al. 2020).

I klases RNS elementus var iedalīt divās lielās grupās, atkarībā no DNS sekvencēm to galos. Vienā no grupām transpozona 5' un 3' galiem ir identiskas DNS sekvenšes no aptuveni simts līdz vairākiem tūkstošiem bāzes pāru; šīs sekvenšes ir pazīstamas kā gari termināli atkārtojumi (LTR). Otrai retrotranspozonu grupai šo atkārtojumu nav. Pirmā grupa ir LTR (*long terminal repeat*) retrotranspozoni; otrā – *non-LTR* retrotranspozoni (dažreiz tos sauc par retropozoniem), kas ietver garos un īsos interpresētos elementus (LINEs un SINEs). DIRS līdzīgie elementi (*Dictyostelium* starpnieka atkārtojuma sekvenšes) pārstāv trešo

retrotranspozonu apakšklasi, kas tiek integrēta caur elementa kodētu tirozīna rekombināzi. Tie ir salīdzinoši daudz izplatīti dzīvniekiem un sēnēm, bet ziedošos augos vēl nav atrasti (Avisé 2004; Kejnocsy et. al. 2012; Grotewold et. al. 2015).

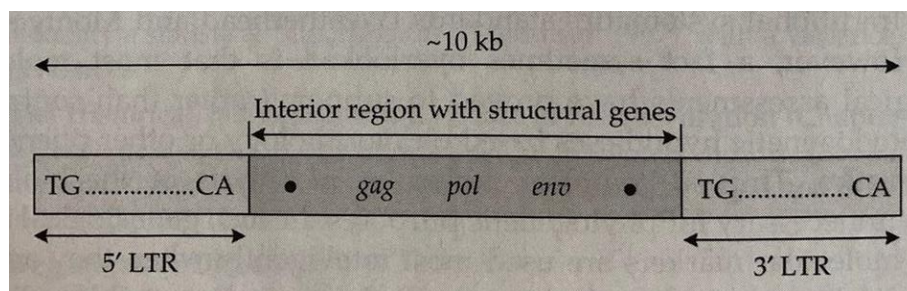


2. attēls. Galvenās autonomo un neautonomo retrotranspozonu grupas un to arhitektūra (Kalendar 2020).

Figure 2. The main groups of autonomous and nonautonomous retrotransposons and its architecture (Kalendar 2020).

### 1.5.1.1. Garo sekvenču atkārtojumu (LTR) retrotranspozoni

Garos sekvenču atkārtojumu retrotranspozoni, salīdzinot ar dzīvniekiem, augos ir sastopami plaši, kā arī ir labi raksturoti. Katrs LTR retrotranspozons ir viena transkripcijas vienība, kuras transkripcija sākas pirmā LTR 5' galā un beidzas otrā, pretēji vērsta LTR 3' galā. Šīs vienības ietvaros ir trīs daudzfunkcionāli gēni – gag, pol un env (3. att.). pol kodē Pol prekursora olbaltumvielu, kas sastāv no vairākiem dažādiem funkcionālajiem proteīniem. Pol satur proteāzi (PR), kas šķel prekursora proteīnu funkcionālajās vienībās. Pol kodē arī RT, RNāzi H un integrāzi (INT). Tie ļauj replicēt visu LTR transkriptu. Dažos elementos visi gēni atrodas vienā lasīšanas rāmī, turpretī citos šie lasīšanas rāmji pārklājas, tāpēc translācija ir jāpārtrauc un jāsāk jaunajā (Kejnocsy et. al. 2012).



3. attēls. Vispārējā LTR retrotranspozona struktūra (*gypsy*-elements) (Awise 2004).

Figure 3. General structure of LTR retrotransposon (*gypsy-like* element) (Awise 2004).

Elementa transkripcija notiek kodolā, kur tiek izveidots mRNS, kas tālāk tiek eksportēts uz citoplazmu, kur notiek translācija. Pēc tam gag proteīns veido vīrusam līdzīgu daļiņu, kurā notiek reversā transkripcija. Tālāk cDNS tiek atbrīvota kopā ar integrāzi, atgriezta kodolā un integrēta genomā. Genomu var sadalīt dažādās “hromosomu nišās”, kuras kolonizē dažādas atkārtotas sekvenču. Augu genoma konstruktīvie heterohromatiskie reģioni, piemēram, pericentromēriskie reģioni, "knobs" (heterohromatiskie reģioni hromosomās) un subtelomēras, atspoguļo hromosomu nišas, kurās lielāko daļu aizņem LTR retrotranspozoni. Turpretī lielākā daļa DNS transpozonu, it īpaši MITEs, atrodas augstāka blīvuma eihromatiskos reģionos, kuri visbiežāk atrodas gēnu tuvumā (Kalendar et. al. 2010; Kejnocsy et. al. 2012; Grotewold et. al. 2015).

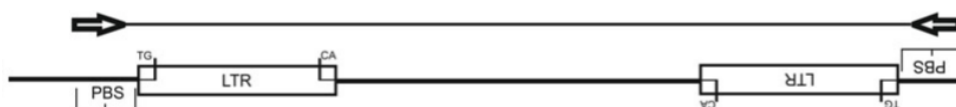
LTR retrotranspozoni dažreiz ievietojas sākotnējā transpozonā un izstumj LTR, izveidojot tandēmi atkārtotas sekvenču. Pēc šāda veida ievietošanās, nav iespējams saglabāt sākotnējā LTR pāra funkciju, tāpēc tie pamazām sāk uzkrāt mutācijas tā, ka sākotnējā 5' LTR secība nedaudz atšķiras no 3' LTR. LTR no oriģinālā retrotranspozona var atrasties tālu viens no otra genomā, iekšpusē ar LTR no otrā vecākā retrotranspozona un tamlīdzīgi. Tā kā oriģinālais retrotranspozons ir vecākais, tam būs visvairāk mutācijas un tādējādi tie būs daudz vairāk atšķirīgi nekā otrais vecākais retrotranspozons. Ievērojot mutāciju skaitu LTR pāros, ir iespējams iegūt aptuvenu laika aprēķinu retrotranspozonu masīvu vecumam (Kalendar et. al. 2010; Grotewold et. al. 2015).

Lai ņemtu vērā transponējamo elementu sadalījumu hromosomās, jāņem vērā vairākas mijiedarbības, kas darbojas ievietošanās laikā un bieži vien ilgi arī pēc ievietošanās. Dabiskā izlase veicina labvēlīgu ievietošanu fiksēšanu un kaitīgu ievietošanu izslēgšanu no populācijas. Daži elementi tiek arī izdzēsti vai rekombinēti. Aizstāšanas, delēcijas un rekombinācijas var notikt dažādos ātrumos, kas atšķiras gan starp hromosomām, piemēram, zema rekombinācija peri-centromēriskos reģionos, gan starp sugām. Bieži ir grūti atšķirt šo dažādo mijiedarbību relatīvo nozīmi transponējamo elementu uzkrāšanās laikā.

Ievietošanās biežāk ir sastopamas jaunākos mobilo daļiņu ievietojumos, savukārt rekombinācijas un delēcijas procesi kļūst nozīmīgāki, kad transponējamie mobilie elementi kļūst vecāki un uzkrājas genomā. Retrotranspozonu amplifikācija ir mehānisms, ar kura palīdzību genoma lielums var daudzkārt palielināties. Tomēr, retrotranspozoni var veikt arī genoma lieluma samazināšanos. Rekombinācija var notikt starp retrotranspozonu LTR, izraisot lielu DNS gabalu izgriešanu. Pēc šādas rekombinācijas paliek tikai viens LTR. Starp LTR retrotranspozoniem divas galvenās klases ir *Ty1-copia* un *Ty3-gypsy*. Tie viens no otra atšķiras pēc sekvenču kā arī kodēto gēnu secībā. *Ty3-gypsy* integrāzes gēns (INT) ir 3' no RNAzes H (RH). Tomēr *Ty1-copia* elementos INT ir starp PR un RT. Transponējamo elementu vecums un hromosomu sadalījums norāda, ka *Ty1-copia* elementi genomā ir integrēti salīdzinoši nejauši, tomēr *gypsy-like* elementi ievietojas visbiežāk pericentromēriskajā heterohromatīnā – reģionos, kas atrodas tālu no gēniem. Turpretī *Ty1-copia* elementi galvenokārt tiek atrasti gēnu tuvumā (Kalendar et. al. 2010; Grotewold et. al. 2015).

### 1.5.2. Uz retrotranspozoniem balstīta iPBS metode

Molekulārajiem marķieriem ir svarīga loma augu un dzīvnieku pētījumos. LTR retrotranspozoni ir labi piemēroti kā molekulārie marķieri. Tie ir izklaidēti un sastopami visā genomā. PBS (*primer binding site*) ir gandrīz universāla tRNS sekvenču LTR retrotranspozonos. PBS izmantošana dod vairākas priekšrocības. Pirmkārt, tas ir universāls, jo ir atrodams praktiski visos retrotranspozonos, ieskaitot TRIM (*terminal-repeat retrotransposons in miniature*) un LARD (*large retrotransposon derivative*), kuriem nav iekšējo kodēšanas domēnu. Otrkārt, to var izmantot gan retrotranspozonu klonēšanai, gan to ievietošanas vietu atspoguļošanai. Treškārt, PBS atrodas blakus LTR, atvieglojot tā noteikšanu. Kā arī, izmantojot salīdzinoši nelielu praimeru klāstu, metode var tikt izmantota praktiski visos organismos. Retrotranspozona kā marķiera vienkārša analītiskā sistēma ir papildus priekšrocība. Metode ir balstīta uz praktiski universālu tRNS komplementa kā reversās transkriptāzes praimera saistīšanās vietas (PBS) klātbūtni LTR retrotranspozonos (4. att.). Metode pielietojama gan *gypsy* gan *copia* elementiem, kā arī LARD un TRIM elementiem gan dzīvniekos, gan augos. Svarīga priekšrocība ir tāda, ka nav nepieciešams zināt sekvenču secību (Kalendar et. al. 2010).



4. attēls. iPBS amplifikācijas shēma (Kalendar 2020).

Figure 4. The iPBS amplification scheme (Kalendar 2020).

## 1.6. Kallusu kultūra

Augu audu kultūrām ir svarīga loma zinātnē un komerciālajā pielietojumā. Lielākajā daļā augu dzimtu ir iespēja no ievainotiem auga audiem iegūt kallusu – mīkstu, amorfu šūnu masu, kas no kambija šūnām veidojas virs ievainotas auga virsmas. Kallusa kultūra ir dediferencētu augu šūnu kultūra, ko inducē *in vitro* barotnē mainot fitohormonu koncentrāciju. Spēja reģenerēt visu augu *in vitro* kultūrās ir svarīgs mērķis, jo šādus augus var izmantot ģenētiskos pētījumos. Gandrīz jebkuru auga daļu var izmantot kallusa kultūru veidošanai. Kallusu parasti iniciē agara barotnē *in vitro* apstākļos, tam pievienojot augšanas hormonus (aukstīnus, citokinīnus). Kallusa šūnas regulāri pārstāda jaunā barotnē, nodrošinot barības vielu pieejamību, tādējādi tās var kultivēt bezgalīgi ilgi. Kallusa šūnas ir līdzīgas nediferencētām meristēmiskām šūnām; tām ir mazas vakuolas un trūkst hloroplastu fotosintēzei. Dažām kallusa kultūrām ir nepieciešami pilnīgas tumsas augšanas apstākļi, turklāt citas spēj veidoties noteiktos dienas un nakts apstākļos, piemēram, atrodoties 16 stundas gaismā un 8 stundas tumsā. Kallusa kultūras parasti aug 25°C. Tās ir pietiekami viendabīgas, tāpēc ir iespēja pavairot identisku augu kopijas ar vēlamajām īpašībām (Yamada et. al. 1993; Srivastava et. al. 2014; Efferth 2019).

Kalluss ir identificēts kā audi ar vislielāko transponējamo elementu (TE) skaitu. Pasīvu transpozonu aktivizēšana norāda, ka kultivēšanas procesā notiek epiģenētiskās izmaiņas. Process labi aprakstīts ir *Arabidopsis thaliana* L. TE aktivācija notiek epiģenētiskā kontrolē, ko sauc par RNS virzītu DNS metilāciju (RdDM) (Masuta et. al. 2017).

### 1.6.1. *Trifolium repens* L. kallusu veidošana

Bāze jebkurai *in vitro* kultūrai ir bāzes sāļu, organisko savienojumu, tai skaitā aminoskābju, vitamīnu un cukuru maisījums. Dažādiem mērķiem barotni var modificēt un pievienot, piemēram, fitohormonus. *Trifolium* ģints sugām bāzes barotnes, kuras izmanto *in vitro* kultūrām, ir B5, MS, L2 un EC6. L2 barotne tika veidota speciāli *Trifolium pratense* L., kur tika izmēģinātas 125 barotnes variācijas. L2 barotnei ir lielāks Ca, Mg saturs par citām barotnēm, piemēram, B5 vai MS, kā arī lielāks K un P saturs. Dažu mikroelementu lielums arī pārsniedz citas barotnes. *Trifolium repens* L. optimālākā barotne un fitohormonu sastāvs kallusa iniciēšanai nav pietiekami labi izpētīts, tomēr labi izpētīta ir tuvradniecīga suga sarkanais āboliņš *Trifolium pratense* L. Labākais variants no izpētītajiem izrādījās B5 barotne, kurai var tikt pievienoti vai nu NAA, vai 2,4D un kinetīns (Taylor and Quesenberry 1996).

## 1.7. Ploiditātes noteikšana ar plūsmas citometriju

Plūsmas citometrija ir metode DNS satura (genoma lieluma) mērīšanai augos. Vienkārša paraugu sagatavošana, ātra iegūšana un precīzi mērījumi ir padarījuši metodi populāru augu

šūnu bioloģijas, sistemātikas, evolūcijas, ģenētikas un biotehnoloģijas jomā. Ar tās palīdzību ir iespēja noteikt šūnas fenotipu un veikt dažādu tās īpašību izpēti, piemēram, nosakot šūnas ploīditāti. Analīze ir balstīta uz analizējamo šūnu gaismas izkliedēšanās īpašībām, kas ietver fluorescences emisijas. Fluorescence var tikt ierosināta, saistoties ar krāsvielām, vai konjugējot ar molekulām specifiskiem MAbs (*monoclonal antibodies*) jeb monoklonālām antivielām, kas atrodas šūnas iekšpusē vai uz šūnas virsmas. Plūsmas citometrija ļauj identificēt dažādus šūnu tipus nevienmērīgā populācijā. Mūsdienās ir iespējams analizēt 11 fluorescences krāsas. Ierīce spēj uztvert šūnas vai daļiņas, kad tās šķidrā plūsmā pārvietojas caur lāzera staru. Šūnas var marķēt ar fluorohromu saistītām antivielām vai krāsot ar fluorescējošām membrānu, citoplazmas vai kodola krāsvielām. Fluorohromiem, ko izmanto nukleīnskābju krāsošanai plūsmas citometrijā, ir vairāki pielietojumi, tostarp DNS kvantifikācija, membrānas integritātes novērtēšana, ploīdijas mērīšana un šūnu cikla analīze. Ir vairākas krāsvielas, ar kuru palīdzību var nokrāsot gan RNS, gan DNS, piemēram, etīdija bromīds (EB) un PI. EB un PI ievietoja starp bāzēm dubultspirāļu nukleīnskābēs. PI ierosina zilā gaisma (488 nm) un dod sarkanu fluorescenci. Plūsmas citometrs ir daudzparametru ierīce, kas katrā šūnā reģistrējot vairākus mērījumus, spēj nevienmērīgā populācijā identificēt viendabīgu apakšpopulāciju (Shapiro 2005; Macey 2007; Adan et. al. 2016; Bourge et. al. 2018).

Plūsmas citometra galvenie komponenti ir fluīdi, optika, elektroniskais tīkls un dators. Fluīdi ir atbildīgi par suspensijas novirzīšanu uz fokusēto gaismas avotu. Optika fokusē gaismas avotu uz šūnām/daļiņām, kamēr cita veida optika pārraida gaismas izkliedētās vai fluorescējošās daļiņas uz elektronisko tīklu. Tas, savukārt, uztver signālu un pārveido to par ciparu datiem, kas proporcionāli gaismas intensitātei. Tālāk dators analizē iegūtos datus. Ierīcē darbojas divi gaismas izkļiedes veidi – priekšējā izkļiede (FSC – *forward scatter*) un sānu izkļiede (SSC – *side scatter*). Faktori, kas ietekmē kopējo gaismas izkļiedi ir membrāna, kodols, šūnas granulitāte, šūnas forma un virsmas topogrāfija (Adan et. al. 2016).

Šūnas haploīditāti atzīmē ar  $n$ . Pilns homologu hromosomu spāru kopums ir pazīstams kā diploīds un diploīdu skaitlis ir  $2n$ . Homologu hromosomu pāru kopas ir pazīstamas kā ploīdija un tiek uzskaitītas kā  $4n$ ,  $8n$ ,  $16n$ ,  $32n$  un tamlīdzīgi. Pētījumi liecina, ka ploīdijas līmenis darbojas kā svarīga šūnu lieluma kontrole. Hromosomu dubultošanās var ļaut šūnām sasniegt lielus izmērus. Šis process ir plaši izplatīts augos. Daudzas augu sugas, īpaši kultivētās sugas, savas evolūcijas laikā ir ieguvuši poliploīdus genomus vai tika pakļauti poliploīdizācijai. Vairākas sugas, kas ir cēlušās no diploīdiem priekštečiem, ir kļuvuši par tetraploīdiem. Šie tetraploīdie augi ir garāki, tiem ir salīdzinoši lielāka zaļā masa un tie satur lielākas šūnas nekā to diploīdie priekšteči (Kondorosi et. al. 2000; Macey 2007).

Ir divu veidu poliploīdija – autoploīdija, kad visas hromosomu kopijas ir saņemtas no vienas sugas un alloploīdija, kad visas hromosomas ir saņemtas no vairāk nekā vienas sugas. Poliploīdi ir ar rezistenci pret inbrīdingu. *T. repens* ir allotetraploīds  $2n=4x=32$  augs. Tiek uzskatīts, ka tam ir alotetraploīdālā izcelsme no diviem senču genomiem. Pamatojoties uz tā spējām krustoties ar dažām tuvradniecīgām sugām, poliploīdais *T. repens* viens no priekštečiem varētu būt diploīdais *T. nigrescens* ( $2n = 16$ ) un otrs priekštecis varētu būt *T. occidentale* ( $2n = 16$ ) (5. att.) (Badr et. al. 2012). Cits avots apgalvo, ka tuvākie līdzšinējie diploīdie senči bija *T. pallescens* ( $2n = 2x = 16$ ) un *T. occidentale* ( $2n = 2x = 16$ ). *T. occidentale* galvenokārt ir pašapputeksnējošs augs ar šauru litorālu izplatību un adaptāciju. Tas ir sastopams tikai ļoti tuvu jūrai ierobežotos biotopos Eiropas jūras līča piekrastēs. *T. pallescens* ir svešapputes augs, kas Eiropā pašlaik sastopams tikai virs 1800 metriem augstumā Alpu kalnos. Pat pašos Alpu kalnos tam ir šaura adaptācijas zona (Williams et. al. 2012; Frankham et. al. 2017).

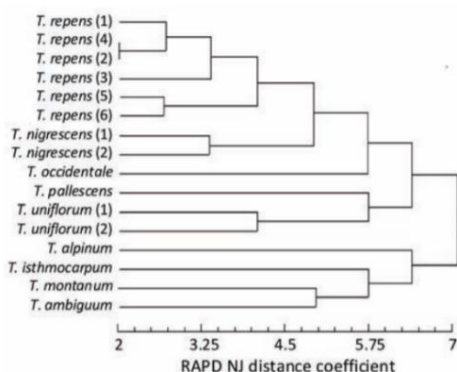


Fig. 3. NJ distance trees constructed using *NTSYS-PC*, illustrating the relationships between the accessions of white clover and related species in its gene pool based on the analysis of RAPD data.

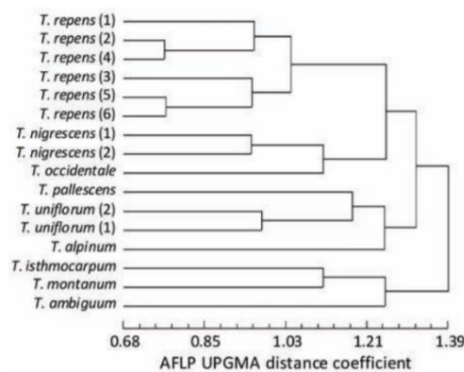


Fig. 4. UPGMA distance trees constructed using *NTSYS-PC*, illustrating the relationships between the accessions of white clover accessions and related species in its gene pool based on AFLP data.

5. attēls. Dažu *Trifolium* ģints sugu filoģenētiskie koki, izmantojot ģenētiskās distances koeficientus (pa kreisi – NJ, pa labi UPGMA), balstoties uz RAPD un AFLP marķieru datiem (Badr et. al. 2012).

Figure 5. Phylogenetic trees using genetic distance coefficients (left – NJ, right – UPGMA) of some species of the genus *Trifolium* based on RAPD and AFLP marker data (Badr et. al. 2012).

Poliploīdijas loma evolūcijā ir saistīta ar hibrīdo augu stabilizāciju no hibrīdās sterilitātes. Hromosomu dubultošanās var mainīt ziedu morfoloģiju un korelatīvi saistību starp ziediem un to apputeksnētājiem, piemēram, *Trifolium repens* L. gadījumā. Autotetraploīdiem ir garāks un platāks putekšņūcu garums par diploīdiem. Lai gan tetraploīdos ir lielāks nektāra daudzums (poliploīdos, salīdzinot ar diploīdiem ir 1,5–4,5 reizes lielāks nektāra daudzums), izmaiņas

zieda morfoloģijā apgrūtina medus bišu un citu kukaiņu apputeksnēšanu un lielākā daļa apputeksnētāju grupu dod priekšroku diploīdiem. Kamenes joprojām ir efektīvi tetraploīdālo augu apputeksnētāji. Ploidālā līmeņa paaugstināšanās var izraisīt ziedu skaita izmaiņas vienā ziedkopā, piemēram *Trifolium repens* L. tetraploīdiem ir aptuveni par 20% mazāk ziedu galviņā. Poliploīdija bieži maina izturību pret aukstumu. Tetraploīdam *Trifolium repens* L. ir zemāka izturība pret aukstuma stresu (Levin 1983).

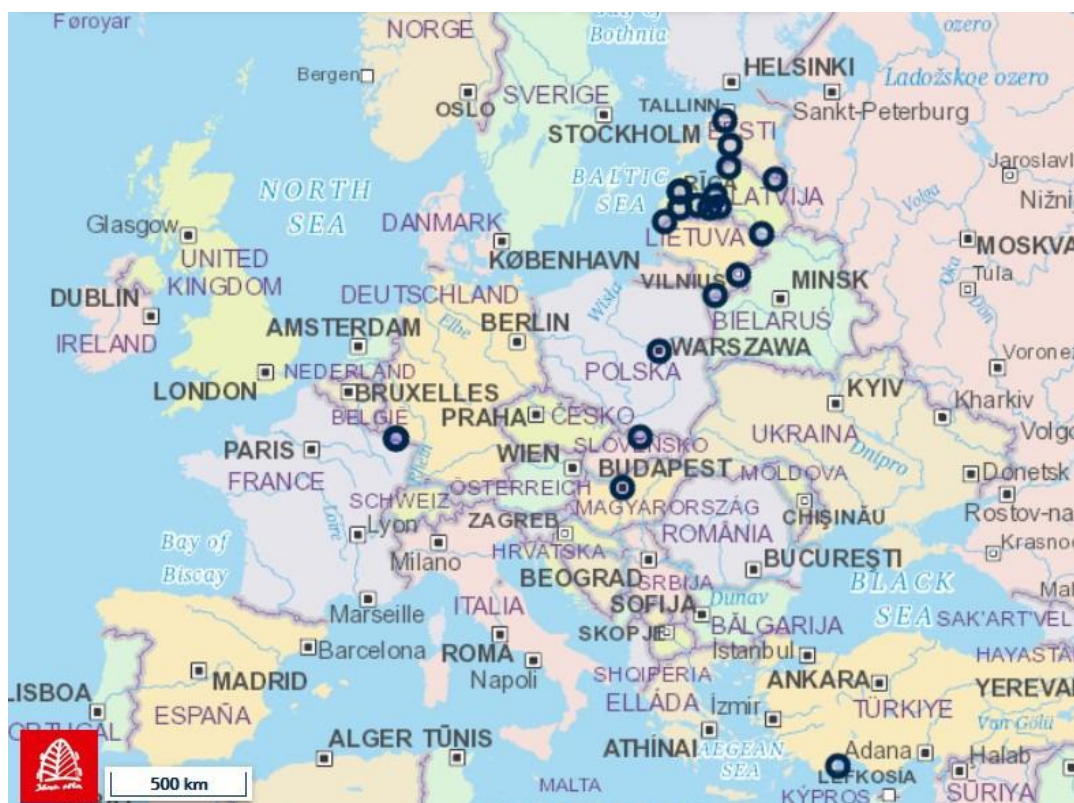
## 2. MATERIĀLI UN METODEDES

### 2.1. Materiāli

Maģistra darbs tika izstrādāts Latvijas Universitātes Bioloģijas institūtā no 2019. gada 24. maija līdz 2021. gada 31. maijam.

#### 2.1.1. Paraugu ievākšana

Maģistra darba laikā paraugi tika ievākti sešās Eiropas valstīs: Igaunijā no pilsētām Tori un Kerne, Lietuvā no Viļņas un Druskininkai, Polijā no Varšavas un Zakopanes, Ungārijā no Budapeštas, Francijā no Lotringas reģiona (6. att.). Tika ievākti paraugi arī no Turcijas kalniem, kur jau tiek apskatīta *T. repens* L. Vidusjūras populācija (Wu et. al. 2021). Latvijā paraugi tika ievākti desmit atradnēs: Ķekavā, Kuldīgā, Skrundā, Alūksnē, Staicelē, Rīgā, Priekulē, Jaunpilī, Daugavpilī un Jelgavā (7. att.). Visu izmantoto paraugu ievākšanas vietu koordinātas un apraksti ir pievienoti pielikumā (3. piel.).



6. attēls. Izmantotie *Trifolium repens* L. genotipi (Valsts zemes dienests 2012).

Figure 6. Used *Trifolium repens* L. genotypes (Valsts zemes dienests 2012).



7. attēls. Izmantotie *Trifolium repens* L. genotipi no Baltijas valstīm (Valsts zemes dienests 2012).

Figure 7. Used *Trifolium repens* L. genotypes from the Baltic States (Valsts zemes dienests 2012).

## 2.2. Metodes

### 2.2.1. DNS izdalīšana

Tika izdalīts DNS izmantojot CTAB DNS izdalīšanas protokolu (Doyle and Doyle 1987) (1. piel.). Protokols tika modificēts augstas DNS koncentrācijas iegūšanai, pielāgojoties *Trifolium repens* L. specifikai. Tika izmainīts pievienotā CTAB bufera tilpums no 600 µl uz 800 µl. Termomiksera rotācijas vienības tika izmainītas no 600 rpm uz 300 rpm. Arī hloroforma pievienotais tilpums tika izmainīts no 600 µl uz 800 µl. Tika noteikts supernatanta tilpums – 600 µl, kuram proporcionāli tika aprēķināts izpopropanola tilpums – 480 µl (4/5 no supernatanta tilpuma).

### 2.2.2. PCR reakcija

PCR tika veikta diviem praimeriem – iPBS 2076 (5'-GCTCCGATGCCA-3') un iPBS 2079 (5'-AGGTGGCGCCA-3'). Balstoties uz (Kalendar et al. 2010) rakstu, tika iestatīti 30 cikli, kur vienā no cikliem denaturācija ilga trīs minūtes pie 95,0°C temperatūras, praimeru pievienošanās ilga vienu minūti pie 50,1°C temperatūras, DNS polimerāzes darbībai tika

iestatīta viena minūte pie 68,0°C temperatūras un sintēze ilga desmit minūtes pie 72,0°C temperatūras.

### 2.2.3. Gēla elektroforēze

Izmantojot atbilstošu 25 kabatiņu formu, tika izveidots aptuveni 7 mm biezs agarozes gēls. Formas izmērs atbilda 20x20 cm. Uz iepriekšminēto tilpumu bija nepieciešams izmantot 240 ml 1xTAE bufera un 4,08 g agarozes pulvera (1,7%) (2. piel.). Agarozes un TAE bufera šķīdums tika kausēts izmantojot mikroviļņu krāsni. Pēc kausēšanas šķīdums tika atdzesēts līdz 60°C temperatūrai, izmantojot ūdens vannu.

Gēla elektroforēze ilga 18 stundas ar spriegumu 40 V, elektroforēzes vannu aizpildot ar 1xTAE buferi. Katrā gēla matricas kabatiņā tika pievienots 19 µl PCR produkta un krāsas šķīdums (uz 25 µl PCR produkta tika pievienoti 5 µl krāsas). Pirmajā vai pēdējā gēla matricas kabatiņā tika pievienoti 6 µl garuma marķiera.

Pēc elektroforēzes beigām gēla matrica uz 30 minūtēm tika ievietota etīdija bromīda šķīdumā (50 µl uz vienu litru dejonizēta H<sub>2</sub>O). Pēc krāsošanas etīdija bromīdā gēla matrica 15 minūtes tika skalota dejonizētā H<sub>2</sub>O, pēc kā tika ievietota UV gaismas kamerā DNS fragmentu vizualizēšanai.

### 2.2.4. Datu analīze ar NTSYSpc programmu

Datu analīzei tika izmantots izdalītais *Trifolium repens* L. DNS gan no bakalaura, gan maģistra darba apskatītajiem indivīdiem. Kopumā tika iegūts 431 analizējamais paraugs: 314 tika izdalīti maģistra darba tapšanas laikā un 117 – bakalaura darba laikā, kurā DNS tika izdalīts no trīs Slovērijas genotipiem (Pještjani, Bystrička un Dubrava), viena Ukrainas genotipa (Jaremče) un Latvijas komercšķirnes "Daile".

NTSYSpc ir programmu sistēma, ko izmanto, piemēram, lai spētu parādīt, vai datu atlase ir raksturīga vienai vai vairākām atšķirīgām populācijām. Darbā tika veikta galveno komponentu analīze jeb PCA, kas ir viena no ordinācijas analīzes metodēm. Tā konstruē jaunu ortogonālo koordinātu asu kopumu tā, lai punktu projekcijai uz tām būtu maksimāla dispersija pēc iespējas mazākās dimensijās. PCA standartizē datu matricu pēc rindām, aprēķina korelāciju matricu starp mainīgajiem, no korelācijas matricas izdala trīs vektorus, projektē standartizētos datus uz šiem vektoriem un pēc tam izveido trīsdimensiju objektu grafiku (Rohlf 1988; Podnieks 2020).

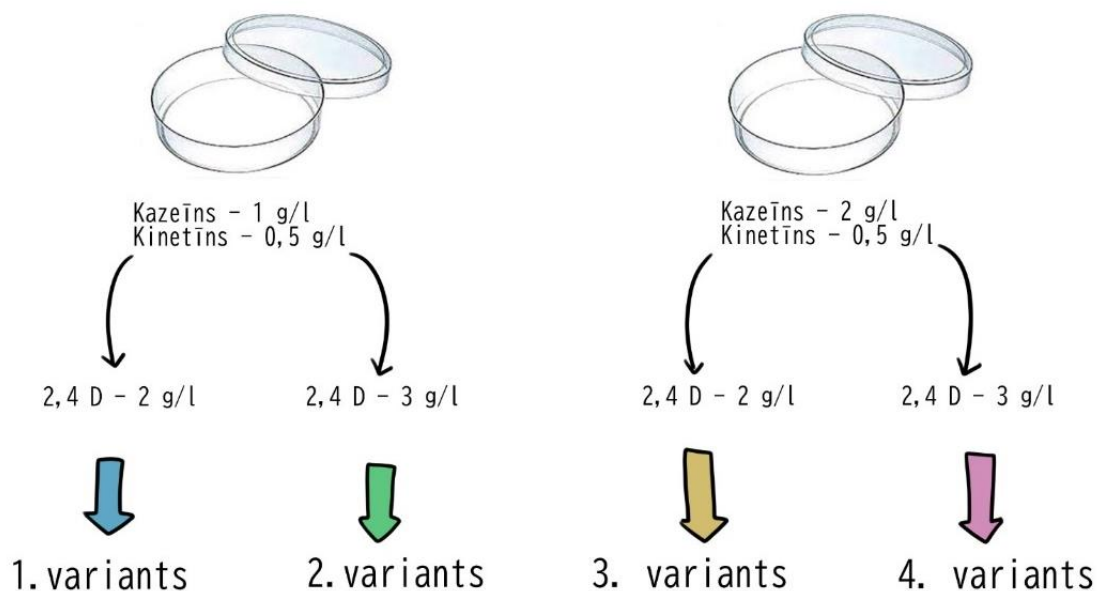
### 2.2.5. *Trifolium repens* L. kallusu izveide

Tika izmantots komercšķirnes "Daile" sēklu materiāls. Sēklas tika sterilizētas tās 30 minūtes turot un ik pa laikam apmaisot 0,7% kālija permanganāta šķīdumā, pēc kā tās trīs reizes tika skalotas ar dejonizētu ūdeni, tad 20 minūtes turētas nātrija hipohlorītā, pēc kā skalotas ar

autoklāvētu dejonizētu ūdeni laminārboksā. Pēc sterilizēšanas sēklas tika iestādītas Petri platēs ar 6% agaru. Pamatojoties uz vairākām publikācijām (Gresshoff 1980; Gustine 1981; Yamada et. al. 1993; Karadotcheva et. al. 1995), tika izvēlēta B5 barotne (4. piel.). Barotnei papildus tika pievienots kazeīns. Kallusa iniciēšanai tika izmantoti 2,4 D, kas ir sintētiskais auksīns, un kinetīns, kas ir sintētiskais citokinīns – fitohormoni. Pēc izdīgšanas dažādas auga daļas – hipokotils, lapas un stublājs tika iestādītas B5 barotnē ar dažādu fitohormonu koncentrāciju (8. att.). Kallusa iniciēšana notika tumsas apstākļos.

Tika izvēlētas vairākas *Trifolium repens* L. augu daļas (hipokotils, lapa un stublājs). Šīs daļas tika uzsētas gan no vienu nedēļu veciem dīgstiem, gan no divus mēnešus veciem *Trifolium repens* L. augiem, kuri tika audzēti L2 barotnē sterilos apstākļos. Kallusi jaunā barotnē tika pārstādīti ik pēc 3 nedēļām.

Kallusu iniciēšanai tika izmēģinātas četras fitohormonu koncentrācijas (8. att.) – pirmā: 1 g kazeīna un 2 mg 2,4 D, otrā: 1 g kazeīna un 3 mg 2,4 D, trešā: 2 g kazeīna un 2 mg 2,4 D un ceturtā: 2 g kazeīna un 3 mg 2,4 D. Vienā Petri platē tika iepilināti 20 ml barotnes un novietoti 20 auga fragmenti no dažādām augu daļām (hipokotils, stublājs, lapa) un no divām grupām (vienu nedēļu un divus mēnešus veciem augiem). No divus mēnešus veciem augiem netika izmantota hipokotila daļa. Kopumā tika izmantoti 200 augu indivīdi, no kuriem kopumā ieguva 720 fragmentus.



8. attēls. Kallusu iniciēšanas eksperimenta dizains.

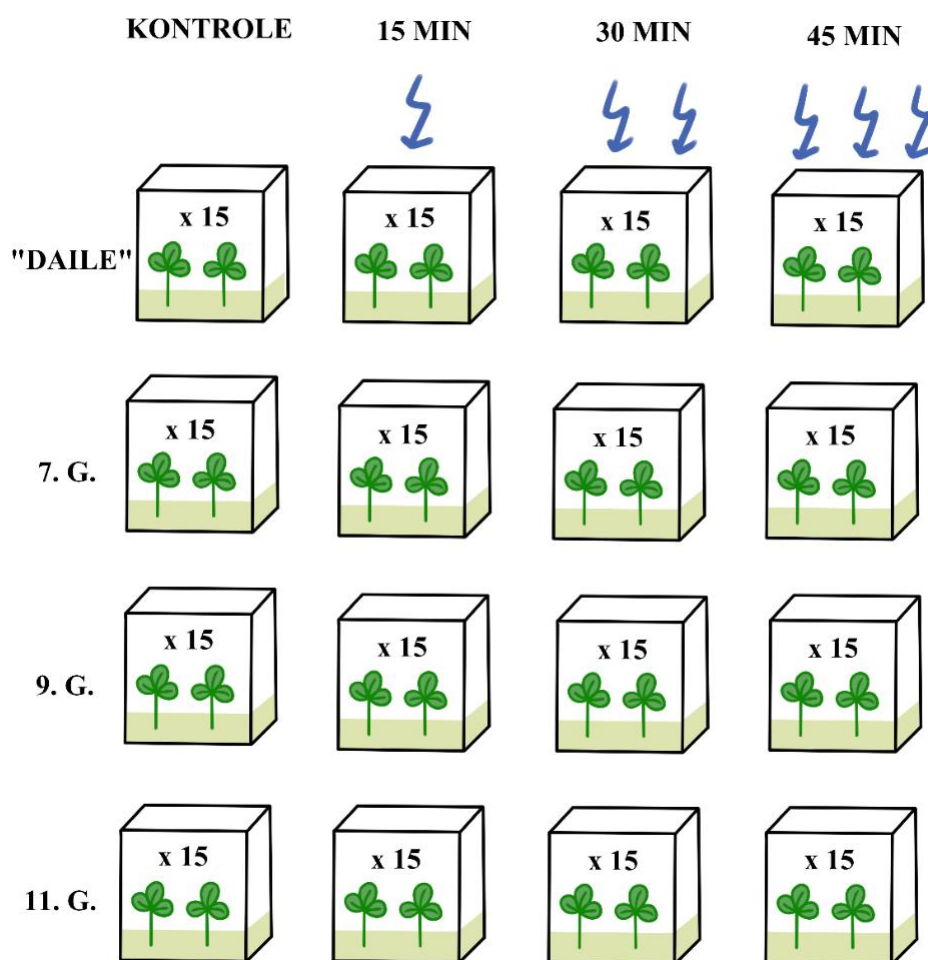
Figure 8. Experimental design of callus initiation.

### 2.2.6. UV-B starojuma eksperimenta klonu kultūra

Sēklas tika sterilizētas, sākumā 10 minūtes skalojot dejonizētā ūdenī ar ziepēm, izmantojot magnētisko maisītāju, pēc kā kārtīgi vairākas reizes noskalotas dejonizētā ūdenī, tad sterilizētas 30 minūtes 0,7% kālija permanganāta šķīdumā, pēc kā atkal noskalotas ar dejonizētu ūdeni, tad 20 minūtes turētas nātrija hipohlorītā, tam pievienojot pāris pilienus Tween šķīduma. Pēc kā jau laminārboksā noskalotas ar autoklāvētu dejonizētu ūdeni. Tālāk iestādītas Petri platē ar 6% agaru. Sēklas tika iesētas nelielā kolonijā – pa piecām vienā lokācijā. Kopumā uz vienas Petri plates tika iesētas 25 sēklas. Pēc izdīgšanas (21 dienas), tās tika pārstādītas L2 barotnē (5. piel.). Pēc mēneša augi tika pārsēti jaunā L2 barotnē. Sēklas dīgšanas laikā tika monitorētas, apkopojot datus, pēc kuriem varēja aprēķināt sēklas dīgtspēju un dīgšanas enerģiju.

UV-B starojuma eksperimentam tika izvēlēti sterilos apstākļos audzēti augi. Klonu kultūrai tika izmantoti četri genotipi: komercšķirne "Daile" sēklu materiāls, kā arī no Slovākijas Kultūraugu sēklu gēnu bankas (Gene Bank of the Slovak Republic) sēklu materiāls no trīs dažādām lokācijām – Makov-Lovasovci (7. genotips), Oscadnica-Haladeji (9. genotips) un Oravsky Biely Potok (11. genotips). No katra genotipa tika iesētas 75 sēklas. Katru dienu tika novērota to dīgtspēja. Tika izvēlēti augi ar vismaz četrām labi atvērušām lapām, lai iegūtu četrus katra auga klonus. Katrs klons tika ievietots L2 barotnē, kopumā iegūstot četrus UV-B starojuma eksperimenta variantus – kontroli, apstarošanu ar UV-B starojumu 15 minūtes, 30 minūtes un 45 minūtes. Vienā *in vitro* kultivācijas traukā tika iestādīti 15 augu kloni, kopumā iegūstot 16 *in vitro* kultivācijas traukus. Eksperiments tika veikts vienu nedēļu, katru dienu apstarojot vienā un tajā pašā laikā (13:00 – 13:45). Eksperimenta dizains ir parādīts 9. attēlā (9. att.).

Pēc eksperimenta no paraugiem tika izdalīts DNS, izmantojot modificētu CTAB DNS izdalīšanas protokolu (1. piel.), veikta PCR reakcija ar diviem praimeriem – iPBS 2076 (5'-GCTCCGATGCCA-3') un iPBS 2079 (5'-AGGTGGCGCCA-3'). Gēla elektroforēze ilga 7 stundas ar spriegumu 105 V un iegūtie fragmenti attēloti, izmantojot UV gaismas kameru.



9. attēls. UV-B starojuma eksperimenta dizains (“Daile” – Latvijas komercšķirne “Daile; 7. G. – 7. genotips (Makov – Lovasovci); 9. G. – 9. genotips (Oscadnica – Haladeji); 11. G. – 11. genotips(Oravsky Biely Potok)).

Figure 9. UV-B radiation experiment design (“Daile” – Latvian commercial variety “Daile; 7. G. – 7th genotype (Makov-Lovasovci); 9. G. – 9th genotype (Oscadnica-Haladeji); 11. G. – 11. genotype (Oravsky Biely Potok)).

### 2.2.7. Plūsmas citometrija

Plūsmas citometrijai randomizēti tika izvēlēti 10 paraugi no katras maģistra darbā apskatītās valsts populācijas – Igaunijas, Latvijas, Lietuvas, Polijas, Ungārijas, Francijas un Turcijas. Plūsmas citometrija tika veikta arī bakalaura darbā izmantotajiem paraugiem no Ukrainas.

Darbā tika izmantots *CtStain PI absolute P(PARTEC)* reaģentu komplekts, kurā ir krāsošanas buferšķīdums un ekstrakcijas buferšķīdums. Kā fluorescējoša krāsa DNS iekrāsošanai izmantots propīdija jodīds (PI). Tika pagatavots krāsošanas šķīdums – uz vienu paraugu attiecinoši 2 ml krāsošanas bufera un 10 μl propīdija jodīda. Paraugs tika sagatavots,

sausu lapu fragmentu 0,5 cm<sup>2</sup> diametrā ievietojot 2 ml stobriņā ar metālisku lodīti un sasmalcinot ar lodīšu homogenizatoru (QIAGEN, TissueLyser LT). Tam klāt pievienojot ekstrakcijas buferšķīdumu, pēc 90 sekundes ilga inkubācijas perioda, paraugs tika laists caur filtru (*Partec 50 microm CellTrics disposable filter*). Filtrāts tika ieliets speciālā citometrijas stobriņā un, pievienojot 10 µl propīdija jodīda, kodoli tika krāsoti 12 stundas. Parauga analizēšana notika plūsmas citometrā (*BD FACS Jazz*), pirms tam sertificētam speciālistam to nokalibrējot ar standartizmēra lodītēm. Paraugu analizēšana notika, izmantojot zilo (488 nm) lāzeru.

#### **2.2.8. Izmantotie resursi**

Izmantotie palīgmateriāli (6. piel.), vielas un reaģenti (7. piel.), iekārtas (8. piel.) un datorprogrammas (9. piel.) ir atspoguļotas pielikumos.

### 3. REZULTĀTI

#### 3.1. PIC vērtība

Ar iPBS 2076 praimeris tika konstatēti 34 lokusi, bet ar iPBS 2079 praimeris tika konstatēti 35 lokusi, kopumā iegūstot 69 lokusus.

Tika aprēķināta PIC vērtība ( $PIC_i = 2 * f_i * (1 - f_i)$ ), kur  $i$  – praimeris un  $f$  – alēles frekvence), ko izmanto, lai pamatotu praimera lietojamību (Roldan-Ruiz et al. 2000; Soengas et al. 2006). Laba vērtība ir amplitūdā no 0 līdz 0,5 un, jo augstāka vērtība, jo labāks pielietojums, lai pētītu ģenētisko daudzveidību. Kā redzams tabulā (1. tab.), abiem marķieriem (iPBS 2076  $PIC=0,44229$  un iPBS 2079  $PIC=0,46256$ ) ir pietiekami liela PIC vērtība, lai tos izmantotu populāciju ģenētikas pētījumos.

Praimeris 2076	Praimeris 2079
Alēles klātbūtne – 3637 (11017)	Alēles klātbūtne – 5869 (9216)
Alēles frekvence – 0,33013	Alēles frekvence – 0,63683
PIC – 0,44229	PIC – 0,46256

1. tabula

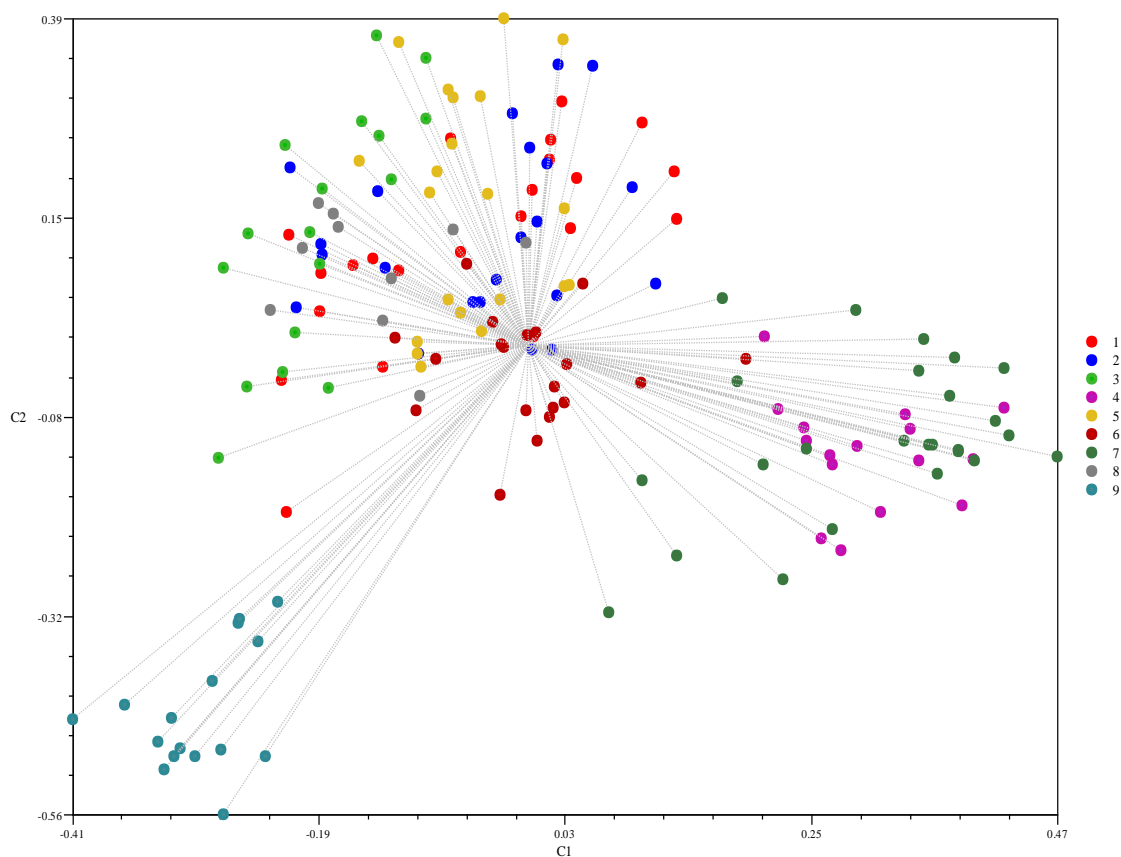
Izmantoto praimeru PIC vērtība.

Table 1

PIC value of used primers.

Praimeri	iPBS 2076	iPBS 2079
PIC	0,44229	0,46256

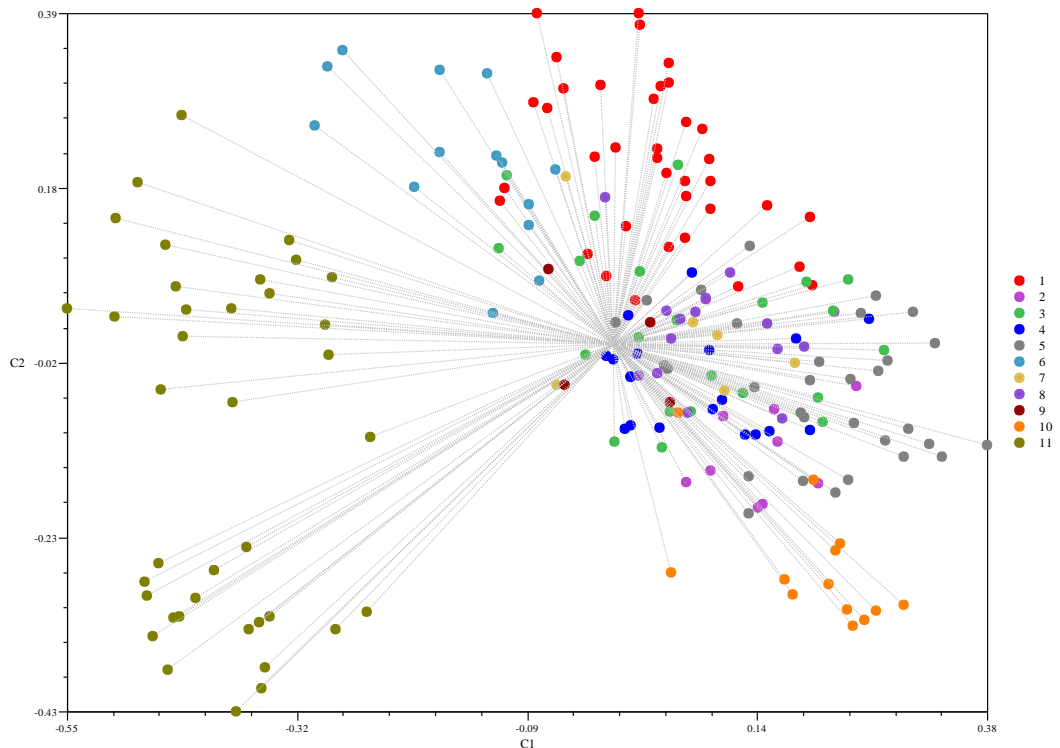
### 3.2. Klāsteru analīze



10. attēls. Klāsteru sadalījums Eiropas un Turcijas populācijām, izmantojot iPBS 2076 un iPBS 2079 praimerus (1 – Igaunija; 2 – Latvija; 3 – Lietuva; 4 – Ukraina; 5 – Polija; 6 – Francija; 7 – Slovākija; 8 – Ungārija; 9 – Turcija).

Figure 10. Distribution of clusters in European and Turkish populations using iPBS 2076 and iPBS 2079 primers (1 – Estonia; 2 – Latvia; 3 – Lithuania; 4 – Ukraine; 5 – Poland; 6 – France; 7 – Slovakia; 8 – Hungary; 9 – Turkey).

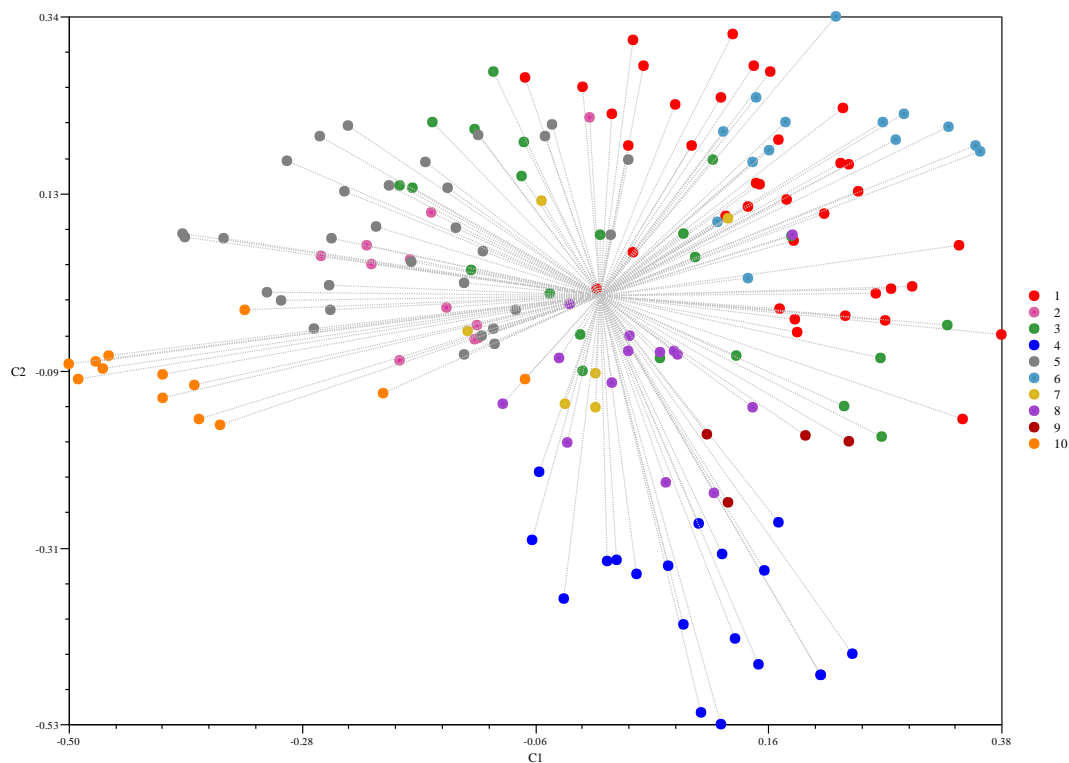
Grafikā (10. att.) var novērot sadalījumu trijos klāsteros. Atsevišķi izdalās Turcijas paraugi (9 – zilā krāsa), kas atbilst Vidusjūras populācijai (Wu et al. 2021). Eiropas populācija pārsvarā pārklājas un veido vienu klāsteri, tomēr Slovākijas (7 – zaļa krāsa) un Ukrainas (4 – violeta krāsa) genotipi veido atsevišķu klāsteri.



11. attēls. Klāsteru sadalījums Latvijas un komercšķirnes “Daile” populācijās, izmantojot iPBS 2076 un iPBS 2079 praimerus (1 – Priekule; 2 – Kuldīga; 3 – Skrunda; 4 – Jaunpils; 5 – Jelgava; 6 – Ķekava; 7 – Daugavpils; 8 – Staicele; 9 – Alūksne; 10 – Daugavpils; 11 – komercšķirne “Daile”).

Figure 11. Distribution of clusters in Latvian and additional variety Daile populations using iPBS 2076 and iPBS 2079 primers (1 – Priekule; 2 – Kuldiga; 3 – Skrunda; 4 – Jaunpils; 5 – Jelgava; 6 – Kekava; 7 – Daugavpils; 8 – Staicele; 9 – Aluksne; 10 – Daugavpils; 11 – variety “Daile”).

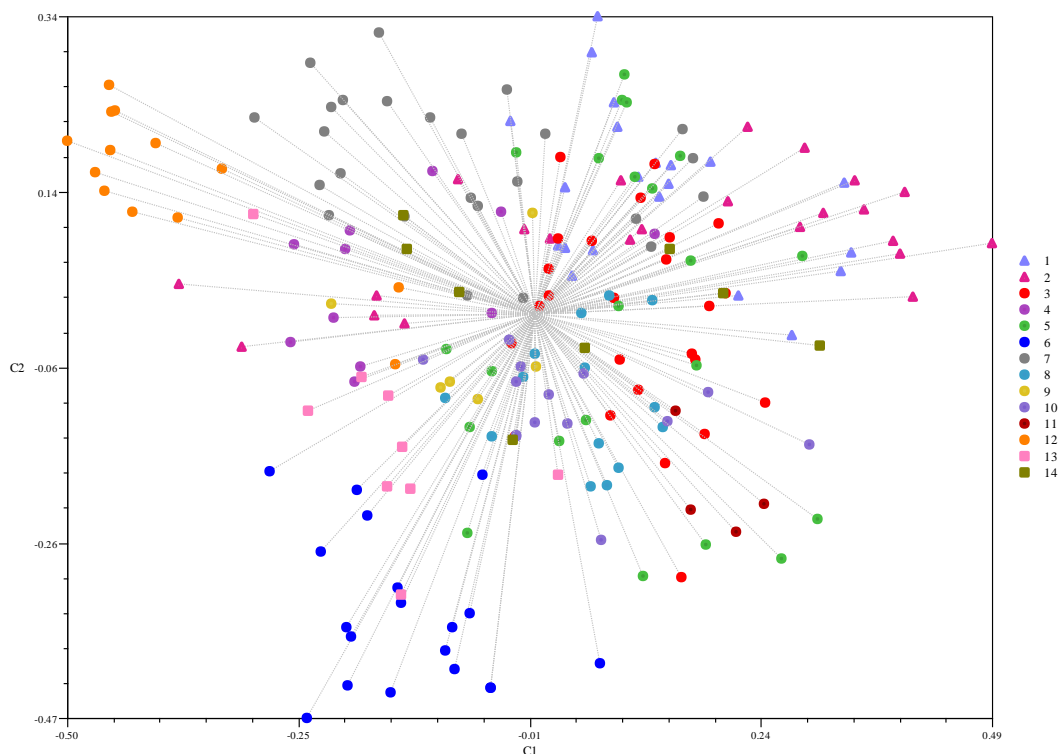
Atsevišķi apskatot Latvijas un komercšķirnes “Daile” sadalījumu (11. att.), var novērot, ka paraugi no Latvijas lielākoties pārklājas, bet komercšķirne “Daile” veido divus atsevišķus klāsterus. “Daile” ir vairāku Eiropas šķirņu krustojums un pamatojoties un to, kā arī uz sugas vairošanos, kura tiek panākta ar svešapputes palīdzību, var skaidrot šīs šķirnes ģenētisko daudzveidību.



12. attēls. Klāsteru sadalījums Latvijas populācijās, izmantojot iPBS 2076 un iPBS 2079 praimerus (1 – Priekule; 2 – Kuldīga; 3 – Skrunda; 4 – Jaunpils; 5 – Jelgava; 6 – Ķekava; 7 – Daugavpils; 8 – Staicele; 9 – Alūksne; 10 – Daugavpils).

Figure 12. Distribution of clusters in Latvian populations using iPBS 2076 and iPBS 2079 primers (1 – Priekule; 2 – Kuldiga; 3 – Skrunda; 4 – Jaunpils; 5 – Jelgava; 6 – Kekava; 7 – Daugavpils; 8 – Staicele; 9 – Aluksne; 10 – Daugavpils).

Grafikā (12. att.) var novērot Latvijas populāciju sadalījumu. Daugavpils (10 – oranža krāsa) un Jaunpils (4 – tumši zila krāsa) populācijas veido atsevišķus klāsterus, bet pārējās populācijas daļēji pārklājas vienā klāsterī.



13. attēls. Klāsteru sadalījums Baltijas populācijās, izmantojot iPBS 2076 un iPBS 2079 praimerus (1 – Igaunija (Kerne); 2 – Igaunija (Tori); 3 – Priekule; 4 – Kuldīga; 5 – Skrunda; 6 – Jaunpils; 7 – Jelgava; 8 – Ķekava; 9 – Rīga; 10 – Staicele; 11 – Alūksne; 12 – Daugavpils; 13 – Lietuva (Druskininkai); 14 – Lietuva (Viļņa)).

Figure 13. Distribution of clusters in Baltic populations using iPBS 2076 and iPBS 2079 primers (1 – Estonia (Kerne); 2 – Estonia (Tori); 3 – Priekule; 4 – Kuldiga; 5 – Skrunda; 6 – Jaunpils; 7 – Jelgava; 8 – Kekava; 9 – Riga; 10 – Staicele; 11 – Aluksne; 12 – Daugavpils; 13 – Lithuania (Druskininkai); 14 – Lithuania (Vilnius)).

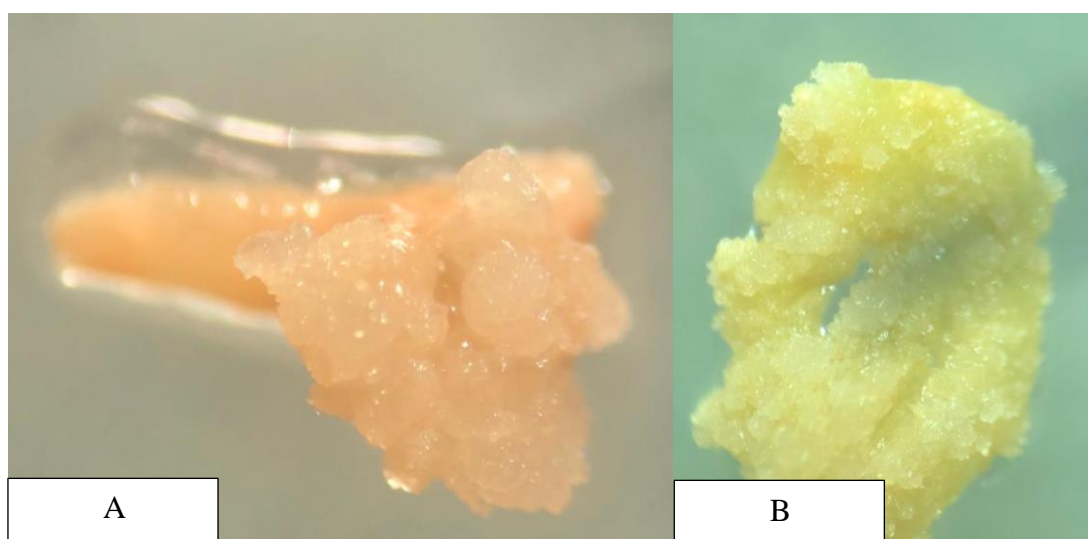
Grafikā (13. att.) var novērot Baltijas populāciju sadalījumu. Daugavpils (12 – oranža krāsa) veido atsevišķu klāsteri, bet Jaunpils (6 – tumši zila krāsa) daļēji pārklājas ar Lietuvas (Druskininkai) genotipu (13 – rozā krāsa). Pārējās apskatītās populācijas daļēji pārklājas.

### 3.3. *Trifolium repens* L. kallusu veidošana

Kopumā no 600 augu daļu paraugiem kallusi tika iniciēti lielākajai daļai (>90%). Pēc 3 nedēļām lielākā daļa veidoja nekrotiskus audus. Tikai 29 no paraugiem turpināja kallusa veidošanu. Vislabākā fitohormonu koncentrācija kallusu veidošanai bija 1. un 4. variants. Tomēr, lai iegūtu precīzākus rezultātus, ir nepieciešams turpināt eksperimentu.

Tika novērots, ka kallusi attīstās visos augu fragmentos – gan lapās, gan stublājos, gan arī hipokotilā (14. att.). Auga vecums neietekmēja kallusa veidošanos. 1. variantā kalluss

izveidojās desmit auga fragmentos, kas kopumā sastāda 8 %, 2. variantā – 5 % (seši fragmenti), 3. variantā – 4% (pieci fragmenti) un 4. variantā – 7 % (astoņi fragmenti).



14. attēls. *Trifolium repens* L. kallusa veidošanās uz dažādiem auga fragmentiem (A – uz stublāja; B – uz lapas).

Figure 14. Growth of *Trifolium repens* L. callus on different plant fragments (A – on the stem; B – on the leaf).

### 3.4. Sēkļu dīgšanas parametri

2. tabula

*Trifolium repens* L. dažādu genotipu dīgospēja sterilos apstākļos.

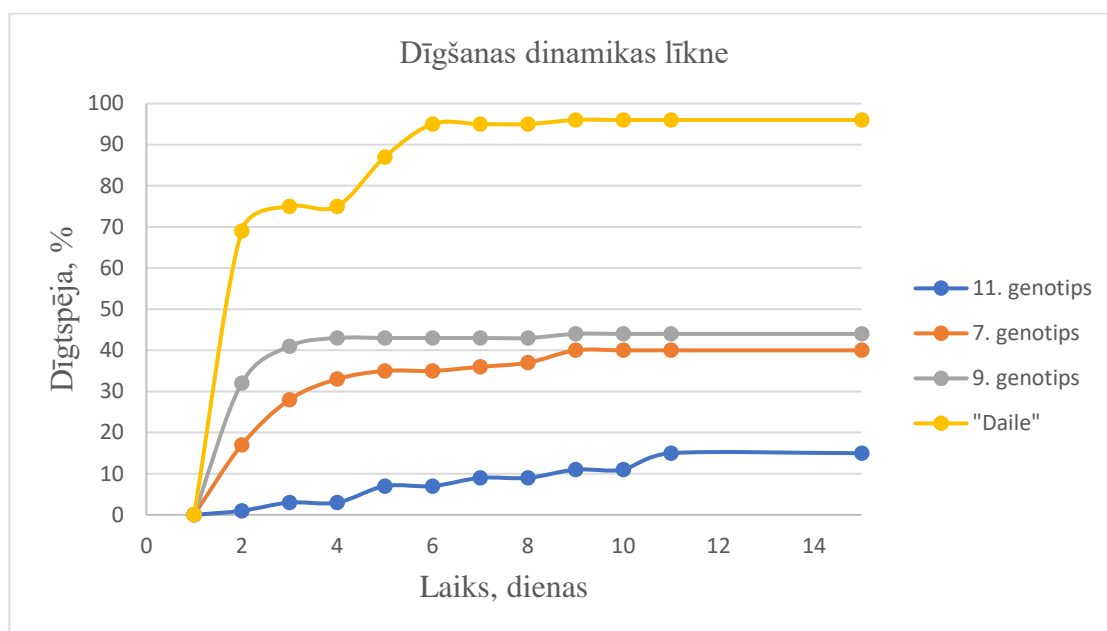
Table 2

Germination of different genotype *Trifolium repens* L. under sterile conditions.

Genotips	Iesēto sēkļu skaits	Izdīgušo sēkļu skaits	Dīgospēja
7.	75	30	40%
9.	75	33	44%
11.	75	15	20%
“Daile”	75	72	96%

Katram genotipam tika iestādītas 75 sēklas un pēc 15 dienu dīgšanas tika apskatīts izdīgušo sēkļu skaits, no kura turpmāk tika aprēķināta dīgospēja (2. tab.) – izdīgušo sēkļu skaitu dalot ar iesēto sēkļu skaitu un rezultātu reizinot ar simts. Pēc aprēķiniem 7. genotipam (Makov

– Lovasovci) dīgospēja ir 40%, 9. genotipam (Oscadnica – Haladeji) – 44%, 11. genotipam (Oravsky Biely Potok) – 20% un Latvijas komercšķirnei “Daile” – 96%.



15. attēls. *Trifolium repens* L. četrus genotipus dīgšanas enerģijas līkne (zils – Oravsky Biely Potok (11. genotips); oranžs – Makov-Lovasovci (7. genotips); pelēkais – Oscadnica-Haladeji (9. genotips); dzeltenais – komercšķirne “Daile”).

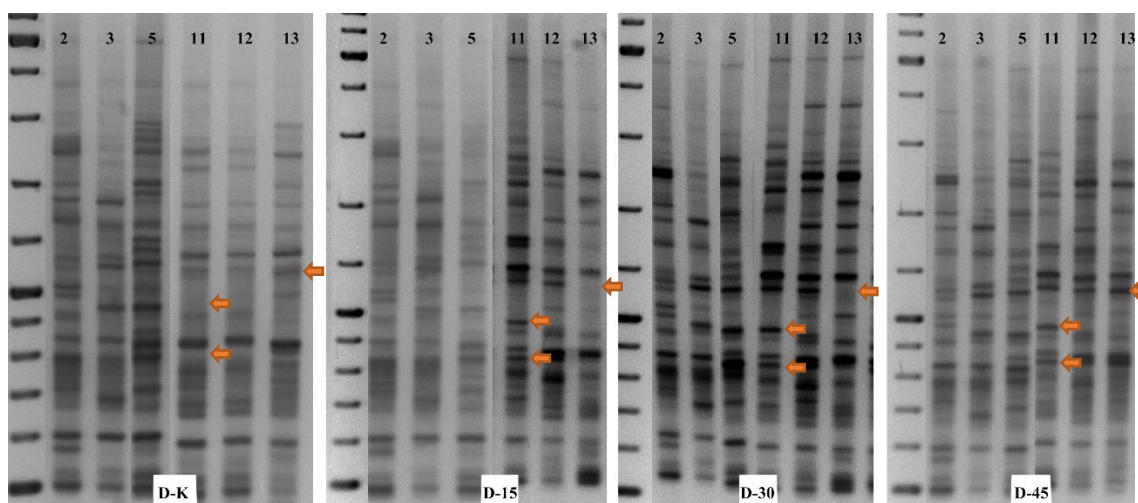
Figure 15. *Trifolium repens* L. germination progress (energy) curve of four genotypes (blue – Oravsky Biely Potok (genotype 11); orange – Makov-Lovasovci (genotype 7); grey – Oscadnica-Haladeji (genotype 9); yellow – commercial variety “Daile”).

Grafikā (15. att.) ir attēloti rezultāti pēc 15 dienu dīgšanas, tomēr kontrolei dīgospēja tika apskatīta arī pēc 21. dienas un izdīgušo sēkļu skaits bija tāds pats, kā pēc 11. dienas. Var redzēt, ka komercšķirnei “Daile” maksimālais izdīgušo sēkļu skaits ir 6. dienā, 7. genotipam – 9. dienā, 9. genotipam – 9. dienā, bet 11. genotipam – 11. dienā.

### 3.5. UV-B starojuma ietekmes noteikšana

Retrotranspozonu pārvietošanos pēc apstarošanas ar UV-B starojumu varēja novērot visos apskatītajos genotipos, izmantojot iPBS 2079 praimeru. Genotipā “Daile” retrotranspozonu pārvietojumi konstatēti jau pēc 15 minūšu apstarošanas (16. att.). Izmaiņas *Trifolium repens* L. šķirnes “Daile” genotipā var novērot trijos lokusus, kas izpaužas gan kā lokusu delēcija, gan insercija. Lokusa delēcija (13. paraugs), salīdzinot ar kontroles grupu, bija novērojama gan pēc apstarošanas 15 minūtes, gan 30 minūtes, tomēr pēc 45 minūšu apstarošanas konkrētais lokuss neatšķiras no kontroles grupas. Insercijas ir novērojamas divos lokusus (11. paraugs). Tās ir novērojamas visās grupās – gan pēc 15, gan 30 un 45 minūšu apstarošanas ar UV-B starojumu, salīdzinot ar kontroles grupu. Dažiem indivīdiem apstarošana

ar UV-B starojumu jau pēc 15 minūtēm dienā nedēļas laikā radīja DNS degradāciju, tāpēc tie tika izslēgti no turpmākās analīzes.



16. attēls. Retrotranspozonu pārvietošanās “Daile” genotipā, izmantojot iPBS 2079 praimeru (D-K – kontrole; D-15 – apstarošana ar UV-B starojumu 15 minūtes; D-30 – apstarošana ar UV-B starojumu 30 minūtes; D-45 – apstarošana ar UV-B starojumu 45 minūtes).

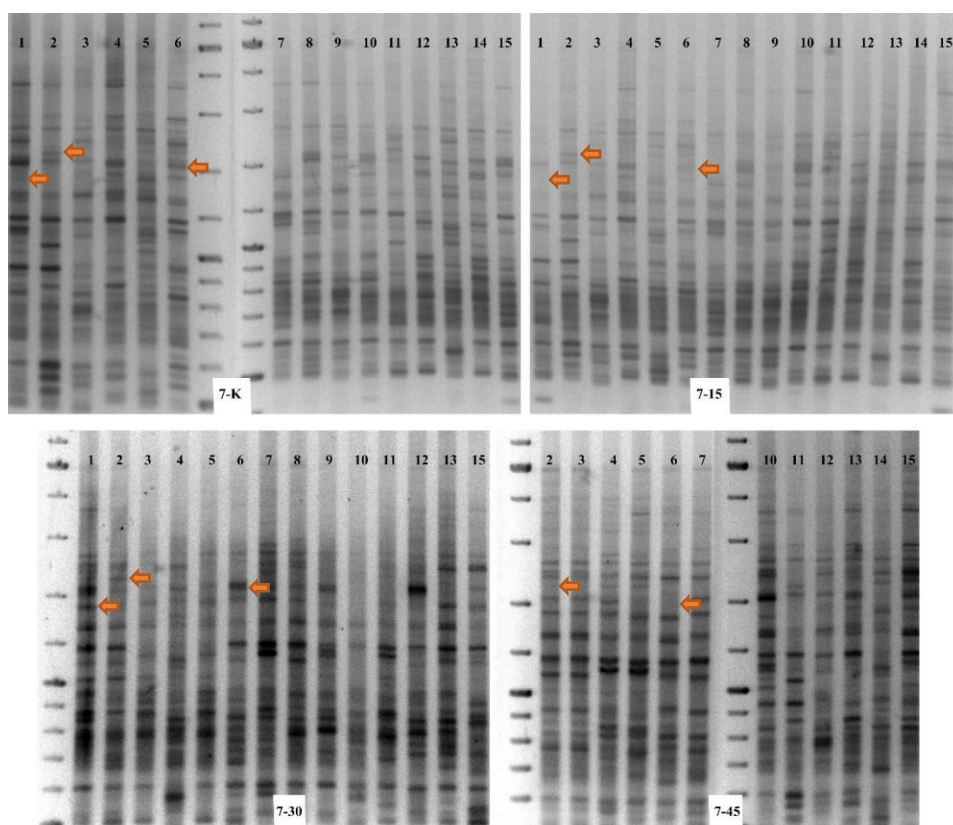
Figure 16. Movement of retrotransposons in the “Daile” genotype using the iPBS 2079 primer (D-K – control; D-15 – irradiation with UV-B radiation for 15 minutes; D-30 – irradiation with UV-B radiation for 30 minutes; D-45 – irradiation with UV-B radiation for 45 minutes).

7. genotipā (17. att.) pēc apstarošanas 30 minūtes ar UV-B starojumu pirmajam paraugam var konstatēt lokusa inserciju, bet pēc apstarošanas 45 minūtes paraugs degradējās. Otrajā un sestajā paraugā pēc apstarošanas ar UV-B starojumu 45 minūtes var konstatēt lokusa delēciju.

Lielākā daļa (deviņi no piecpadsmit) 9. genotipa indivīdu (18. att.) bija degradējušies. Pēc apstarošanas 15 minūtes ar UV-B starojumu pirmajā paraugā var novērot lokusa delēciju, tomēr pēc apstarošanas 30 minūtes – lokuss neatšķiras no kontroles grupas. Tas pats paraugs pēc apstarošanas 45 minūtes ar UV-B starojumu paraugs degradējas. Apstarošana 45 minūtes ar UV-B starojumu ir pārāk intensīva šim genotipam, tāpēc novēro lielāko daļu paraugu degradāciju.

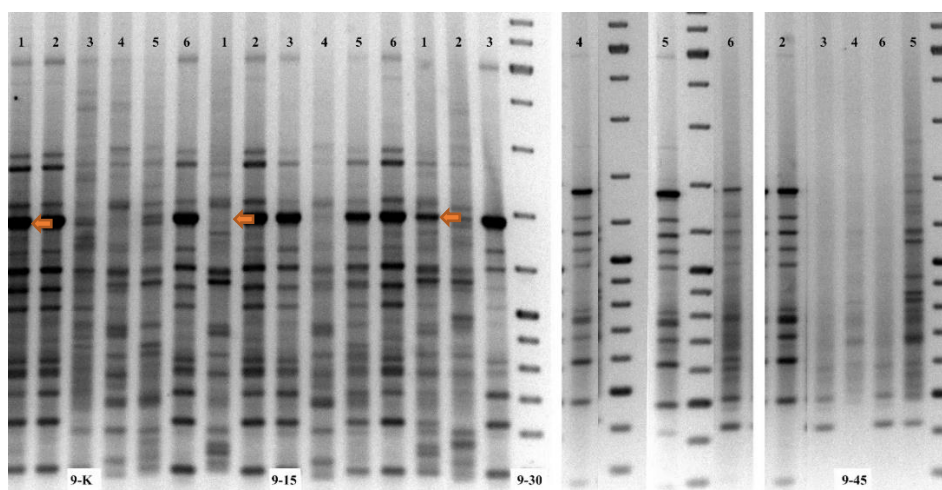
11. genotipā (19. att.) paraugiem pēc apstarošanas ar UV-B starojumu 15 minūtes visi paraugi bija degradējušies un tika izņemti no turpmākās analīzes. Piektajā lokusā pēc apstarošanas 30 minūtes var novērot lokusa inserciju, kuru var novērot arī pēc apstarošanas 45 minūtes, bet sestajā un septītajā paraugā, var novērot lokusa delēciju pēc apstarošanas ar UV-B starojumu gan 30, gan 45 minūtes.

Balstoties uz garuma marķiera iezīmēm gan 11. genotipā, gan "Daile" retrotranspozoni pārvietojumu konstatēti ap vienu un to pašu DNS reģionu.



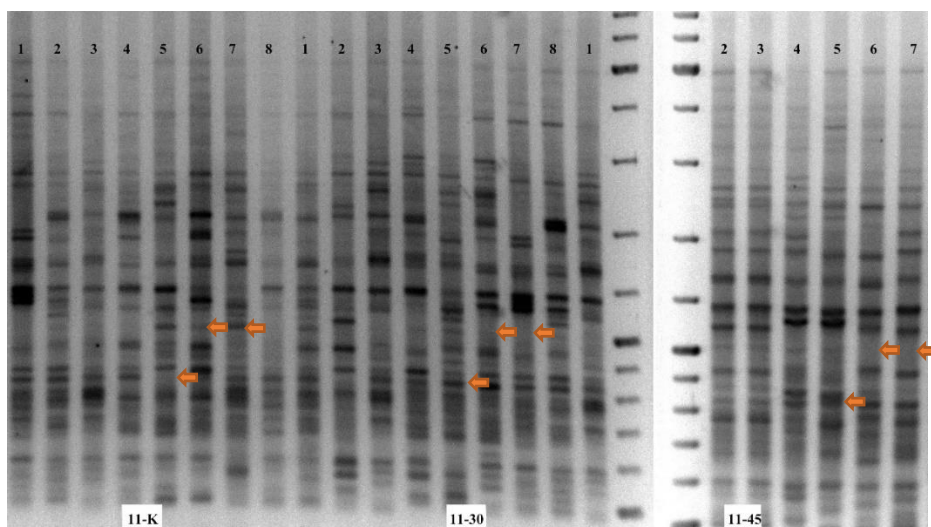
17. attēls. Retrotranspozonu pārvietošanās Makov-Lovasovci (7.) genotipā, izmantojot iPBS 2079 praimeru (7-K – kontrole; 7-15 – apstarošana ar UV-B starojumu 15 minūtes; 7-30 – apstarošana ar UV-B starojumu 30 minūtes; 7-45 – apstarošana ar UV-B starojumu 45 minūtes).

Figure 17. Movement of retrotransposons in the Makov-Lovasovci (7.) genotype using the iPBS 2079 primer (7-K – control; 7-15 – irradiation with UV-B radiation for 15 minutes; 7-30 – irradiation with UV-B radiation for 30 minutes; 7-45 – irradiation with UV-B radiation for 45 minutes).



18. attēls. Retrotranspozonu pārvietošanās Oscadnica-Haladeji (9.) genotipā, izmantojot iPBS 2079 praimeru (9-K – kontrole; 9-15 – apstarošana ar UV-B starojumu 15 minūtes; 9-30 – apstarošana ar UV-B starojumu 30 minūtes; 9-45 – apstarošana ar UV-B starojumu 45 minūtes).

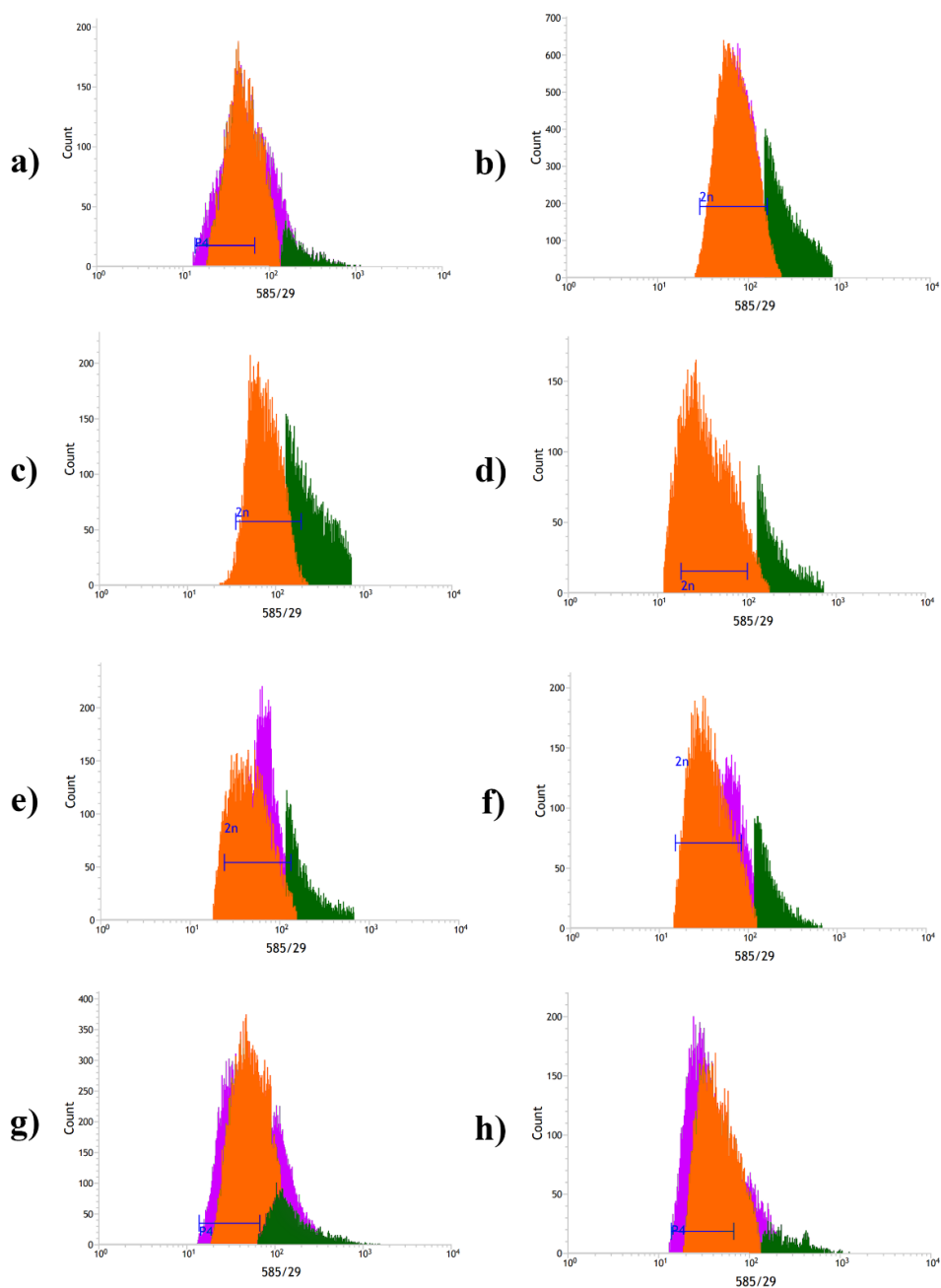
Figure 18. Movement of retrotransposons in the Oscadnica-Haladeji (9.) genotype using the iPBS 2079 primer (9-K – control; 9-15 – irradiation with UV-B radiation for 15 minutes; 9-30 – irradiation with UV-B radiation for 30 minutes; 9-45 – irradiation with UV-B radiation for 45 minutes).



19. attēls. Retrotranspozonu pārvietošanās Oravsky Biely Potok (11.) genotipā, izmantojot iPBS 2079 praimeru (11-K – kontrole; 11-30 – apstarošana ar UV-B starojumu 30 minūtes; 11-45 – apstarošana ar UV-B starojumu 45 minūtes).

Figure 19. Movement of retrotransposons in the Oravsky Biely Potok (11.) genotype using the iPBS 2079 primer (11-K – control; 11-30 – irradiation with UV-B radiation for 30 minutes; 11-45 – irradiation with UV-B radiation for 45 minutes).

### 3.6. Plūsmas citometrija



20. attēls. *Trifolium repens* L. apskatīto valstu ploiditāte (zaļa krāsa – 3C, oranža krāsa – (2C). a) Francija; b) Ungārija; c) Ukraina; d) Polija; e) Lietuva; f) Igaunija; g) Latvija; h) Turcija).

Figure 20. *Triplium repens* L. ploidy in the populations considered in the master's thesis (green color – 3C, orange color – (2C). a) France; b) Hungary; c) Ukraine; d) Poland; e) Lithuania; f) Estonia; g) Latvia; h) Turkey).

Pēc plūsmas citometrijas datiem (20. att.), var novērot, ka lielākajā daļā no apskatītajām populācijām *Trifolium repens* L. ir novērojama miksoploidija (Ungārija, Ukraina, Polija, Lietuva, Igaunija), bet Francijas, Latvijas un Turcijas paraugiem ir raksturīga diploiditāte.

#### 4. DISKUSIJA

Ģenētiskā daudzveidība ir būtiska jebkurai sugai, lai spētu adaptēties mainīgiem vides apstākļiem, kā arī tajos izdzīvot. Tas ir īpaši svarīgi, jo pašreiz uz mūsu planētas cilvēku darbības dēļ klimats pasliktinās. Pārtikas un vides kvalitātes uzlabošanas nolūkā ir nepieciešams saglabāt un stabilizēt sugu ģenētisko daudzveidību, jo cilvēku populācija turpina pieaugt skaitā, bet resursi kļūst arvien limitētāki. Ir nepieciešamība uzlabot ne tikai kultūraugu ģenētisko daudzveidību, bet vērst uzmanību arī uz to savvaļas priekštečiem. Lielu klimata pārmaiņu gala rezultātā tie tiks izmantoti par pamatu dažādu kultūraugu selekcijā, izmantojot īpašības, ko tie būs ieguvuši dabiskā ceļā, reaģējot uz vides izmaiņām. Ģenētiskā daudzveidība kalpos par pamatu, ko izmantot vajadzības gadījumā cilvēkiem nepieciešamajā brīdī. Aptuveni 80% no sugām (25'687 no 30'983) tiek uzskatīti par savvaļas priekštečiem jeb CWR (*crop wild relatives*) mūsdienu pārtikā un lauksaimniecībā lietojamām sugām. Tiek paredzēts, ka klimata izmaiņas ietekmēs augu ziedēšanas laiku, kā dēļ augļi nogatavosies ātrāk. Temperatūras paaugstināšanās un pieaugušās atmosfēras CO<sub>2</sub> gāzes dēļ samazināsies sugu produktivitāte, kas raksturoties kā īsāks auga dzīves cikls, nepietiekama attīstība, samazināta sēklu produkcija un neauglība. Augu ģenētiskie resursi ir bāze ekoloģiskai un kvalitatīvai vides attīstībai, nodrošinot pārtikas un citu bioloģisko resursu saglabāšanu. Antropogēnās ietekmes rezultātā dabīgās ekosistēmas tiek fragmentētas, kas noved pie ģenētiskās daudzveidības samazināšanās, jo dabīgais izplatīšanās veids daudzām sugām tiek ierobežots. Mazas, izolētas populācijas potenciāli cieš no inbrīdīngā, ģenētiskās daudzveidības samazināšanās un ir ģenētiskās erozijas riska grupā. Ģenētiskā daudzveidība palīdz sugai evolucionēt un aizsargāties no inbrīdīngā, kuram ir negatīva ietekme, jo palielinoties tā iespējai, dabiskās svešapputes populācijās var palielināties kaitīgu recesīvo alēļu skaits. Pētījumi rāda, ka palielinātā ģenētiskā erozija skar 20–35% no augu sugu daudzveidības. Selekcijas rezultātā izveidotie kultūraugi ir tikai apmēram 3% no visu augu sugu skaita. Augu ģenētiskā daudzveidība palielina izvēles un aizsardzības iespējas pret nākotnes nelabvēlīgiem vides apstākļiem (Maxted et. al. 2008; Bome et. al. 2015; Frankham et. al. 2017).

Sugas ģenētiskās daudzveidības pētījumi un ģeogrāfiskās izplatības noskaidrošana ir svarīgi kritēriji ģenētiski daudzveidīgu populāciju identifikācijai. Svešapputes augiem, pie kuriem pieder arī *Trifolium repens* L., novēro lielāku ģenētisko daudzveidību, nekā pašapputes augiem. Vienas populācijas ietvaros ģenētiskā daudzveidība var sasniegt pat 80% (Dullo et. al. 2008).

Sēklu dīgšanas parametri var norādīt uz ražas lielumu un kvalitāti. Viens no parametriem ir maksimālā dīgspēja (*final germination percentage*), ko izsaka procentos, aprakstot izdīgušo

sēklu skaitu no kopējā iesēto sēklu daudzuma. Fizioloģijā sēkla ir sākusi dīgt, kad parādās embrionālā sakne. Otrs parametrs ir sēklas dīgšanas enerģija, ko attēlo dīgšanas enerģijas līkne (*germination progress (energy) curve*) un raksturo dīgšanas spējas rādītāji atkarībā no dīgšanas ātruma un vienmērīguma. Dīgšanas intensitāte ir laiks, kurā uzdīgst 50% no visām iestādītajām sēklām ( $T_{50}$ ) (Nečajeva 2015). Pēc rezultātiem var novērot, ka *Trifolium repens* L. dīgšanai ir nepieciešamas 11 dienas. Jau sestajā dienā ir novērojama lielākā daļa dīgšanai nepieciešamās enerģijas patēriņa. Literatūrā ir aprakstīts, ka sēklas dīgšanas spēju *Trifolium repens* L. ir iespējams novērot jau 10 līdz 15 dienu laikā, kas arī atbilst maģistra darba rezultātiem. Vislabākā dīgšanas spēja ir komercšķirnei "Daile" – 96%, Slovērijas genotipiem (7.–40%, 9.–44%, 11.–20%) dīgšanas spēja ir ļoti slikta. Tas var būt skaidrojams ar to, ka sēklas ir salīdzinoši vecas (~5 gadi). Literatūrā ir aprakstīts, ka *Trifolium repens* L. sēklas dzīvotspēju zaudē pēc četriem līdz pieciem gadiem (Cain et. al. 1995), kas arī atbilst rezultātiem, neskatoties uz atbilstošiem un kontrolētiem sēklu glabāšanas apstākļiem.

Populāciju ģenētikas pētījumā par *Trifolium repens* L. ģenētisko daudzveidību visos tā izplatības reģionos pasaulē (Amerika, Eiropa, Āzija, Austrālija) (Wu et. al. 2021), kurā tika izmantoti mikrosatelītu marķieri, ģenētiskā daudzveidība tika analizēta gan savvaļas, gan introducētajām populācijām. Savvaļas populācijās polimorfo lokusu procentuālais daudzums (98,24%) bija lielāks nekā introducētajās populācijās (96,77%). Ģenētiskās daudzveidības analīze parādīja sadalījumu trijos klāstros – Āzijas un Krievijas populācijas apvienojas vienā klāsterī, Vidusjūras reģiona valstis otrā klāsterī, bet pārējās Eiropas analizētās populācijās – trešajā klāsterī. Vislielākā ģenētiskā distance bija novērojama starp Vidusjūras reģiona un Āzijas valstu *Trifolium repens* L. īpatņiem. Cits *T. repens* L. daudzveidības pētījums parāda, ka Apvienotās karalistes salu populācija ir atšķirīga no Eiropas kontinentālās populācijas, kā arī ģenētiski atšķiras no kultivētām šķirnēm. Tika secināts, ka sala darbojas kā faktors ģenētiskās daudzveidības veicināšanai (Badr et. al. 2012). Apskatītās populācijas atrodas kontinentālajā daļā, tāpēc, kā vienīgais faktors ģenētiskās daudzveidības veicināšanai, kalpo augstkalnu apgabali (10. piel.). Tika apskatīts 2015. gadā veiktais pētījums (Grauda 2015) par *Trifolium repens* L. ģenētisko daudzveidību Latvijas robežās – starp urbānu (pēc Eiropas standartiem Latvijā var nodalīt vienu pilsētu – Rīgu) un rurālu jeb lauku teritoriju, kā arī šķirni "Daile". Pēc apskatītā darba rezultātiem – urbāna, rurāla teritorija un šķirne iedalījās atsevišķos klāstros. Vērts pieminēt, ka komercšķirne "Daile", savukārt, iedalījās divos atsevišķos klāstros. Tomēr pēc maģistra darba rezultātiem redzams, ka indivīdi no dažādām Latvijas teritorijām lielākoties pārklājas, neatkarīgi no tā, vai tika ievākti lauku teritorijās, vai pilsētu centros. Rezultātus var skaidrot ar lielāku izanalizēto indivīdu skaitu – maģistra darba laikā katrā lokācijā tika apskatīti vismaz 30 indivīdi.

Termins "savvaļas suga" tiek izmantots, lai apzīmētu populācijas, kuras nav bijušas apzināti pakļautas selekcijai. Tiek ietverti ekotipi, kas ir pielāgoti noteiktam biotopam (Caradus 1994). Nav iespējams precīzi noskaidrot, vai ievācāmais auga materiāls ir dabīgi attīstījies vai arī ir iestādīta šķirne. Ir pētījumi, kuros noskaidrots, ka 60–70% no urbānās teritorijas augiem ir iestādītas šķirnes (Gilbert 1989; Bome et. al. 2015). No Latvijā ievāktajiem paraugiem (12. att.) ir redzams, ka atsevišķi izdalās Jaunpils, kā arī Daugavpils paraugi. To var skaidrot ar to, ka netika ievākti dabīgi izveidojušies paraugi, bet gan, iespējams, iestādītas šķirnes. Tuvāk apskatot Baltijas paraugus (13. att.), var redzēt, ka Daugvapils atdalās atsevišķā klāsterī, bet Jaunpils genotips nedaudz pārklājas ar Lietuvas pilsētas Druskininkai genotipu. Pēc tā var domāt, ka, iespējams, tā ir viena un tā pati iestādītā šķirne.

*T. repens* L. var novērot morfoloģiskās un fizioloģiskās variācijas jau populācijas līmenī. To var skaidrot ar pielāgošanos specifiskiem biotiskajiem un abiotiskajiem stresiem, piemēram, izmaiņām augsnes makro un mikroelementu proporcijās, klimatisko izmaiņu stresam (arī paaugstinātam UV-B starojumam), kā arī, piemēram, pārlietu lielajam mitrumam, vai – tieši pretēji – sausumam. UV starojums (280 – 400 nm), kas sasniedz Zemes virsmu, efektīvi regulē dažādus augu attīstībai nepieciešamos fizioloģiskos procesus un vielmaiņas ceļus. Augsta UV starojuma absorbcija, īpaši UV-B (280–316 nm) var sabojāt bioloģiskās sistēmas, noārdot šūnas DNS, samazinot augu fotosintēzi, hloroplastu tilakoīdu integritāti un efektīvu biomasas izveidi. Paaugstināta UV-B starojuma intensitātes rezultātā augiem tiek pieaug reaktīvais skābeklis, kā arī oksidatīvais stress. UV starojuma tolerance dažādām sugām un šķirnēm var būtiski atšķirties – dažas kultūras var būt ar augstu jutību jau pret pašreizējo dabisko UV-B starojuma līmeni. Lielās fizioloģisko un bioķīmisko īpašību daudzveidības dēļ starp sugām un šķirnēm, kā arī paaugstinātā plastiskuma un adaptīvo spēju, kas konstatētas dažādos augšanas apstākļos, ir vērts pētīt UV-B starojuma ietekmi uz populācijām no dažādiem vides apstākļiem, jo tiek prognozēts, ka klimata pārmaiņas radīs sliktas sekas augu daudzveidībai (Caradus 1994; Oliveira et. al. 2019; Romero-Román et. al. 2021).

Pēc maģistra darba rezultātiem var novērot, ka pēc apstrādes ar UV-B starojumu tiek aktivizēta retrotranspozonu pārvietošanās, kas liek domāt, ka šādā veidā tiek nodrošināta aizsardzība pret UV-B starojumu. Var veikt karstuma stresa ietekmes eksperimentu uz retrotranspozonu kustību *Trifolium repens* L., līdzīgi, kā tas tika veikts (Masuta et. al. 2017) pētījumā. Tika atklāts ONSEN – karstuma stresa aktivēts *Ty1/Copia* retrotranspozons, kurš konstatēts pārvietojamies divos modeļobjektos. Pētījumā izmantoja *Columbia (Col0)* ekotipa savvaļas tipa un *nprp1 Arabidopsis thaliana* un japānas redīsu *Rhaphanus sativus* (YR Tengu) modeļobjektus. Pētījumā apskatīja ONSEN kustību gan kallusos, gan stādos un abos gadījumos

bija iespējams novērot retrotranspozonu pārvietojumus. Metode ir salīdzinoši vienkāršāka un mazāk laikietipīga par UV-B starojuma eksperimenta dizainu. Sēklas tiek apstarotas 1 h 37°C temperatūrā.

Pēc maģistra darba rezultātiem var novērot, ka retrotranspozonu ievietošanās pēc apstarošanas ar UV-B starojumu viena genotipa ietvaros notiek vienā un tajā pašā lokācijā visās apskatītajās grupās – gan pēc apstarošanas ar UV-B starojumu 15, gan 30, gan 45 minūtes, tomēr literatūrā minēts, ka retrotranspozonu ievietošanās notiek nejauši (Masuta et. al. 2017), parasti eihromatiskos reģionos. Vadoties pēc garuma marķiera iezīmēm divos genotipos (11. un "Daile") retrotranspozonu pārvietojumi konstatēti ap vienu un to pašu DNS reģionu. Rezultātus varētu paplašināt, veicot konkrēto lokusu sekvenēšanu, kā arī, izmantojot datu bāzēs pieejamo informāciju, izpētīt konkrēto ievietošanās vietu gēnu funkcijas.

Tā kā kalluss ir identificēts kā audi ar vislielāko retrotranspozonu skaitu (Masuta et. al. 2017), tas kalpo kā papildus faktors transponējamo elementu pārvietošanās veicināšanai, tāpēc būtu jāveic dažādu šķirņu un/vai savvaļas genotipu atlase kallusa iniciēšanai un tā turpmākai pavairošanai. *Trifolium repens* L. ir svešapputes augs, kurš ir ļoti heterogēns populācijā, tāpēc ir izteiktas atšķirības dažādu šķirņu genotipos, morfoloģiju ieskaitot (Yamada et. al. 1993). Tikai 5% no visiem paraugiem (29 no 600) turpināja veidot kallusus. Pēc literatūras datiem ir noskaidrots, ka tikai ~10% no visām *Trifolium repens* L. šķirnēm ir spējīgas veidot kallusus. Tas var būt skaidrojams ar *Trifolium repens* L. salīdzinoši ātro metabolismu. No tā var secināt, ka darbam izmantotā komercšķirne "Daile" nav piemērota kallusa veidošanai. Ir iespēja, ka barotne nebija pietiekami piesātināta ar barības vielām (piemēram, kā L2), tādējādi augiem pietrūka barības vielas kallusa veidošanas turpināšanai. Rezultātus varētu uzlabot, kallusus pārstādot uz jaunu barotni jau pēc divām nedēļām (nevis četrām, kā ir minēts literatūrā). Kallusus varētu mēģināt veidot no dažādām *Trifolium repens* L. šķirnēm, ne tikai komercšķirnes "Daile".

Lielākai daļai apskatīto populāciju ir raksturīga miksoploīdija. Arī bakalaura darba rezultātos (Dombrovska 2019), gan Latvijas komercšķirne "Daile", gan Slovākijas Pještjani genotipam ir novērota miksoploīdija. Augsts miksoploīdijas līmenis var liecināt par augstu genoma plastiskuma līmeni, kas palīdz augam adaptēties mainīgiem, nelabvēlīgiem vides un augšanas apstākļiem. Savvaļā augošiem augiem tā ir izplatīta visbiežāk (Kunakh et. al. 2008). Salīdzinot ar komercšķirni "Daile", Latvijas paraugiem ir raksturīga diploīdija. To var skaidrot ar to, ka augiem ar lielāku ploīditāti, salīdzinot ar diploīdiem augiem, ir lielāka zaļā masa un to šūnu izmērs ir lielāks (Kondorosi et. al. 2000), kas tieši ir selekcionāru mērķis, veidojot jaunas, piemēram, lopbarībai nozīmīgas šķirnes.

## 5. SECINĀJUMI

1. Augstkalnu reģionos izplatītās populācijas ģenētiski ir atšķirīgas no zemienēs izplatītājām.
2. UV-B starojums kalpo kā stresa faktors, kas veicina retrotranspozonu pārvietošanos *Trifolium repens* L., palielinot ģenētisko daudzveidību.
3. *Trifolium repens* L. kallusi zemas produktivitātes dēļ nav piemēroti liela apjoma eksperimentu veikšanai (UV-B starojuma eksperimentam). Lapu klonu *in vitro* kultūras modelis ir piemērots šādu eksperimentu veikšanai.
4. *Trifolium repens* L. Eiropas populācijai ir raksturīga miksofloīdija, kas, iespējams, saistīta ar sugas adaptāciju mainīgiem vides apstākļiem.

## PATEICĪBAS

Izsaku pateicību Latvijas Universitātes Bioloģijas fakultātes Vides ģenētikas laboratorijas vadītājai Dacei Graudai par iespēju izstrādāt darbu, konsultācijām un darba uzlabojošiem ieteikumiem, kā arī kolēģiem Andrai Miķelsonei, Nikolei Krasņevskai un Kārlim Žagatam par ieguldīto laiku maģistra darba izmantojamo metožu apgūšanā un uzlabošanā.

## LITERATŪRAS SARAKSTS

- Adan A., Alizada G., Kiraz Y., Baran Y., Nalbant A. 2016. Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2), 163–176 pp.
- Ahmad S., Zeb A. 2021. Phytochemical profile and pharmacological properties of *Trifolium repens*. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 32(1), 18 pp.
- Avise J. C. 2004. *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. Second Edition. Sinauer Associates, 684 pp.
- Badr A., El-Shazly H. H., Mekki L. 2012. Genetic diversity in white clover and its progenitors as revealed by DNA fingerprinting. *Biologia Plantarum*, 56 (2), 283-291 pp.
- Bais A. F., McKenzie R. L., Bernhard G., Aucamp P. J., Ilyas M., Madronich S., Tourpali, K. 2015. Ozone depletion and climate change: impacts on UV radiation. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 14(1), 19–52 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 pp.
- Bome N. A., Bome A. Y., Ripberger E. I. 2015. Ecological and genetic potential of sort spring wheat in conditions of the northern zauralye. – In: Weisfeld L. I., Opalko A. I., Bome N. A., Bekuzarova S. A. *Biological Systems, Biodiversity, and Stability of Plant Communities*. Apple Academic Press, 527 pp.
- Bourge M., Brown S. C., Siljak-Yakovlev S. 2018. Flow cytometry as tool in plant sciences, with emphasis on genome size and ploidy level assessment. *Genetics&Applications*, Vol.2, No.2, 12 pp.
- Bui Q. T., Grandbastien M. A. 2012. LTR Retrotransposons as Controlling Elements of Genome Response to Stress? Springer, *Topics in Current Genetics*, vol 24, 273-296 pp.
- Cain M. L., Pacala S. W., Silander J. A. 1995. Neighborhood Models of Clonal Growth in the White Clover *Trifolium repens*. *The American Naturalist*, 145(6), 888-917 pp.
- Caradus J. R. 1994. Genetic diversity within white clover (*Trifolium repens* L.) *Proceedings Agronomy Society of N.Z.* 24., 8 pp.
- Casacuberta E., Gonzalez J. 2013. The impact of transposable elements in environmental adaptation. *Molecular Ecology*, 22, 1503–1517 pp.

- Cogan N. O. I., Abberton M. T., Smith K. F., Kearney G., Marshall A. H., Williams A., Michaelson-Yeates T. P. T., Bowen C., Jones E. S., Vecchies A. C., Forster, J. W. 2006. Individual and multi-environment combined analyses identify QTLs for morphogenetic and reproductive development traits in white clover (*Trifolium repens* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 112(8), 1401–1415 pp.
- Dombrovska S. 2019. Ložņu āboliņa (*Trifolium repens* L.) Karpatu kalnu un Latvijas populāciju ģenētiskās daudzveidības salīdzinājums. Bakalaura darbs. Rīga, Latvijas Universitāte, 51 lpp.
- Dullo M. E., Labokas J., Iriondo J. M., Maxted N., Lane A., Laguna E., Jarvis A., Kell S. P. 2008. Genetic reserve Location and Design. – In: Iriondo I., Maxted N., Dulloo M. E. *Conserving Plant Genetic Diversity in Protected Areas*. CABI, 212 lpp.
- Efferth T. 2019. *Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures, Engineering, Volume 5, Issue 1*, 50-59 pp.
- Ellison N. W., Liston A., Steiner J. J., Williams W. M., Taylor N. L. 2006. Molecular phylogenetics of the clover genus (*Trifolium—Leguminosae*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 39(3), 688–705 pp.
- Fineschi S., Loreto F. 2020. A Survey of Multiple Interactions Between Plants and the Urban Environment. *Environment. Front. For. Glob. Change* 3:30, 19 pp.
- Frankham R., Ballou J. D., Ralls K., Eldridge M. D. B., Dudash M. R., Fenster C. B., Lacy R. C., Sunnucks P. 2017. *Genetic Management of Fragmented Animal and Plant Populations*. Oxford University Press, 401. pp.
- Gilbert O. L. 1989. *The Ecology of Urban Habitats*. Chapman and Hall, 369 lpp.
- Gonzalez A. P. R., Chrték J., Dobrev P. I., Dumalasova V., Fehrer J., Mraz P., Latzel V. 2016. Stress-induced memory alters growth of clonal offspring of white clover (*Trifolium repens*). *American Journal Of Botany* , 103 (9), 1567 – 1574 pp.
- Grauda D., Avotiņš K., Fokina O., Kolodinska-Brantestam A., Rashal I. 2015. Genetic diversity of white clover (*Trifolium repens* L.) from the urban area of Riga. *Proceedings Of The Latvian Academy Of Sciences, Section B, Vol. 69, No. 3 (696)*, 20–30 pp.
- Gresshoff P. M. 1980. *In vitro* culture of white clover: callus, suspension, protoplast culture, and plant regeneration. *Bot. Gaz.* 141(2), 157-164 pp.

- Grotewold E., Chappell J., Kellogg E. A. 2015. Plant genes, genomes and genetics. Wiley Blackwell, American Society of Plant Biologists, 239 pp.
- Gustine D. L. 1981. Evidence for Sulfhydryl Involvement in Regulation of Phytoalexin Accumulation in *Trifolium repens* Callus Tissue Cultures. *Plant Physiol.*, 68, 1323-132 pp.
- Hirakawa H., Kaur P., Shirasawa K., Nichols P., Nagano S., Appels R., Erskine W., Isobe S. N. 2016. Draft genome sequence of subterranean clover, a reference for genus *Trifolium*. *Nature, Sci. Rep.* 6:30358, 9 pp.
- Hofmann R. W., Campbell B. D. 2012. Leaf-level responses to ultraviolet-B radiation in *Trifolium repens* populations under defoliation pressure. *Environmental and Experimental Botany* 78, 64-69 pp.
- Hofmann R. W., Campbell B. D., Bloor S. J., Swinny E. E., Markham K. R., Ryan K. G., Fountain D. W. 2003. Responses to UV-B radiation in *Trifolium repens* L. – physiological links to plant productivity and water availability. *Plant, Cell and Environment* (2003) 26, 603–612 pp.
- Yamada T., Sakai A., Matsumura T., Higuchi S. 1993. Plant regeneration of meristematic callus of white clover (*Trifolium repens* L.) cooled to – 196 ° C by vitrification. *Euphytica* 70: 197-203 pp.
- Kalendar R., Antonius K., Smykal P., Schulman A. H. 2010. iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. *Theor. Appl. Genet.*, 121, 1419–1430 pp.
- Kalendar R., Muterko A., Boronnikova S. 2020. Retrotransposable Elements: DNA Fingerprinting and the Assessment of Genetic Diversity. *Molecular Plant Taxonomy: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 2222, 263-286 pp.
- Karadotcheva D., Vlahova M., Mihovsky Z., Alexandrova B., Stoevska T. 1995. *In Vitro* Culture and Somatic Embryogenesis of White Clover (*Trifolium Repens* L.). *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 9:1, 10-13 pp.
- Kejnocsy E., Hawkins J. S., Feschotte C. 2012. Plant Transposable Elements: Biology and Evolution. – In: Wendel F., Greilhuber J., Doležel J., Leitch I. J. *Plant Genome Diversity. Volume 1: Plant Genomes, Their Residents, and Their Evolutionary Dynamics*. London, Springer, 279 pp
- Kondorosi E., Roudier F., Gendreau E. 2000. Plant cell-size control: growing by ploidy? *Current Opinion in Plant Biology*, 3(6), 488–492 pp.

- Kunakh V., Adonin V., Ozheredov S., Blume Y. 2008. Mixoploidy in wild and cultivated *Cruciferae* species able to hybridize with *Brassica napus*. *Cytology and Genetics*, 42, 81-86 pp.
- Levin D. A. 1983. Polyploidy and Novelty in Flowering Plants. *The American Naturalist*, 122(1), 1–25 pp.
- Macey, M. G. 2007. *Flow Cytometry. Principles and Applications*. Humana Press, 288 pp.
- Marshall A. H., Michaelson-Yeates T. P. T., Meredith P. A. M. 1995. Reproductive characters of interspecific hybrids between *Trifolium repens* L. and *T. nigrescens* Viv. *Nature, Heredity* 45, 136-145 pp.
- Masclef A. 1891. *Atlas des plantes de France*. Paris, Librairie des sciences naturelles, 203 pp.
- Masuta Y., Nozawa K., Takagi H., Yaegashi H., Tanaka K., Ito T., Saito H., Kobayashi H., Matsunaga W., Masuda S., Kato A., Ito H. 2017. Inducible Transposition of a Heat-Activated Retrotransposon in Tissue Culture. *Plant Cell Physiol*, Feb 1; 58(2), 375-384 pp.
- 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 pp.
- Maxted N., Iriondo J. M., Dulloo M. E., Lane A. 2008. Introduction: The Integration of PGR Conservation with Protected Area Management. – In: Iriondo I., Maxted N., Dulloo M. E. *Conserving Plant Genetic Diversity in Protected Areas*. CABI, 212 lpp.
- McClearn B., Gilliland T.J., Delaby L., Guy C., Dineen M., Coughlan F., McCarthy B. 2019. Milk production per cow and per hectare of spring-calving dairy cows grazing swards differing in *Lolium perenne* L. ploidy and *Trifolium repens* L. composition, *Journal of Dairy Science*, Volume 102, Issue 9, 8571-8585 pp.
- Montiel P., Smith A., Keiller D. 2017. Photosynthetic responses of selected Antarctic plants to solar radiation in the southern maritime Antarctic. *Polar Research*, 18:2, 229-235 pp.
- Nečajeva J. 2015. Sēklu dīgšanu raksturojošie rādītāji. – Grām.: Gaile Z., Šterne D. Ražas svētki “Vecauce – 2015”: Lauksaimniecības zinātne reorganizācijas laikā. Zinātniskā semināra rakstu krājums. Jelgava, LLU, 58.-61.. lpp.
- Oliveira A. F., Rais F., Dettori I., Azzena M., Nieddu G. 2019. UV Light Acclimation Capacity of Leaf Photosynthetic and Photochemical Behaviour in Near-isohydric and Anisohydric

- Grapevines in Hot and Dry Environments. South African Journal of Enology and Viticulture, Vol. 40, No. 2, 18 pp.
- 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 pp.
- Rohlf F. 1988. NTSYS-pc – Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Applied Biostatistics Inc. New York. 2.1., 43 pp.
- 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 pp.
- Romero-Román M.E., Schoebitz M., Bastías R.M., Fernández P.S., García-Viguera C., López-Belchi M.D. 2021. Native Species Facing Climate Changes: Response of Calafate Berries to Low Temperature and UV Radiation. Foods, 10(1), 196 pp.
- Shang H., Li R., Wu H., Sun Z. 2019. Polysaccharides from *Trifolium repens* L. extracted by different methods and extraction condition optimization. Nature, Sci. Rep. 9:6353, 12 pp.
- Shapiro H. M. 2005. Practical flow cytometry. Fourth Edition. Wiley-liss, 681 pp.
- Soengas P., Velasco P., Padilla G., Ordas A., Cartea M. E. 2006. Genetic relationships among *Brassica napus* crops based on SSR markers. Hort Science 41(5):1195-1199 pp.
- Solecki W., Marcotullio P. J. 2013. Climate Change and Urban Biodiversity Vulnerability. – In: Elmqvist T., Fragkias M., Goodness J., Guneralp B., Marcotullio P. J., McDonald R. I., Parnell S., Schewenius M., Sendstad M., Seto K. C., Wilkinson C. Urbanization, Biodiversity and Ecosystem Services: Challenges and Opportunities. Springer, 755 pp.
- Srivastava P., Singh M., Devi G., Chaturvedi R. 2014. Herbal Medicine and Biotechnology for the Benefit of Human Health. Animal Biotechnology, 563–575 pp.
- Taylor N. L., Quesenberry K. H. 1996. Red clover science. Current plant science and biotechnology in agriculture. Kluwer Academic Publishers, 226 pp.
- Ünal, F., Tülek, S., Bingöl, M. Ü., Öztürk, Ö., Eğerci, Y., Kurbetli, İ., Canpolat, S., Sarpkaya, K., Ünlü, A., Dolar, F. S. 2020. Identification and pathogenicity studies of white clover (*Trifolium repens* L.) fungi on turfgrass areas in Turkey. Bitki Koruma Bülteni / Plant Protection Bulletin, 60 (1), 63-69 pp.

- Vienne D. 1998. *Molecular Markers in Plant Genetics and Biotechnology*. Science Publishers, 235 pp.
- Williams W. M., Ellison N. W., Ansari H. A., Verry I. M., Hussain S. W. 2012. Experimental evidence for the ancestry of allotetraploid *Trifolium repens* and creation of synthetic forms with value for plant breeding. *BMC Plant Biology*, 12:55, 10 pp.
- Williams W. M. 2014. *Trifolium repens* interspecific hybridisation: widening the white clover gene pool. *Crop & Pasture Science*, 65, 1091–1106 pp.
- Wu F., Ma S., Zhou J., Han C., Hu R., Yang X., Nie G., Zhang X. 2021. Genetic diversity and population structure analysis in a large collection of white clover (*Trifolium repens* L.) germplasm worldwide. *PeerJ*, 9:e11325, 17 pp.
- 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 pp.
- 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 pp.

### **Citi avoti:**

- Valsts zemes dienests. 2012.  
[https://balticmaps.eu/?lang=lv&draw\\_hash=habqpi&centerx=520369.87085483584&centery=6410019.99753061&zoom=1&layer=orto&ls=o](https://balticmaps.eu/?lang=lv&draw_hash=habqpi&centerx=520369.87085483584&centery=6410019.99753061&zoom=1&layer=orto&ls=o)
- Kārlis Podnieks. 2020. DatZ7070 : Datizraces algoritmi (*Data Mining Algorithms*).  
<http://podnieks.id.lv/slides/mining/mn.htm>

## PIELIKUMI

### 1. pielikums

Modificēts CTAB DNS izdalīšanas protokols (Doyle and Doyle 1987)

#### Appendix 1

Modified CTAB DNA release protocol (Doyle and Doyle 1987)

1. Auga sauso materiālu sasmalcina ar homogenizatoru (1 min, 42 osc/s).
2. Pie sasmalcinātā materiāla pievieno 800 µl CTAB buferi un ievieto termomikserī pie +60°C uz vienu stundu pie rotācijas 300 rpm.
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 600 µl 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 merkaptoetanolis;
- 6,8 ml molekulārais ūdens.

Mazgāšanas buferis:

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

## 2. pielikums

Agarozes gēla koncentrācija DNS izmēra izšķirtspējai

## Appendix 2

Agarose gel concentration for DNA size resolution

Gēla izmērs (cm)	1xTAE bufera tilpums (ml)	Agarozes daudzums (g)				Kabatiņu 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(+)

Nr.	Vietas nosaukums	Koordinātas	Lokācijas apraksts	Dabīga vai urbāna teritorija
1.	Lotringa reģions, Francija	49.207353 6.863782	Kādreizējo ogļu raktuvju karjerā, kur dabiskās sukcesijas rezultātā izveidojies neapsaimniekots zālājs. Petite-Roselle pilsētas nomalē.	D
2.	“Dzērumi”, Ķekava	56.7247 24.2184	Senas mājas pagalms	D
3.	Usmas ezers, Kuldīga	57.1636 22.1224	Mājas pagalms pie Usmas ezera	D
4.	Varšava, Polija	52.229147 20.979578	Zālienā pie kompānijas Polfa Sp.z ēkas	U
5.	Budapešta, Ungārija	47.4994 19.0378	Buda Castle parka teritorijā	U
6.	Ciecere, Skrunda	56.6824 22.1277	Pie upes “Paksīte”	D
7.	Zakopane, Polija	49.2992 19.9496	Kalna pakāje	D

8.	Alūksne	57.503517 27.262172	Dabīga pļava saimniecībā	D
9.	Staicele	57.841925 24.741006	Mežmalas grāvis	D
10.	Daugavgrīvas parks, Rīga	57.02356 24.00409	Daugavgrīvas dabas parka teritorijā gar jūru	D
11.	Viļņa, Lietuva	54.64771 25.26725	Sausa vieta lidlauka teritorijā	U
12.	Yanartas Mount Chimaera, Turcija	36.412861 30.473306	Kalna pakāje	D
13.	Līdumnieki, Priekule/Liepāja	56.262939740548 21.324527660408	Mežmala senas viensētas vietā	D
14.	Jaunpils	56.73187 23.02071	Pļava šosejas malā	U
15.	Druskininkai, Lietuva	54.0049 23.9864	Pļava netālu no viesnīcas	U
16.	Daugavpils	N 55°52'24,6" E 26°29'48,1"	Pļava pilsētas ceļa malā	U
17.	Kerne, Igaunija	59.1556 24.5218	Blakus degvielas uzpildes stacijai	U
18.	Jelgava	56°39'47.5"N 23°44'54.9"E	Pagalms pilsētas centrā	U
19.	Tori, Igaunija	58.4854783 24.8116349	Pļava pie alas upes krastā	D

<b>20.</b>	Slovākija, Pještjani	-	Piekalnes līdzenumā	D
<b>21.</b>	Slovākija, Bystrička	-	Piekalnes līdzenumā	D
<b>22.</b>	Slovākija, Dubrava	-	Augstkalnos	D
<b>23.</b>	Ukraina, Jaremče	-	Augstkalnos	D

B5 barotnes sastāvs (ar modifikācijām) (Taylor and Quesenberry 1996).

## Appendix 4

B5 medium composition (modified) (Taylor and Quesenberry 1996).

<b>Makroelementi</b>	<b>B5 (mg/l)</b>
KNO <sub>3</sub>	2500
CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O	150
MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	250
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	170
<b>Mikroelementi</b>	
KI	0.750
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3.000
MnSO <sub>4</sub> xH <sub>2</sub> O	10.000
ZnSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	2.000
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O	0.250
CuSO <sub>4</sub> x5H <sub>2</sub> O	0.025
CoCl <sub>2</sub> x6H <sub>2</sub> O	0.025
Na <sub>2</sub> EDTA	37.300
FeSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	27.800
Saharoze (g/l)	30
<b>Vitamīni</b>	
Mio-inozitols	100.0
Nikotīnskābe	1.0
Piroksidīns-HCl	1.0
Tiamīns-HCl	10.0

L2 barotnes sastāvs (ar modifikācijām) (Taylor and Quesenberry 1996).

## Appendix 5

L2 medium composition (modified) (Taylor and Quesenberry 1996).

<b>Makroelementi</b>	<b>L2 (mg/l)</b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1000
KNO <sub>3</sub>	2100
CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O	600
MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	435
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	325
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	96
<b>Mikroelementi</b>	
KI	1.0
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5.0
MnSO <sub>4</sub> xH <sub>2</sub> O	15.0
ZnSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	5.0
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O	0.4
CuSO <sub>4</sub> x5H <sub>2</sub> O	0.1
CoCl <sub>2</sub> x6H <sub>2</sub> O	0.1
Na <sub>2</sub> EDTA	33.6
FeSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	25.0
Saharoze (g/l)	25
<b>Vitamīni</b>	
Mio-inozitols	250.0
Piroksidīns-HCl	0.5
Tiamīns-HCl	2.0

## 6. pielikums

## Izmantotie palīgmateriāli

## Appendix 6

## Used consumables

<b>Palīgmateriāla nosaukums</b>	<b>Firmas nosaukums</b>	<b>Modelis/ artikuls</b>
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- 5mm	LLG Labware	9.042.581
Dažāda tilpuma kolbas, mērcilindri	-	-
Filtrpapīrs	-	-
Alumīnijs	-	-
Sterils filtrs (Cell Strainer) 40 µm Nylon	FALCON	REF 3523040
Agarozes gēla ķemmīte, forma, gumijas	-	-

## 7. pielikums

Izmantotās vielas un reaģenti

Appendix 7

Used substances and reagents

<b>Vielas vai reaģenta nosaukums</b>	<b>Firmas nosaukums</b>	<b>Artikuls/ cits</b>
iPBS koncentrāts 2076 5'-GCTCCGATGCCA-3'	BIONEER	-
iPBS koncentrāts 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
Kinetīns	-	-
Kazeīns	-	-
2,4 D	-	-
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	SIGMA-ALDRICH	A3795-500G
KNO <sub>3</sub>	Duchefa Biochemie	P0519.1000
CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O	ANALYTICA	147.02
MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	ROTH	P027.1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	POCH GLIWICE	74202112
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	ROTH	P030.1
KI	Duchefa Biochemie	P0518.0100
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	ROTH	P010.1
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	ROTH	4487.1
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	ROTH	K301.1
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	ACROS ORGANICS	10102-40-6
CuSO <sub>4</sub> x5H <sub>2</sub> O	ROTH	P025.1
CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	ROTH	7095.1
Na <sub>2</sub> EDTA	SIGMA	E6511-100G
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	ROTH	P015.1
Saharoze	SIGMA	S5391-1KG
Myo-inositol	SIGMA	I-3011
Pyroxidīne-HCl	ACROS ORGANICS	58-56-0
Thiamine-HCl	ACROS ORGANICS	67-03-8
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	-	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-
Nikotīnskābe	-	-

<b>Iekārtas nosaukums</b>	<b>Firmas nosaukums</b>	<b>Modelis/ tilpums</b>
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
Elektroniskie svāri	Shinko Denshi	ViBRO DJ-150S
UV gaismas kamera 230V-50 Hz, 180W	Cleaver Scientific Ltd	microDOC, D1HD

9. pielikums

Izmantotās datorprogrammas

Appendix 9

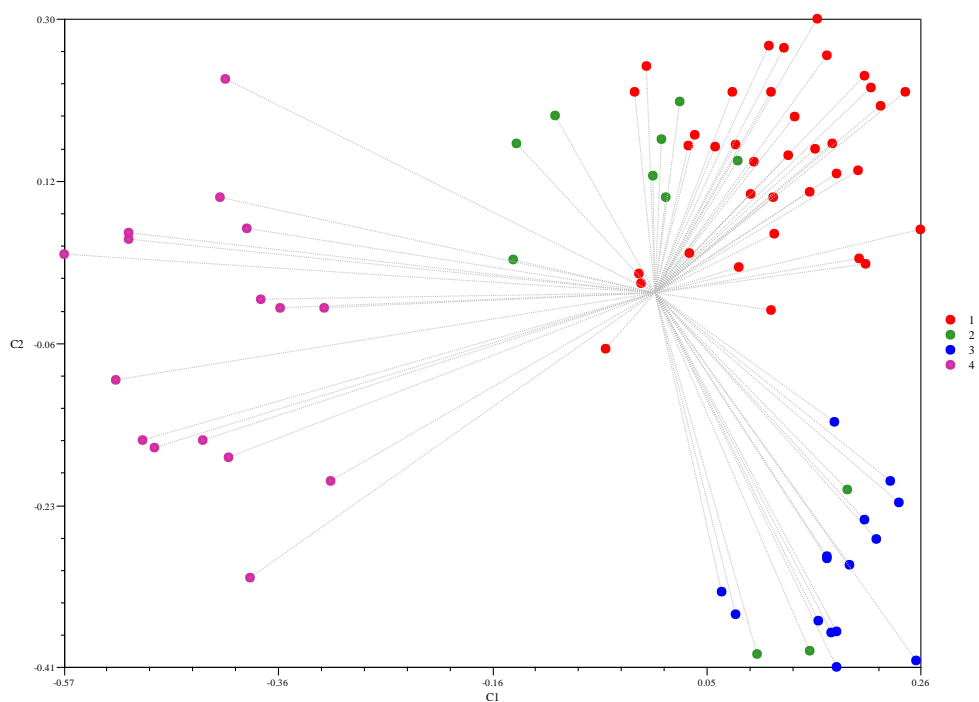
Used computer programs

Datorprogrammas nosaukums	Versija/gads
NTSYSpc	2.1/2018
Microsoft Office Excel	16.0/2016

Klāsteru sadalījums Slovēkijas un Ukrainas populācijās, izmantojot iPBS 2076 un iPBS 2079 praimerus (1 – Slovēkija (Pještjani); 2 – Slovēkija (Bystrička); 3 – Slovēkija (Dubrava); 4 – Ukraina (Jaremče)) (Dombrovska 2019)

## Appendix 10

Distribution of clusters in Slovakian and Ukrainian populations using iPBS 2076 and iPBS 2079 primers (1 – Slovakia (Piestany); 2 – Slovakia (Bystrička); 3 – Slovakia (Dubrava); 4 – Ukraine (Yaremche)) (Dombrovska 2019)



Maģistra darbs „Ložņu āboliņa (*Trifolium repens* L.) Eiropas 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

31.05.2021.

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: asoc. prof., Dr. biol. Dace Grauda



31.05.2021.

Recenzents:

prof., Dr. biol. Inese Kokina

Darbs iesniegts Bioloģijas fakultātē 31.05.2021.

Lietvede: \_\_\_\_\_ paraksts

Darbs aizstāvēts maģistra gala pārbaudījuma komisijas sēdē

07.06.2021. prot. Nr. \_\_\_\_\_, vērtējums \_\_\_\_\_

Komisijas sekretārs/e \_\_\_\_\_ paraksts