

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE  
AUGU FIZIOLOĢIJAS KATEDRA

AUGU AUDU KULTŪRU IZMANTOŠANA RETĀS  
PIEKRASTES SUGAS *ERYNGIUM MARITIMUM*  
BIOLOĢIJAS PĒTĪJUMOS

Bakalaura darbs

Autors: Vendija Lazdiņa

Stud. apl. Nr.: v118009

Darba vadītājs: Dr. hab. biol., prof. Ģederts Ieviņš

Darba konsultanti: Dr. biol., Angelika Voronova

RĪGA 2022

## Kopsavilkums

Jūrmalas zilpodze (*Eryngium maritimum* L.) ir Latvijā reti sastopama un apdraudēta augu suga. Pēdējās desmitgadēs sugas izplatības areāla ziemeļaustrumu daļā zilpodzes indivīdu skaits un izplatība ir samazinājies. Par galveno iemeslu tam uzskata problēmas ar ģeneratīvo vairošanos. Ar anatomiskās izpētes palīdzību secināja, ka zilpodzes saknes satur veģetatīvās vairošanās struktūras. Audu kultūru eksperimentos noskaidroja, ka zilpodzes sakņu ievadīšanai piemērotākā apstrāde ir ar HgCl<sub>2</sub>, bet zilpodzes pavairošanai un apsākņošanai piemērotākā ir *Murashige & Skoog* barotnes modifikācija ar pievienotu 6-benzilaminopurīnu. Lai pārlicinātos par audu kultūrā ilgstoši uzglabāta zilpodzes materiāla ģenētiskās identitātes saglabāšanos, veica ģenētiskās stabilitātes pārbaudi, izmantojot iPBS marķierus.

Atslēgvārdi: *Eryngium maritimum*, audu kultūras, *in vitro*, iPBS, veģetatīvā vairošanās.

## Summary

Sea holly (*Eryngium maritimum* L.) is a rare and endangered species in Latvia. The number of individuals and distribution of sea holly have decreased in the north-eastern part of the distribution range in the last decades. The main reason is believed to be problems in generative reproduction. Using anatomical examination it was concluded that sea holly roots contain vegetative reproduction structures. In experiments using tissue culture it was observed that HgCl<sub>2</sub> is the most suitable method for sterilization during culture establishment by roots and the most suitable *Murashige & Skoog* nutrient medium modification for sea holly propagation and rooting is by adding 6-benzylaminopurine. To verify the preservation of the genetic identity of the sea holly material in the tissue culture after long storage periods, genetic stability was tested using iPBS markers.

Keywords: *Eryngium maritimum*, tissue culture, *in vitro*, iPBS, vegetative propagation.

## Saturs

Ievads.....	5
1. Literatūras apskats .....	6
1.1. <i>Eryngium maritimum</i> raksturojums .....	6
1.1.1. Vispārīgs raksturojums .....	6
1.1.2. Izplatība un biogeogrāfija .....	7
1.1.3. Ģenētiskā daudzveidība.....	8
1.1.4. Sēklu bioloģija un vairošanās .....	9
1.1.5. Pielāgošanās vides apstākļiem .....	10
1.2. Audu kultūru izmantošana reto sugu bioloģijas pētījumos un saglabāšanā .....	11
1.2.1. Sugu saglabāšana <i>ex situ</i> .....	11
1.2.2. Augu audu kultūras .....	11
1.2.3. Augšanas regulatori .....	12
1.2.4. Audu kultūru pētījumi ar <i>E. maritimum</i> .....	12
1.2.5. Sakņu ievadīšana audu kultūrā .....	13
1.3. Molekulāro metožu izmantošana .....	14
1.3.1. Molekulārie marķieri ģenētiskās daudzveidības ģenētiskās daudzveidības noskaidrošanā .....	14
1.3.2. Mobilo elementu izmantošana reto sugu genotipēšanā .....	16
1.3.3. Transpozonu aktivitāte audu kultūrās saglabājamo augu genomā .....	17
2. Materiāli un metodes .....	20
2.1. Pētījuma objekts .....	20
2.2. Anatomisko griezumu pagatavošana un izpēte .....	20
2.3. Sakņu mikrospraudeņu ievadīšana <i>in vitro</i> .....	21
2.4. <i>E. maritimum</i> pavairošana <i>in vitro</i> .....	22
2.5. DNS izdalīšana .....	23
2.6. iPBS praimeru atlase un amplifikācija .....	25
2.7. iPBS produktu analīze .....	27
2.8. iPBS rezultātu analīze .....	28
3. Rezultāti .....	29
3.1. Anatomisko griezumu izpēte .....	29
3.2. Sakņu mikrospraudeņu ievadīšana <i>in vitro</i> .....	32
3.3. Pavairošana <i>in vitro</i> .....	33
3.4. Ģenētiskās stabilitātes pārbaude .....	39
4. Diskusija .....	44
5. Secinājumi .....	52
6. Pateicības .....	53
7. Literatūras saraksts.....	54
Pielikumi .....	66

## Ievads

Jūrmalas zilpodze (*Eryngium maritimum* L.) ir reti satopama un apdraudēta piekrastes augu suga. Tās dzīvotne ir priekškāpas, pelēkās kāpas un sausas piejūras pļavas (Andersone *et al.* 2011). Baltijas jūras reģionā plašas sugai piemērotu biotopu teritorijas ir sastopamas Latvijā un Igaunijā (Ievinsh *et al.* 2020). Uzskata, ka Latvijā sugas izplatību ierobežojošais faktors ir zemā sēklu dīgtspēja (Necajeva, Ievinsh 2013).

Pēdējos veiktajos *E. maritimum* Latvijas populāciju pētījumos ir secināts, ka tās veido relatīvi vecu indivīdu neliels skaits, turklāt tās galvenokārt vairojas veģetatīvi – ar pazemes daļām (Ievinsh *et al.* 2020). Līdz šim literatūrā nav aprakstīti *E. maritimum* veģetatīvās vairošanas pētījumi, tai skaitā sakņu ievadīšana audu kultūrā (Isermann, Rooney 2014), bet ir aprakstīta veiksmīga daudzu citu augu sugu pazemes daļu ievadīšana un pavairošana (da Silva *et al.* 2011).

Audu kultūras sniedz iespēju saglabāt *ex situ*, pavairojot un veikt eksperimentus ar reti sastopamiem augiem, minimāli ietekmējot to dabiskās atradnes (Kļaviņa *et al.* 2006). Lai saglabātu reti satopamo sugu ģenētisko identitāti, audu kultūru bankās tiek izmantota minimālas iejaukšanās un lēnas augšanas stratēģija, bet pavairošanas nolūkos izmanto barotņu variācijas ar pievienotiem augšanas regulatoriem.

Audu kultūru apstākļi rada augam oksidatīvo stresu (Krishna *et al.* 2016). Tā ietekmē var aktivizēties transponējamie elementi (*transposable element*, TE) (Wessler 1996). Šīs strukturālās izmaiņas ir iespējams pārbaudīt izmantojot starpprimeru piesaistes rajonu (*inter-primer binding site*, iPBS) marķierus, kas amplificē rajonus starp tuvu esošām garo terminālo atkārtojumu (*long terminal repeat*, LTR) sekvencēm (Kalendar *et al.* 2010). Tā ir iespēja veikt ģenētiskās stabilitātes pārbaudi sugām, kam ģenētiskās daudzveidības pētīšanu apgrūtina informācijas trūkums par genoma sekvencēm.

Darba mērķis: pārbaudīt audu kultūru izmantošanas iespējas *E. maritimum* bioloģijas pētījumos.

Darba uzdevumi:

1. Nedestruktīva *E. maritimum* sakņu iegūšana un anatomiskā izpēte.
2. Sakņu fragmentu ievadīšanas audu kultūrā eksperimenta veikšana.
3. Biežāk lietoto augšanas regulatoru ietekmes novērtēšana uz *E. maritimum* pavairošanu audu kultūrā.
4. Ilgstoši audu kultūrā uzglabāta augu materiāla ģenētiskās stabilitātes pārbaude izmantojot iPBS marķierus.

# 1. LITERATŪRAS APSKATS

## 1.1. *Eryngium maritimum* raksturojums

### 1.1.1. Vispārīgs raksturojums

*E. maritimum* ir reti satopama litorāla suga, kas ir ierakstīta Latvijas Sarkanajā grāmatā 1. kategorijā (LSA 2003), kā arī Ministru kabineta noteikumos Nr. 396 par īpaši aizsargājamo sugu un ierobežoti izmantojamo īpaši aizsargājamo sugu sarakstu.



1.attēls. *Eryngium maritimum* dzinumi 2021.gada jūnijā. Užavas kāpās, Latvija.

Figure 1. Shoots of *Eryngium maritimum* in June 2021. Dunes of Uzava, Latvia.

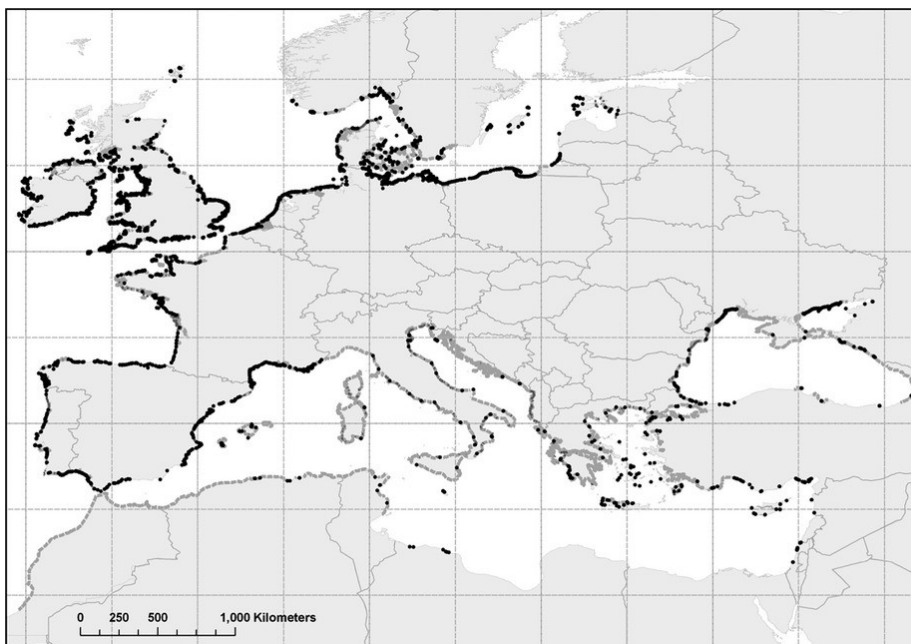
Jūrmalas zilpodze ir daudzgadīgs hemikriptofīts ar masīvu mietsakni, asām, gaļīgām lapām un gaiši zilganu ziedkopu (Isermann, Rooney 2014). Augs ir vidēja lieluma (ap 30-60 cm) un pieder čemurziežu dzimtai (*Umbelliferae*, syn. *Apiaceae*) (Priedītis 2014). Tā stumbrs ir zarains, un visu augu klāj zilgana apsarme, bieži veido kupolveida formu. Augam raksturīga spēcīga sakņu sistēma, ko veido labi attīstīta mietsakne un biezas sānsaknes, kas izplatās laterāli no stumbra. Apakšējā stumbra daļa izskatās kā sakne un ir apbērtā ar substrātu (Isermann, Rooney 2014). Apakšējās lapas ir ar kātu, bet augšējās – sēdošas. Lapas ir staraini daivainas un to malas zobainas ar cietu dzeloni katra zobiņa galā. Ziedi ir ieapaļi blīvā galviņveida čemurā ar zilām vainaglapām (Priedītis 2014).

Vīkala lapas ir līdzīgas stumbra lapām, arī dzeloņainas, bet rombiskas. Sēkla ir ovālveidīga ar āķveidīgiem sariem augšpus sēklai (Stace 2010; Vētra 2018).

### 1.1.2. Izplatība un bioģeogrāfija

*E. maritimum* ir daudzgadīgs augs, kas raksturīgs Eiropai, Ziemeļāfrikai un vidējiem Austrumiem (Hulten, Fries 1986; Curle *et al.* 2004). Tas sastopams smilšainu okeāna un jūras pludmaļu augšējā ģeolitorālajā un epilitorālajā zonā. Ziemeļu populācijas veido fragmentēti nelieli laukumi jūras piekrastē. Tālākās atradnes ziemeļu virzienā konstatētas Botnijas līcī un Sāremā salu dienvidos (Tyler 1969; Olšaukas 1996; Isermann, Rooney 2014). Nelielās un izolētās populācijas palielina izzušanas risku, jo šādās populācijās pastāv inbrīdinga depresijas risks (Necajeva, Ievinsh 2013). Pēdējo gadu laikā vairākas zināmās populācijas Norvēģijā, Zviedrijā, Polijā, Lietuvā, Latvijā un Igaunijā ir ievērojami samazinājušās un daudzas pat izzudušas (Curle *et al.* 2007; Labuz 2007; Zolkos *et al.* 2007; Aviziene *et al.* 2008; Olšaukas, Urboniene 2008; Minasiewicz 2011; Ieviņa *et al.* 2019).

Suga ir apdraudēta lielākajā daļā Ziemeļeiropas, kur arī ir sugas ziemeļu izplatības areāla robeža (Ievina *et al.* 2010). Latvijā ir zināmas divas atradnes – Ziemupē un Užavā (LSA 2003), kā arī bijuši novērojumi pie Papes ezera un Sārnotes (Galenieks 1957; Vētra 2018).



2. attēls. *Eryngium maritimum* izplatība Eiropā un pieguļošajās teritorijās.

Figure 2. The distribution of *Eryngium maritimum* in Europe and adjacent areas. (Isermann, Rooney 2014)

Vēsturiskie dati apstiprina sugas izplatības fragmentāciju nelielās populācijās, turklāt pēdējo 150 gadu laikā raksturīga populāciju skaita un izmēra samazināšanās (Curle *et al.* 2004). Fragmentēto populāciju veidošanos saistībā ar augļu izplatīšanos lielos attālumos noliedz, jo tiem ir relatīvi zema peldspēja un izturība sālsūdenī. Attiecīgi iespēja izplatīties lielos attālumos ar sēklām tiek uzskatīta par nelielu.

Suga ir introducēta daļā Ziemeļamerikas ar nolūku rekonstruēt jūras krastus (Lieberman, O'Neill 1988; Isermann, Rooney 2014). Eiropas mērenajā un Vidusjūras reģionā tā ir viena no retākajām un apdraudētākajām augu sugām tieši piemērotu biotopu izzušanas un zemes izmantojuma maiņas dēļ (Isermann, Rooney 2014). Turklāt suga nav konkurētspējīga ātraudzīgu augu sabiedrībās, kādas raksturīgas reģionam. Lai gan uzskata, ka piekrastes sugu samazināšanās ir primāri saistīta ar piemērotu biotopu teritoriju samazināšanos un antropogēno aktivitāšu izraisīto krasta eroziju (Levin *et al.*, 2008; Iwasato, Nagamatsu 2018), Baltijas reģionā ir plašas sugai potenciāli piemērotu biotopu teritorijas Latvijā un Igaunijā (Ievinsh *et al.* 2020).

### 1.1.3. Ģenētiskā daudzveidība

Reto un apdraudēto augu populāciju ģenētiskā daudzveidība var atspoguļot populācijas stāvokli, vēsturi, mijiedarbību ar vidi, antropogēno ietekmi un ļauj lemt par piemērotāko aizsardzības stratēģiju (Ieviņa *et al.* 2010). Sugas indivīdu ģenētiskā daudzveidība nosaka tā vispārējo spēju adaptēties mainīgiem vides apstākļiem, tāpēc sugas daudzveidības saglabāšana ir svarīga sugas evolūcijai un ilgtspējīgai dabas resursu izmantošanai.

*E. maritimum* ģenētiskā daudzveidība ir pētīta pēdējās dekādēs izmantojot molekulāros marķierus (Clausing *et al.* 2000; Kadereit, Westberg 2007; Ievina *et al.* 2010; Andersone *et al.* 2011). Savvaļas augu ģenētisko izpēti apgrūtinā informācijas trūkums par DNS sekvencēm. Līdz šim ISSR marķieru un hloroplastu DNS sekvenēšana nav bijusi pietiekami efektīva, lai noteiktu ģenētiskās atšķirības starp ziemeļu *E. maritimum* populācijām (Ievina *et al.* 2010). Sugas daudzveidības pētījumos ar OC ISSR praimeru izmantošanu ir konstatēti 12,5% polimorfisma starp 51 paraugu no Latvijas populācijām (Ievina *et al.* 2010).

Pārbaudot sugas ziemeļu populāciju ģenētisko daudzveidību ar uz retrotranspozoniem balstītu SSAP molekulāro marķieru izmantošanu ieguva 20,4% polimorfo joslu, kas nav daudz salīdzinot ar citām sugām (Ieviņa *et al.* 2010). To skaidroja ar zemu ziemeļu populāciju ģenētisko daudzveidību un zemu izvēlēto retrotranspozonu aktivitāti sugas genomā. Nesenākajās publikācijās minētais norāda, ka daudzveidības parametri būtiski atšķiras starp populācijām (Ieviņa

*et al.* 2019). Daļai populāciju ģenētiskā mainība ir izteikti zema, bet daļai mērena. Abas Latvijas populācijas uzrādīja īpaši augstu diverģenci un zema ģenētisko daudzveidību. Alēļu frekvenču analīzes atklāja, ka Latvijas populāciju ģenētiskā atšķirība rodas no kopēju alēļu iztrūkuma nevis saistībā ar jaunu alēļu veidošanos. Ievērojamais unikālo genotipu skaits Latvijas populācijās norāda un klonālo vairošanos vai pašapputi. Bez tam, diferenciāciju starp ziemeļu populācijām būtiski neietekmē ģeogrāfiskais attālums. Balstoties uz šiem rezultātiem izdarīti secinājumi, ka Latvijas populācijas pastāvēšana ir nopietni apdraudēta.

#### 1.1.4. Sēkļu bioloģija un vairošanās

Vairāki autori ir aprakstījuši problēmas ar ģeneratīvo vairošanos kā galveno iemeslu *E. maritimum* sarūkošajam indivīdu skaitam un izplatībai areāla ziemeļaustrumu daļā (Aviziene *et al.* 2008; Minasiewicz *et al.* 2011; Necajeva, Ievinsh 2013; Ievinsh *et al.* 2020). To veicina neliels skaits nobriedušu sēkļu un to dīgšanai nepiemēroti apstākļi (Aviziene *et al.*, 2008; Andersone *et al.* 2011). Vidējā gada temperatūra un veģetācijas sezonas nokrišņu daudzums ir svarīgi faktori ģeneratīvajai reprodukcijai, sēkļu nobriešanai un dīgšanai, attiecīgi arī ģenētiskā materiāla pārnesei (Ieviņa *et al.* 2019). Zemu sēkļu kvalitāti veicina augstais nokrišņu daudzums zemas gaisa temperatūras apstākļos, novedot pie zemas fotosintētiskās produktivitātes, attiecīgi arī fizioloģiskās pielāgošanās samazināšanās, kā arī ir vēl neidentificēti faktori, kas negatīvi ietekmē sēkļu nogatavošanos un dīgšanu (Andersone *et al.* 2011).

Sugas vairošanās aprakstīta gan kā ģeneratīva ar sēklām, gan veģetatīva ar rizomiem vai sakņu fragmentiem (Curle *et al.* 2004). Ziemeļu populācijās ir aprakstīts neliels nobriedušo sēkļu daudzums un zema dīgspēja (Curle *et al.* 2007; Aviziene *et al.* 2008; Minasiewicz *et al.* 2011; Ieviņa *et al.* 2019).

*Apiaceae* dzimtai, kam pieder arī *E. maritimum*, bieži raksturīgs sēkļu organiskais miera periods (Finch-Savage, Leubner-Metzger 2006; Andersone *et al.* 2011). Pētījumos ir pierādīts, ka *E. maritimum* sēkļu organiskā miera perioda pārtraukšanai ir nepieciešama aukstā stratifikācija (Walmsley, Davy 1997; Curle *et al.* 2007; Andersone *et al.* 2011).

Par veģetatīvo pavairošanos liecina augu sakārtojums grupās ar tuvu esošiem dzinumiem (Żółkoś *et al.* 2007; Andersone *et al.* 2011). Pateicoties mehāniskiem bojājumiem, no sakņu nodālājām meristēmām spēj veidoties jauni dzinumi. Tas sekmē veģetatīvo pavairošanos, izdzīvošanas iespējas un relatīvi ilgu indivīda dzīves ciklu. Latvijas *E. maritimum* populācijās novērots, ka mehāniski bojātām saknēm no 10 līdz 30 cm dziļumā veidojas jauni dzinumi un

sānsaknes (Andersone *et al.* 2011). Par veģetatīvo vairošanos kā galveno izplatības veidu liecina ziemeļu reģiona populāciju ģenētiskās daudzveidības pētījumi. Abās Latvijas populācijas konstatēta ekstrēmi zema ģenētiskā daudzveidība, kas liecina par pašapputi vai veģetatīvo vairošanos (Ievina *et al.* 2010; Ieviņa *et al.* 2019). *E. maritimum* veģetatīvā vairošanās līdz šim nav eksperimentāli izpētīta (Iserman, Rooney 2014; Ievinsh *et al.* 2020).

#### 1.1.5. Pielāgošanās vides apstākļiem

Pēc Ellenberga (Hill, Ellenberg 1999) indikatoru vērtībām, sugai ir augstas prasības pret gaismas pieejamību. Augiem piemērotas mēreni mitras augsnes, ir vidējas prasības pret slāpekļa pieejamību augsnē. Sāļuma ziņā suga ir raksturīga piekrastes augu sabiedrībās, bet ir bieži sastopama arī saldūdens tuvumā un citviet iekšzemē. Augsnes pH indikatori norāda uz augšanu viegli skābās un neitrālās augsnēs, bet nekad ļoti skābās, tutpretim pēc Tyler *et al.* (2021) indikatoru vērtībām tā aug sārmainās augsnēs, kas bagātas ar slāpekli un fosforu. Suga sastopama vietās, kur vidējā minimālā gada temperatūra nav zemāka par 5 °C. Tās izplatības areālu raksturo kā vāji okeānisku. Reprodukcija notiek tikai traucētā vai atklātā augsnē, sēklas izplatās pasīvi, ir raksturīga arbuskulārā mikoriza.

Vides apstākļiem ir liela nozīme zilpodzes ziemeļu populāciju ģenētiskajā daudzveidībā. Ziemeļos *E. maritimum* atradnes ir daudzveidīgas no substrāta un klimatisko apstākļu skatupunkta (Ieviņa *et al.* 2019). Pielāgošanos klimatiskajiem apstākļiem galvenokārt nodrošina vitāla sakņu sistēma ar augstu reģenerācijas spēju, ļaujot veiksmīgu augšanu uz dažādiem substrātiem pludmalē, priekškāpās, daļēji nostiprinātās primārajās kāpās, fiksētās pelēkajās kāpās un kāpu mežā. Sugas sakņu sistēmas morfoloģija ir atkarīga no augšanas apstākļiem. Uzskata, ka ņemot vērā sakņu īpašības, viena indivīda dzīves ilgums varētu būt pat vairākas desmitgades. Alpīnās vidēs daļa indivīdu saglabājas pat vairākus gadsimtus, pateicoties reprodukcijai ar klonālām struktūrām. (Steinger *et al.* 1996; Andersone *et al.* 2011). Līdzīgs veģetatīvās vairošanās veids raksturīgs Brazīlijas tropisko savannu augiem ar sarežģītām pazemes struktūrām, ko dēvē par ksilopodijiem (Miranda *et al.* 2018). Līdzīgi kā *E. maritimum* pazemes daļām arī ksilopodiju augšējos reģionos raksturīga stumbra struktūra, bet sakņu struktūra zemākajās daļās (Hayashi, Appezzato-da-glória 2007).

*E. maritimum* saknēm ir konstatēta relatīvi augsta mikorizas simbioze veģetācijas sezonas laikā. To būtiski neietekmē lokālie vides faktori (Andersone *et al.* 2011). Pēc molekulārajām

analīzēm to veido vismaz 16 sēņu sugas. Tātad simbiozei ir nozīme, lai adaptētos piekrastes kāpu apstākļiem.

Populācijas ģenētiskā daudzveidība nosaka sugas vispārējo spēju pielāgoties specifiskai un mainīgai videi. Attiecīgi, nosakot sugas populāciju ģenētiskās daudzveidības rādītājus, ir iespējams pieņemt lēmumus par nepieciešamajiem sugas saglabāšanas pasākumiem (Ievina *et al.* 2010). Daļēji fiksēto kāpu biotopos augošie *E. maritimum* indivīdi ir pārstāvēti ar neliela skaita relatīvi vecām rametām, tāpēc šo populāciju ilgtermiņa saglabāšanas iespējas ir salīdzinoši zemas (Ievinsh *et al.* 2020). Tomēr nav skaidrs, kādi vides faktori ir sekmējuši šī brīža populāciju izveidošanos un nostiprināšanos un vai klimata pārmaiņas var veicināt dabisku Baltijas reģiona atradņu atjaunošanos.

## **1.2. Audu kultūru izmantošana reto sugu bioloģijas pētījumos un saglabāšanā**

### *1.2.1. Sugu saglabāšana ex situ*

Aizsargājamo un reto augu saglabāšanai *ex situ* izmanto lauka kolekcijas botāniskajos dārzos, sēkļu bankas, *in vitro* kultūras un kriosaglabāšanu (Holobiuc, Rodica 2008). *In vitro* kultūrām ir liela nozīme reto un aizsargājamo augu ģenētisko resursu saglabāšanā (Engelmann 1997). Vadoties pēc ilguma, tiek izšķirtas divas galvenās saglabāšanas kategorijas (Engelmann, Engels 2002).

- Vidēja perioda saglabāšana – auga daļas tiek saglabātas aseptisku audu kultūru veidā, izmantojot lēnās augšanas procedūras;
- Ilgtermiņa saglabāšana – auga materiāls tiek saglabāts šķidrā slāpekļī (kriosaglabāšana).

### *1.2.2. Augu audu kultūras*

Augu audu kultūras ir tehnoloģija, kurā augošas augu šūnas, audi un daļas ir izolētas no mātes auga un audzētas mākslīgos apstākļos. Izšķir organizētas vai neorganizētas audu kultūras. Organizētā kultūrā tiek saglabāta konkrētas struktūras augšana, bet neorganizētā kultūrā iztrūkst vairākas auga struktūras. Neorganizētas kultūras iedala kallusa, suspensijas, protoplasta un putekšņīcu kultūrās (Geogre 1993). Kultūru audzēšanai parasti izmanto agarizētas barotnes, kuru sastāvā ir mikroelementi un makroelementi, reducētā oglekļa avots, vitamīni, aminoskābes un augšanas regulatori (Skoog, Miller 1957). Augus var pavairot audu kultūrās, jo to šūnām var

piemist totipotence – spēja noteiktos apstākļos reģenerēt visu augu no vienas šūnas vai šūnu grupas. Totipotence parasti piemīt jauniem augu audiem un meristemātiskiem audiem.

Ar augu audu kultūrām ir iespējams uzglabāt *ex situ* retus un aizsargājamus augus, tai skaitā arī *E. maritimum*, kā arī tos pavairot, neietekmējot to esošās atradnes (Kļaviņa *et al.* 2006). Kopš 2003. gada Nacionālajā botāniskajā dārzā (NBD) augu ekofizioloģijas laboratorijā *in vitro* tiek uzturētas Latvijā retas un aizsargājamas augu sugas, lai sasniegtu globālās augu saglabāšanas stratēģijas mērķus (*Global Strategy for Plant Conservation. Decision IV/9. Secretariat of the Convention on Biological Diversity, 2002*). Audzēšanā var izmantot minimālas iejaukšanās stratēģiju, ļaujot saglabāt to ģenētisko identitāti, vai arī izmantot sintētiskos augšanas regulatorus, kā rezultātā bieži attīstās kalluss. Kallusa kultūras ļauj iegūt daudzveidīgu ģenētisko materiālu. Atkarībā no mērķa izvēlas atbilstošo stratēģiju (González-Benito, Martín 2011).

Visefektīvāk audu kultūru bankās var izmantot lēnās augšanas stratēģiju – konkrētajai auga sugai piemeklējot tādus apstākļus, kas nodrošina minimālu augšanu un dzīvotspējas saglabāšanos bez regulāras audu pārstādīšanas jaunā kultivēšanas vidē (Kļaviņa *et al.* 2006). Šādā veidā ir lielāka iespēja saglabāt augu ģenētisko identitāti, kas ir svarīgi retajām populācijām.

### 1.2.3. Augšanas regulatori

Audu kultūrās bieži izmanto dažādus augšanas regulatorus, lai ietekmētu augu šūnu attīstības ceļu (Jafari *et al.* 2011), piemēram, augsnius un citokinīnus. Tomēr to izmantošanas iespējas ir ierobežotas, jo tie var izraisīt vitrifikāciju un citus fizioloģiskus traucējumus (Gentile *et al.* 2014).

Tādi citokinīni kā 6-benzilaminopurīns (BAP) un kinetīns tiek plaši izmantoti, lai mazinātu apikālās meristēmas dominanci un inducētu sānu un adventīvo pumpuru attīstību (Madhulatha *et al.* 2004). Lai gan BAP lietošana stimulē dzinumu proliferāciju, ir zināms, ka tam piemīt arī mutagēns efekts, izraisot neraksturīgu jauno dzinumumu veidošanos (Bairu *et al.* 2008). Izmantojot barotnes ar BAP, tas var uzkrāties auga pamatnē līdz pat 6 nedēļām, inhibējot apsākņošanos (Werbrouck *et al.* 1996). Kinetīnu izmanto, piemēram, lai *in vitro* ierosinātu kallusa veidošanos no *Durio zibethinus* lapām (Handayani *et al.* 2019).

*Meta*-topolīna izmantošana vairākām augu sugām arī ir noderīga vitrifikācijas, novecošanas un galotnes nekrozes kontrolēšanā (Gentile *et al.* 2014). Turklāt, izmantojot *meta*-topolīnu, ir mazāk traucēta apsākņošanās nekā ar BAP.

Pētījumos ar *Bixa orellana* L. sakņu eksplantiem (da Cruz *et al.* 2014) zeatīna izmantošana ļāva iegūt vairāk adventīvo pumpuru nekā izmantojot BAP, bet arī bija novērojamas nevēlamas

morfoloģiskas novirzes starp jaunajiem dzinumiem. Citokinīnus izopenteniladenīnu (2-iP) un kinetīnu iesaka izmantot izturīgu un garu dzinumu iegūšanai (Ružić, Vujović 2008).

#### 1.2.4. *Audu kultūru pētījumi ar E. maritimum*

Kā potenciāli piemērotākā metode ģenētiskās daudzveidības palielināšanai ir aprakstīta audu kultūrā pavairotu augu ieviešana atradnēs. Kā izejas materiālu audu kultūrai varētu izmantot sakņu fragmentus no tuvākajām populācijām, jo pat neliela diferenciācija var būt sākumpunkts evolucionārai izaugsmei (Ieviņa *et al.* 2019). *E. maritimum* veģetatīvā vairošanās līdz šim nav eksperimentāli izpētīta (Iserman, Rooney 2014; Ievinsh *et al.* 2020)

NBD kolekcijā audzētais *E. maritimum* materiāls ir iegūts no Latvijas atradņu sēklām (Kļaviņa *et al.* 2006). No izdīgušajām sēklām visām attīstījās jaunie dzinumi. Veiksmīgam sēklu dīgšanas procesam nepieciešams izmantot siltās un aukstās stratifikācijas periodus, lai apturētu miera stāvokli.

Vairāki audu kultūru pētījumi veikti tieši *E. maritimum* vērtīgās farmakoloģiskās aktivitātes dēļ, ko izraisa sekundāro metabolītu augstais saturs. Sakņu kultūru pētījumos ir pierādījis, ka audu kultūru pavairošana ir vērtīga kā reto sugu aizsargāšanas metode un atjaunojama augstas kvalitātes augu materiāla iegūšanas metode sekundāro metabolītu ražošanai (Kikowska *et al.* 2014). Arī ar NBD kolekcijas materiālu ir veikti pētījumi ar mērķi noskaidrot fenola satura izmaiņas un antioksidantu aktivitāti atkarībā no barotnes (Vētra 2016; 2018).

#### 1.2.5. *Sakņu ievadīšana audu kultūrā*

Gan lapas, gan saknes var izmantot kā eksplantus un ievadīt audu kultūrā ar MS (Murashige, Skoog 1962) barotni, kam pievienoti citokinīni, lai inducētu attīstību (Liang *et al.* 2020). *In vitro* organoģenēzes laikā citokinīni veicina gēnu ekspresiju, kas ir atbildīgi par *de novo* dzinumu meristēmu veidošanos (da Cruz *et al.* 2014). Dzinumi *de novo* var veidoties no kambija, pericikla vai parenhīmas proliferācijas (Apezzato-da-Glória *et al.* 2008).

Sakne ir augstāko augu orgāns, kas parasti atrodas augsnē. Tās funkcijas ir nostiprināt augu augsnē, uzņemt ūdeni ar tajā izšķīdušajām minerālvielām, kā arī ar saknēm augs var veģetatīvi vairoties (Bumbura *et al.* 1967) Uz saknēm adventīvie pumpuri veidojas tādiem augiem kā *Salix* sp., *Populus* sp., *Cerasus vulgaris*, *Syringa* sp., *Rubus idaeus*, *Cirsium arvenese*, *Taraxacum officinale*. Veiksmīga reģenerācija no sakņu eksplantiem ir aprakstīta *Populus tremula* (Vinocur *et al.* 2000), *Lycopersicon* sp. (Peres *et al.* 2001), *Diospyros kaki* (Carvalho, Biasi 2004), *Helianthus*

*annus* × *Helianthus tuberosus* (Fambrini *et al.* 2003), *Melia azedarach* (Vila *et al.* 2005), *Eleutherococcus koreanum* (Park *et al.* 2005), *Arabidopsis* (Atta *et al.* 2009), *Azadirachta indica* (Arora *et al.* 2010), *Cleome rosea* (Simoes *et al.* 2009), *Solanum melongena* (Xing *et al.* 2010), *Brassica oleraceae* (Yang *et al.* 2010) un citiem pēc da Silva *et al.* 2011. Turklāt, ir pierādīts, ka *in vitro* reģenerācijas procesā no sakņu eksplantiem netiek inducētas DNS izmaiņas, salīdzinot ar sēkļu eksplantu izmantošanu (da Silva *et al.* 2011).

Saknes kā eksplantus izmanto *Citrus aurantifolia*, *Spinacia oleracea*, *Gentiana triflora*, *Ocimum basilicum*, *Populus tremula*, *Aralia elata*, *Centaurea ultreiae* un citu augu pavairošanai. Saknes ir piemērots eksplantu avots masveida pavairošanai, jo *in vitro* tās ir viegli uzturēt un ar tām manipulēt (Vinocur *et al.* 2000; Rocha *et al.* 2012) Eksperimentos ar *Arabidopsis* sp. sakņu eksplantiem *in vitro* pierādījies, ka jaunie dzinumi attīstās gan tieši, gan netieši. Tiešās organoģenēzes procesā jaunie dzinumi sakņu eksplantiem veidojās no meristemoīdiem pericikla zonā, bet netiešās organoģenēzes procesā pumpuri veidojās no meristemoīdiem kallusa perifērijā (Rocha *et al.* 2012). Taču neliels kallusa daudzums ir novērojams gan tiešajā, gan netiešajā organoģenēzē (Rosa *et al.* 2016).

Ievadot *in vitro* *Passiflora edulis* sakņu eksplantus, jaunie pumpuri veidojas tiešās organoģenēzes ceļā no pericikla, ko uzskata par izstieptu meristēmu augā (Evert 2006; Smet *et al.* 2006; Rocha *et al.* 2012). Eksperimentā ar *Passiflora suberosa*, ievadot sakņu fragmentus audu kultūrā, bezhormonu barotnēs eksplantiem nenovēroja morfoģenētiskas izmaiņas, bet 4,5 vai 9,0 μM BAP pievienošana veicināja reģenerāciju (Rosa *et al.* 2016). Optimālā citokinīnu koncentrācija barotnē ir atkarīga no endogēno auksīnu līmeņa dažādos audos (Dornelas, Vieira 1993; 1994; Rosa *et al.* 2016).

### **1.3. Molekulāro metožu izmantošana**

#### *1.3.1. Molekulārie marķieri ģenētiskās daudzveidības noskaidrošanā*

Molekulārie marķieri tiek plaši pielietoti ģenētiskās daudzveidības, radniecības, izcelsmes, populāciju strukturālajos un filoģenētiskajos pētījumos (Marwal, Gaur 2020). Ilgus gadus šie pētījumi balstījās uz nelielu sekvenču fragmentu iegūšanu un salīdzināšanu, piemēram, vienkāršo atkārtojumu polimorfismu (*simple sequence repeat*, SSR) vai viena nukleotīda polimorfismu (*single-nucleotide polymorphism*, SNP) lokusu analīzi. Pašlaik tiek pilnveidotas genotipēšanas metodes, ļaujot izmantot daudz plašāku sekvenču informāciju, piemēram, genotipēšana sekvenējot

(*genotyping by sequencing*), taču šīm metodēm joprojām nepieciešami lieli finansiālie un cilvēku resursi (Narum *et al.* 2013).

Savvaļas sugu ģenētiskās daudzveidības pētīšanu apgrūtina informācijas trūkums par genoma sekvencēm, tāpēc analīzei retām sugām ir iespējams izmantot molekulāro marķieru sistēmas, kam nav nepieciešamas priekšzināšanas par sekvencēm (Idrees, Irshad 2014). Nespecifisko molekulāro marķieru vidū izšķir sekojošas metodes: nejauši polimorfā DNS amplifikācija (*random amplified polymorphic DNA, RAPD*), kas izmanto genoma sekvenču amplifikāciju ar īsiem, nejauši izvēlētiem astoņus līdz divpadsmit nukleotīdus gariem praimeriem (Williams *et al.* 1990); restrikcijas fragmentu garuma polimorfisms (*restriction fragment length polymorphism, RFLP*), kur izmanto homologu DNS sekvenču variācijas jeb polimorfismu (Botstein *et al.* 1980); amplificēto fragmentu garuma polimorfisms (*Amplified fragment length polymorphism, AFLP*), kur unikālas genoma sekvences tiek salīdzinātas, izmantojot selektīvo amplifikāciju (Vos *et al.* 1995); starpretrotranspozonu amplificētais polimorfisms (*inter-retrotransposon amplified polymorphism, IRAP*), kas balstās uz DNS fragmentu amplifikāciju starp divām retrotranspozonu insercijām; retrotranspozonu mikrosatelītu amplificētais polimorfisms (*retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism, REMAP*), kas balstās uz fragmentu amplifikāciju starp retrotranspozona un mikrosatelīta saitēm (Kalendar *et al.* 1999); starpsekvenču atkārtojumi (*Inter simple sequence repeat, ISSR*), kur kā praimerus izmanto mikrosatelītu sekvences, lai ģenerētu multilokusu marķierus (Zietkiewicz *et al.* 1994); mikrosatelīti jeb vienkāršo sekvenču atkārtojumi (*simple sequence repeats, SSR*), kas sastāv no īsiem, divu līdz sešu nukleotīdu motīviem (Tautz *et al.* 1986); sekvenču specifiskais amplificētais polimorfisms (*sequence-specific amplification polymorphism, SSAP*), kam pamatā ir LTR retrotranspozonu inserciju polimorfisms (Waugh *et al.* 1997); starppraimeru piesaistes rajoni (*inter primer binding site, iPBS*), kur ar amplifikāciju starp retrotranspozonu PBS nosaka polimorfismu (Kalendar *et al.* 2011).

Marķieru sistēmas var būt dominantas vai kodominantas atkarībā no tā, vai ir iespējams izšķirt dažādas alēles. Piemēram, SSR marķieri amplificē dažādus viena lokusa variantus, tāpēc tie ir kodominanti un sniedz informāciju par lokusiem no abām hromosomām diploīdos organismos. Nespecifiskie marķieri parasti izšķir tikai vienu alēles variantu un nav iespējams uzzināt, vai fragments tiek amplificēts no abām hromosomām diploīdā organismā vai tikai no vienas, tāpēc tie ir dominantie marķieri. Dominanto marķieru sistēmas sniedz mazāk informācijas par iedzimtību, taču tas tiek kompensēts ar iespēju analizēt daudz vairāk genoma lokusu (Idrees, Irshad 2014).

SSR marķieru priekšrocība pēc Idrees & Irshad (2014) ir tā, ka nav nepieciešama augsta DNS kvalitāte un daudzums, kā arī ir vienkārša rezultātu interpretācija (Coates, Byrne 2005). Kā trūkumi ir nepieciešamība pēc zināmas amplificējamās sekvences (Weising *et al.*, 2005), turklāt jaunu mikrosatelītu veidošanas process ir dārgs un laikietilpīgs (Coates, Byrne 2005) un nulto alēļu varbūtība var radīt kļūdas, tāpēc jālieto daudz dažādu SSR praimeru (Weising *et al.* 2005). Nespecifisko marķieru, piemēram, AFLP, priekšrocība ir iespēja no DNS ātri ģenerēt simtiem replicējamu marķieru un veikt augstas izšķirtspējas genotipēšanu. Tomēr AFLP ir dominanti bi-alēliski marķieri, tāpēc nav spējīgs izšķirt dominantus homozigotus no dominantiem heterozigotiem (Brumlop, Finckh 2011).

### *1.3.2. Mobilo elementu izmantošana reto sugu genotipēšanā*

Vairāku minēto nespecifisko genotipēšanas metožu pamatā tiek izmantoti LTR retrotranspozonu motīvi, kas ir līdzīgi jeb konservatīvi daudzu sugu un retrotranspozonu ģimeņu vidū un tādēļ tiek izmantoti nespecifisko molekulāro marķieru veidošanā. LTR retrotranspozoni ir sastopami visos augos lielā skaitā, attiecīgi tā ir nozīmīga augu genomu sastāvdaļa.

Retrotranspozoni ir mobilie ģenētiskie elementi, kas transportējas ar RNS reversās transkripcijas palīdzību (Kumar, Bennetzen 1999). Reversā transkriptāze nolasot matricu biežāk ievieš kļūdas sekvencēs (Gozukirmizi *et al.* 2015), kas var palīdzēt noskaidrot elementu pārvietošanās vēsturi. Daudzas LTR retrotranspozonu kopijas uzkrāj mutācijas un ar laiku zaudē spēju pārvietoties, dažādu elementu kombinācijas veido unikālu genoma rakstu, kas ir raksturīgs katram genotipam jeb indivīdam. LTR retrotranspozoni ir plaši izplatīti augu genomos replikatīvās pavairošanas mehānisma rezultātā, to sekvences visbiežāk ir sastopamas daudzās kopijās, kuras ir vienmērīgi izklidētas visās hromosomās. Strukturālās izmaiņas, kas ir saistītas ar mobilo elementu pārkārtojumiem, ir saistītas ar salīdzinoši lielām insercijām vai delēcijām genomā. Līdzīgas sekvences genomā spēj arī rekombinēties un retrotranspozoni tiek plaši iesaistīti šajā procesā (Tenailon *et al.* 2010), tādēļ identificējamie pārkārtojumi var atspoguļot ne tikai mobilo elementu transpozīciju, bet arī rekombinācijas procesa rezultātu. LTR retrotranspozoni satur tiešos atkārtojumus abos galos, kas ir identiski tieši pēc pārvietošanas. LTR retrotranspozoni spēj ievietoties dažādās orientācijās, kā arī bieži pārvietojas viens otrā, kas veicina klāsteru veidošanos augu genomos. Tādēļ uz retrotranspozoniem balstīto molekulāro marķieru pielietojums rezultējas lielā informācijas apjomā – iegūtā ģenētiskā daudzveidība ar šiem marķieriem parasti ir salīdzinoši augstāka un spēj nodalīt ne tikai populācijas un indivīdus, bet arī somaklonāli iegūtas augu līnijas

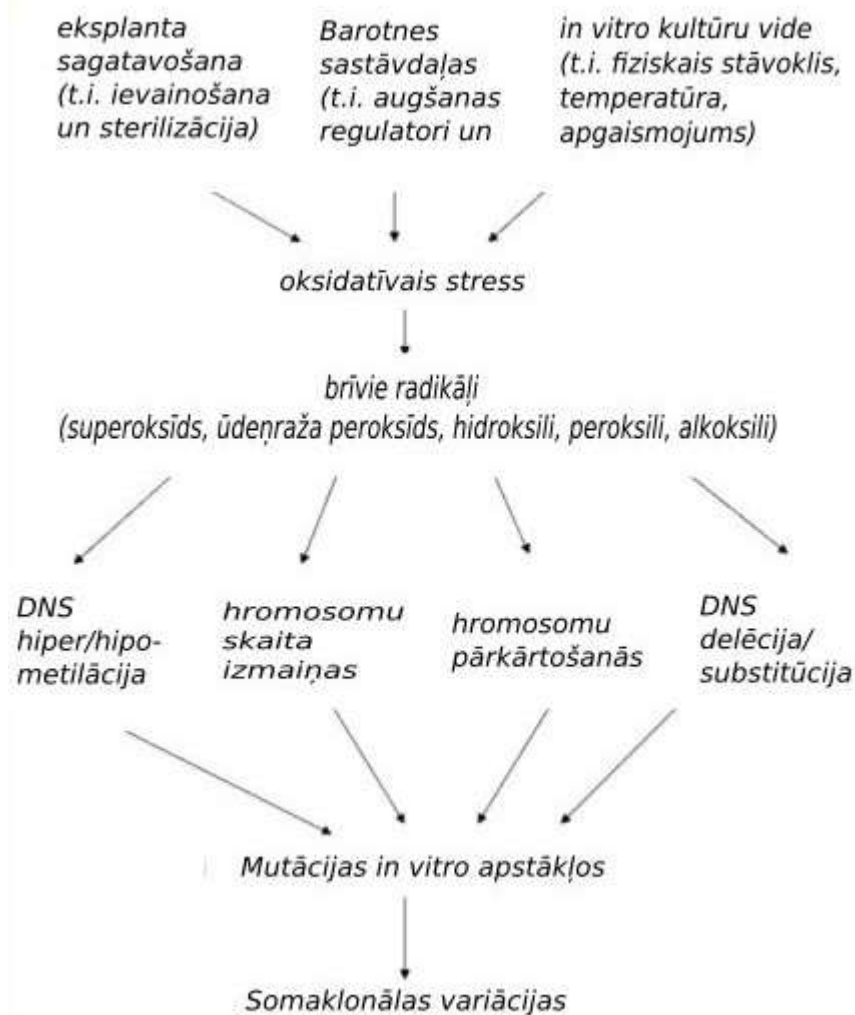
un šķirnes (Kaeppler *et al.* 2000; Kalendar *et al.* 2011; Gozukirmizi *et al.* 2015; Rungis *et al.* 2017). Tādēļ šī metode varētu būtu noderīga *E. maritimum* gadījumā gan veģetatīvi pavairoto indivīdu monitoringam, gan ģenētiskās stabilitātes novērtējumam augiem, kas ilgstoši tiek uzglabāti un pavairoti *in vitro* apstākļos.

*E. maritimum* genoms līdz šim nav sekvenēts, bet pēc Kikowska *et al.* (2014) aptuvenais genoma izmērs ir 2,5 pg/2C un uzskata, ka suga ir tetraploīds (Curle *et al.* 2004). Bez sekvenču priekšzināšanām genotipēšanai piemērotas ir nespecifisku marķieru sistēmas. *E. maritimum* Ziemeļeiropas populāciju pētījumos ir pielietota SSAP metode (Ievina *et al.* 2010). Rezultātā secināja, ka šajās populācijās ir relatīvi zems polimorfisms, ko skaidroja ar nelielu Ziemeļeiropas populāciju ģenētisko daudzveidību un zemu izvēlēto retrotranspozonu aktivitāti sugas genomā.

### 1.3.3. Transpozonu aktivitāte audu kultūrās saglabājamo augu genomā

Augu *in vitro* pavairošanā un saglabāšanā ir svarīgs pavairojamo augu ģenētiskais viendabīgums, tomēr *in vitro* apstākļi var izraisīt hromosomu skaita izmaiņas, inversijas, translokācijas, insercijas, delēcijas un substitūcijas (3. attēls) (Krishna *et al.* 2016).

Jau 1984. gadā Barbara McClintock aprakstīja, ka dažādi stresa veidi, kā arī *in vitro* apstākļi veicina genoma modifikācijas, pētot *Ac* elementa mobilizāciju kukurūzas audu kultūrā (McClintock 1984; Peschke *et al.* 1987). Pirmās liecības par potenciālu LTR retrotranspozonu aktivāciju stresa ietekmē ir *Bs1* elementa transpozīcija ar miežu svītru mozaīkas vīrusu inficētas kukurūzas pēcnācējos (Johns *et al.* 1985). Tabakas protoplastu šūnu kultūrā ir novērota *Tnt1* transpozīcija (Grandbastien *et al.* 1989; Hirochika 1993). Atšķirībā no citām sugām pētījumos ar *Arabidopsis thaliana* audu kultūrām nav novērota transponējamo elementu (TE) aktivitāte (Jiang *et al.* 2011). Par iemeslu tam ir citāda genoma arhitektūra un vismazākais genoms augu vidū. Ir izpētīts, ka no *in vitro* kallusa kultūras iegūtiem rīsiem ir vismaz 13 aktīvas TE saimes, kas izraisījušas 34 jaunas insercijas (Sabot *et al.* 2011). Šajā pētījumā visaktīvākie no TE ir identificētie LTR retrotranspozoni – astoņas ģimenes, kas izraisīja 22 mutācijas. *In vitro* apstākļos galvenokārt uzmanība tiek veltīta retrotranspozīcijas pakāpei kultūrās, kur ir notikusi šūnu diferenciācija. Tomēr ir pierādīts, ka augiem retrotranspozīcija audu kultūrā var notikt arī nenotiekot šūnu diferenciācijas procesam (Yamashita, Tahara 2006).



3. attēls. Oksidatīvā stresa izraisītu somaklonālo variāciju mehānisms audu kultūrā.  
Figure 3. Mechanism of somaclonal variation in micropropagated plants as a result of oxidative burst upon *in vitro* culture. (Krishna *et al.* 2016)

TE ekspresija un transpozīcija ir saistīta ar genoma epiģenētiskajiem kontroles mehānismiem, kas ir nepieciešami normālai genoma darbībai (Le *et al.* 2015). TE transkripcionālā aktivēšanās un transpozīcija notiek dažādu stresa faktoru ietekmē, kamēr normālos apstākļos TE ir neaktīvi (Wessler 1996). TE parasti ir klusināti ar metilācijas mehānismu palīdzību, visbiežāk neaktīvo TE klāsteri atrodas starpgēnu rajonos un ir saistīti ar heterohromatīna veidošanos (Le *et al.* 2015).

Gēni, kas atrodas TE tuvumā var tikt metilēti kopā ar TE noteiktajos apstākļos, tādā veidā ietekmējot gēnu darbību (Tenaillon *et al.* 2010). Pašlaik plaši tiek pētīta nekodējošo RNS molekulu ietekme gēnu regulācijā, daudzi nekodējošie RNS tiek veidoti pateicoties vairs neaktīvo TE motīviem, kuri saglabā spēju iniciēt ekspresiju. Gēnu darbība var tikt dažādos veidos ietekmēta ar

TE pārvietošanos: gēnu sekvenču bojāšana TE ietekmē izslēdz gēna produkta veidošanos vai veidojas defektīvs proteīns; TE ieslēgšana gēna intronā spēj mainīt gēna splaisingu vai noteiktajos apstākļos veicināt alternatīvo produktu veidošanos; transpozīcija var izjaukt dažādus gēna darbību regulatīvos motīvus vai arī pievienot regulatīvus motīvus; TE transpozīcija pretējā orientācijā gēna 3' rajonā spēj iniciēt apvērsto gēna transkriptu veidošanos, šie transkripti spēj saistīties ar parasto transkriptu laicīgi inaktivējot to; TE sastāvā esošo vienādo regulatīvo motīvu izplatība gēnu rajonos spēj apvienot gēnus regulatīvos tīklos (Wessler 1998; Feschotte 2008), turklāt savvaļas augiem ar izteiktu pielāgošanos vides apstākļiem, šie tīkli var būt savstarpēji regulēti ar nekodējošo RNS starpniecību un atkarīgi no TE lokalizācijas gēnu UTR vai intronos (Voronova *et al.* 2020). TE tiek arī atrasti svarīgo konstitutīvo gēnu sastāvā, kas norāda uz dalību jauno gēnu veidošanā un tātad evolūcijas procesos (Feschotte *et al.* 2002; Gao *et al.* 2015; Lee *et al.* 2019).

Audu kultūras apstākļi rada augam oksidatīvo stresu (Krishna *et al.* 2016). Tā ietekmē var aktivizēties TE (Wessler 1996), kā arī paaugstināties rekombinācijas frekvence (Wang, Wang 2012). Šīs strukturālās izmaiņas ir iespējams pārbaudīt izmantojot iPBS marķierus, kas amplificē rajonus starp tuvu esošām LTR sekvencēm (Kalendar *et al.* 2010). Ja augi ir pavairoti veģetatīvi, tad to genotipam *in vitro* un dabiskajos apstākļos jābūt vienādam. Ja ir notikušas genoma izmaiņas, tad tās atspoguļosies kā atšķirīgs iPBS fragmentu amplifikācijas profils, norādot uz genoma iespējamo nestabilitāti. iPBS marķieri ir sekmīgi izmantoti arī retās un aizsargājamās Igaunijas rūgtlapes (*Saussurea esthonica*) dabisko populāciju ģenētiskās daudzveidības noteikšanā (Gailīte 2012).

## 2. MATERIĀLI UN METODEDES

### 2.1. Pētījuma objekts

Par pētījuma objektu izvēlējās *E. maritimum*, jo tā ir Latvijā reti sastopama kāpu biotopa suga, kuras izplatīšanās un pastāvēšanas iespējas ir apdraudētas. Lai eksperimentāli pārbaudītu sugas spēju vairoties veģetatīvi ar pazemes daļām, veica no dabiskās atradnes iegūtu mikrospraudeņu dezinficēšanu ar HgCl<sub>2</sub> un NaClO šķīdumiem un ievadīšanu *in vitro*. Veica arī iegūto *E. maritimum* sakņu šķērsriezumu anatomisko izpēti, lai pārliecinātos par veģetatīvās vairošanās struktūru klātbūtni. Lai iegūtu sugas pavairošanai piemērotāko audu kultūru barotnes sastāvu, veica eksperimentu ar *in vitro* ilgstoši uzglabātu *E. maritimum* augu materiāla pavairošanu, izmantojot barotnes ar dažādām augšanas regulatoru, slāpekļa un saharozes koncentrācijām. Eksperimentā izmantotie augi iegūti no NBD kolekcijas [audu kultūru kolekcijas numuri – 91<sub>1</sub>, 91<sub>3</sub>, 91<sub>5</sub>, EM<sub>11</sub>, EM<sub>4</sub>] un to, kā arī sakņu mikrospraudeņu ievadīšanu veica Nacionālā botāniskā dārza Augu ekofizioloģijas laboratorijā. Pirms eksperimenta uzsākšanas augus pavairoja audu kultūrā, atdalot sāndzinumus un pārstādot tos mēģenēs ar agarizētu 1/2 *Murashige & Skoog* bezhormonu barotni (1. pielikums). Pārstādīšanu veica divas reizes, lai novērstu iespējamību, ka iepriekšējo barotņu sastāvs ietekmē eksperimenta rezultātus. Eksperimentā izmantoja atlasītu vienveidīgu dzinumu materiālu. Lai pārliecinātos par *in vitro* ilgstoši uzglabātā materiāla ģenētisko stabilitāti, no izmantotajiem NBD kolekcijas merikloniem, kā arī dabiskajā atradnē ievāktiem paraugiem izdalīja DNS. Izmantojot iPBS praimerus veica iegūtā DNS materiāla ģenētisko analīzi. Darba ģenētikas daļas izstrādi veica Latvijas Valsts mežzinātnes institūtā “Silava” (LVMI) Ģenētisko resursu centrā.

### 2.2. Anatomisko griezumu pagatavošana un izpēte

*E. maritimum* dabiskajā atradnē Užavā 2020. gada rudenī ievāca tās sakņu materiālu, kas pēc vētras bija atrauts no augiem un izkļiedēts liedagā. To ievāca ar mērķi eksperimentāli pārbaudīt, vai *E. maritimum* saknēm piemīt spēja veidot jaunus dzinumus. Mērķis bija ievadīt sakņu fragmentus audu kultūrā, bet pirms tam iegūtajam materiālam veica anatomisko griezumu pagatavošanu un izpēti, lai pārliecinātos, vai tas satur struktūras, kas piemērotas jaunu dzinumu veidošanai.

Sakņu anatomijas izpētei izmantoja ar rokas mikrotomu un bārdas nazi pagatavotus pagaidu preparātus. Atlasītos labākos griezumus novietoja uz priekšmetstikliņa un krāsoja ar astra zilā un safranīna maisījumu. Nepārkoksnētie šūnapvalki iekrāsojas koši zili, bet pārkoksnētie – violeti

(Braune *et al.* 1999; Megre *et al.* 2004). Krāsu skaloja ar ūdeni un etanolu. Kad krāsa bija noskalota, uzpilināja pilienu ūdens un pārklāja ar segstikliņu.

Preperātus aplūkoja un ieguva attēlus ar gaismas mikroskopu Leica DM5500B un digitālo kameru Leica DFC490. Iegūtos attēlus apstrādāja ar Inkscape vektoru grafikas apstrādes programmu (Inkscape Project, 2020. *Inkscape*, Available at: <https://inkscape.org>).

### 2.3. Sakņu mikrospraudeņu ievadīšana *in vitro*

*E. maritimum* sakņu ievadīšanas eksperimentu audu kultūrā veica ar primāro mērķi eksperimentāli kontrolētos laboratorijas apstākļos pārbaudīt, minētās sugas sakņu spēju veidot jaunus veģetatīvos dzinumus, respektīvi, spēju veģetatīvi vairoties ar saknēm. Kā arī, ar sekundāro mērķi iegūt kolekcijā pēc iespējas ģenētiski tuvāku materiālu dabiski Latvijā sastopamajiem indivīdiem. Ievadīšanas eksperimentus veica divas reizes – septembrī, uzreiz pēc ievākšanas, un janvārī, pēc aukstuma perioda.

1. tabula. Sakņu materiāla sagatavošana *in vitro* pavairošanai.

Table 1. Preparation of root material for *in vitro* propagation.

Sagatavošana dezinfekcijai un ievadīšanai	
1.	Saknes sagrieza aptuveni 2 cm garos posmos.
2.	Trīs reizes mazgāja ziepjūdenī (kopā ~ 30 min).
3.	Noskaloja ar destilētu ūdeni.
4.	Vairākkārt apstrādāja ar vieglu kālija permanganāta šķīdumu, līdz šķīdums vairs neatkrāsojās.
5.	Noskaloja ar destilētu ūdeni.
Dezinfekcija un ievadīšana <i>in vitro</i> (darbu veica ar UV gaismu 30 min izstarotā laminārās gaisa plūsmas boksā):	
1.	Sakņu fragmentus sterilizēja ar ACE balinātāja šķīdumiem attiecībās 1:1 un 1:2, kā arī 0,1% HgCl <sub>2</sub> šķīdumā 5 min.
2.	Pēc sterilizācijas fragmentus skaloja trīs reizes ar sterilu ūdeni, secīgi – 5; 10 un 15 min.
3.	Fragmentus ar skalpeli sagrieza aptuveni 5 mm garos posmos un ievietoja mēģenēs, kas saturēja sterilu MS 1/2 barotni (1. pielikums).

Mēģenes novietoja audzēšanas telpā ar mākslīgo apgaismojumu (16 h gaismas periods, 40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fotosintētiski aktīvās radiācijas fotonu plūsmas blīvums) istabas temperatūrā ( $\sim 22^\circ \text{C}$ ). Vairāku mēnešu garumā regulāri apsekoja augu, lai konstatētu, vai ir notikušas ārēji redzamas fizioloģiskas izmaiņas vai paradījušas infekcijas. Katrā mēģinājumā ieguva vismaz 20 mēģenes, katru ar vienu saknes fragmentu.

#### 2.4. *E. maritimum* pavairošana *in vitro*

Lai pārbaudītu un gūtu priekšstatu par piemērotāko sugas pavairošanas audu kultūru barotnes sastāvu, veica eksperimentu, kurā novēroja *E. maritimum* eksplantu fizioloģisko reakciju pret dažādām saharozes, slāpekļa (N) un augšanas regulatoru koncentrācijām *in vitro* apstākļos. Veica divus audu kultūru eksperimentus. Izmantotais augu materiāls sākotnēji tika iegūts no sēklām, kas ievāktas Užavas atradnē un ievadītas audu kultūrā. *In vitro* apstākļos materiāls tika uzturēts vairāk nekā desmit gadus, izmantojot minimālas iejaukšanās stratēģiju.

Pirmajā eksperimentā izmantoja MS barotnes ar trīs dažādām N avota koncentrācijām. Katram variantam pievienoja vienu augšanas regulatoru (*meta*-topolīnu [top], BAP [ba], zeatīnu [zeat], iP, kinetīnu [kin]) koncentrācijā 0,25 vai 0,5  $\text{mg L}^{-1}$  (2. tabula). Attiecīgi ieguva 30 eksperimenta barotņu variantus. Kopā izmantoja 322 mēģenes ar augiem. Otru eksperimentu veica ar mērķi noteikt labāko eksplantu apsākšanas barotni, kur tika izmantotas MS barotnes ar trīs jau iepriekš izmantotajām N un C avotu koncentrācijām un divām BAP koncentrācijām – 0,25 un 0,5  $\text{mg L}^{-1}$ . Kopā izmantoja 97 mēģenes ar augiem. Par eksplantiem abos eksperimentos izvēlējās vizuāli vienveidīgu augu materiālu – lapu rozeti ar vismaz divām lapām, bez manāmiem sāndzinumiem. Barotnēm izmantoja 15 cm augstas stikla mēģenes ar 2 cm diametru un folijas vākiem. Pirms izmatošanas, lai mēģenes ar barotnēm būtu sterilas, tās autoklavēja 1,5 atm  $100^\circ \text{C}$ . Augus mēnesi kultivēja audzēšanas telpā ar mākslīgo apgaismojumu (16 h gaismas periods, 40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fotosintētiski aktīvās radiācijas fotonu plūsmas blīvums) istabas temperatūrā ( $\sim 20^\circ \text{C}$ ).

2. tabula. Eksperimenta barotnēs izmantotās slāpekļa un oglekļa avota koncentrācijas.+

Table 2. Used concentrations of nitrogen and carbon source for nutrient media.

Apzīmējums	N avots ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Saharoze ( $\text{mg L}^{-1}$ )
MS	$\text{NH}_4\text{NO}_3 - 1650$ ; $\text{KNO}_3 - 1900$	30
1/2AMS	$\text{NH}_4\text{NO}_3 - 825$ ; $\text{KNO}_3 - 1900$	20

1/2ABMS	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> – 825; KNO <sub>3</sub> – 800	20
---------	---	----

Augu attīstības morfoloģiskos parametrus noteica, mēnesi pēc eksperimenta uzsākšanas. Tie bija kallusa attīstība vērtēta pakāpēs [1-3,5] (9. attēls), sāndzinumu skaits, sakņu skaits un sakņu garums (pakāpēs [1–3], kur 1 – ļoti īsas saknes, 2 – aizņem pusi barotnes augstuma, 3 – tiecas līdz mēģenes dibenam) (9. attēls). Datus apstrādāja, izmantojot RStudio vidi (*RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>*).

## 2.5. DNS izdalīšana

Lai pārbaudītu *in vitro* ilgstoši uzglabātu augu ģenētisko stabilitāti, no tiem vispirms nepieciešams izdalīt DNS. Augu materiālu ieguva no NBD *in vitro* audzētu *E. maritimum* eksplantu lapām (58 paraugi, to skaitā sešiem veica bioloģiskos atkārtojumus) (4. tabula). Kontrolei izmantoja dabiskajā atradnē Užavā augošu augu lapas (13 paraugi), kas tika ievāktas 2021.gada jūnijā. Materiālu ievāca 2 mL vienreizējās lietošanas stobriņos un līdz DNS izdalīšanai uzglabāja –80 °C.

DNS no augu lapām izdalīja pēc CTAB metodes (Padutov *et al.* 2007) ar nelielām modifikācijām (3. tabula), kopā izdalot DNS no 58 *in vitro* paraugiem un 13 Užavā ievāktiem paraugiem. Iegūtajiem paraugiem ar NanoDrop8000 spektrofotometru noteica koncentrācijas un tīrības pakāpi. Ja 260/280 nm absorbciju attiecība bija zemāka par 1,80, tad paraugus attīrīja ar polivinilpolipirolidonu (PVPP). No iegūtajiem paraugiem izmantojot noteiktās koncentrācijas, ar TE buferi atšķaidīja darba šķīdumu, kur DNS koncentrācija bija 50 ng μL<sup>-1</sup>.

3. tabula. DNS izdalīšanas protokols pēc CTAB metodes.

Table 3. CTAB protocol of DNA extraction.

1.	2 mL stobriņos ar augu materiālu ievietoja nerūsējošā tērauda bumbiņu, pievienoja 150 μL ekstrakcijas bufera un ievietoja kratīties homogenizatorā ( ~1 min 29 Hz; Retsch).
2.	Pēc kratīšanas īsi centrifugēja un pievienoja līdz 850 μL ekstrakcijas bufera (2. pielikums).
3.	Stobriņus ar paraugiem inkubēja ūdens termostatā 65 °C 30 min.
4.	Pēc inkubācijas pievienoja 900 μL hloroforma un samaisīja.
5.	Paraugus centrifugēja 20 min pie 12000 rpm, supernatantu pārnesa jaunā 2 mL stobriņā
6.	Paraugiem pievienoja līdz 65 °C uzsildītu 5x CTAB buferi (2. pielikums) 1/5 no supernatanta tilpuma un samaisīja, vairākkārt apgriežot otrādi, tad inkubēja ūdens termostatā 10–15 min.

7.	Pēc tam pievienoja hloroformu attiecībā 1:1 un kratīja 3–5 min, tad centrifugēja pie maksimālajiem apgriezieniem 20 min.
8.	Pēc centrifugācijas supernatantu pārnesa 1,5 mL stobriņā, tam pievienoja izopropanolu 70% no tilpuma un invertēja.
9.	Paraugus inkubēja 20-30 min istabas temperatūrā vai 4 °C, pēc tam centrifugēja pie maksimālajiem apgriezieniem 20 min.
10.	No stobriņa izlēja šķidrumu, tajā palika DNS nogulsnes, kuras mazgāja ar 1 mL –20 °C 70% etanolu.
11.	Storbiņus centrifugēja pie maksimālajiem apgriezieniem 3–5 min, nolēja visu šķidrumu, atkārtoja mazgāšanu ar 70% etanolu, tad izžāvēja.
12.	Kad spirts izgaroja, pievienoja 100 µL TE bufera (3. pielikums), ievietoja 4 °C uz 24 h, lai DNS izšķīstu.

4. tabula. Iegūto DNS paraugu skaits un izcelsme.

Table 4. Number and origin of DNA samples obtained.

Kolekcijas meriklona nr.	Paraugu skaits	Izcelsme
91 <sub>5</sub>	16	Latvija (Užava)
91 <sub>1</sub>	18	Latvija (Užava)
91 <sub>3</sub>	19	Latvija (Užava)
EM11	4	Itālija
EM4	1	Vācija
Užava (dabiskā atradne)	13	Latvija (Užava)

Ar NanoDrop8000 (*ThermoFisher scientific*) spektrofotometru noteica iegūto paraugu DNS koncentrācijas un tīrības pakāpes pēc 260/230 nm absorbciju attiecības. Par tīru DNS liecina absorbciju attiecību vērtība pie 260/230 nm vismaz 1,80 (Sambrook *et al.* 1989; Thakuria *et al.* 2008). Paraugus, kam 260/230 nm attiecība bija zemāka par 1,60, attīrīja ar PVPP (5. tabula).

5. tabula. DNS attīrīšana ar PVPP (modificēts no Picard *et al.* 1992; Tessonnière *et al.* 2009; Rubio-Piña, Zapata-Pérez 2011).

Table 5. Purification of DNA with PVPP.

1.	DNS tilpumu palielināja līdz 400 µL ar TE buferi.
2.	Pievienoja nešķīstošo PVPP (polyvinyl polypyrrolidone, crospovidone; E1202; 1-ethenylpyrrolidin-2-one), apmaisīja un inkubēja 65 °C 20 min.
3.	Centrifugēja ar maksimālajiem apgriezieniem 10 min un pārnes šķīdumu jaunā stobriņā.
4.	Pievienoja attiecībā 1:1 hloroforma/izoamilspirta (24:1) maisījumu, sakratīja 30 s, centrifugēja ar maksimālajiem apgriezieniem 20 min.
5.	Pievienoja 0,1 tilpumu nātrija acetāta (3M) un uzmanīgi apmaisīja.
6.	Pievienoja divus tilpumus ledusauksta 96% etanola.
7.	Inkubēja –20 °C vismaz 2 h.
8.	Attīrīja nogulsnes ar 800 µL auksta 70% etanola, centrifugēja 10 min dzesējošajā centrifūgā, lai nezaudētu nogulsnes. Nolēja atlikušo etanolu.
9.	Žāvēja 5 min sterilos apstākļos.
10.	Šķīdināja nogulsnes 50 µL TE bufera (3. pielikums).

Pēc attīrīšanas atkārtoti veica mērījumus ar spektrofotometru NanoDrop 8000. Iegūtos koncentrāciju rezultātus izmantoja paraugu atšķaidīšanai līdz 50 ng µL<sup>-1</sup>. Četrus paraugus, kuros DNS koncentrācija nebija pietiekama atbilstošās darba šķīdumu koncentrācijas iegūšanai, neizmantoja.

## 2.6. iPBS praimeru atlase un amplifikācija

Darbā izmantoja praimerus, kas minēti Kalendar *et al.* (2010) protokolā. Sākotnēji, izmantoja astoņus DNS paraugus, veica polimerāzes ķēdes reakciju (*polymerase chain reaction*, PCR) testu ar visiem pieejamajiem darbā minētajiem praimeriem (kopā 17) (8. tabula). Sākotnēji reakcijas produktu amplifikāciju pārbaudīja ar agarozes gēla elektroforēzi (90 min, 90 V), izmantojot 1,7 % agarozes gēlu iekrāsotu ar etīdija bromīdu TAE buferī (4. pielikums). Noskaidroja, ar kuriem praimeriem notika veiksmīga amplifikācija *E. maritimum* paraugos (kurš praimeris amplificē spilgtas un skaidri atšķiramas vairākas joslas) (5. pielikums). Analizēt paraugus bija paredzēts ar kapilārās elektroforēzes iekārtu *Labchip GX-touch* (PerkinElmer), tāpēc veiksmīgi izdevušos amplifikācijas produktus analizēja arī ar šo metodi. Balstoties uz *Labchip* kapilārās elektroforēzes datiem, izvēlējās astoņus iPBS praimerus (6. tabula). Polimorfās informācijas saturs

(*Polymorphism Information Content*, PIC) vērtības praimeriem aprēķinātas ar formulu  $PIC = 1 - (p^2 + q^2)$  pēc Singh, Singh 2015. Pēc PIC vērtības var pateikt, cik piemērots praimeris ir ģenētiskās daudzveidības noteikšanai – jo augstāka vērtība, jo piemērotāks praimeris.

6. tabula. Atlasītie iPBS praimeris un to PIC vērtības.

Table 6. Selected iPBS primers and their PIC values.

Praimeris	Sekvence 3`-5`	PIC vērtība
2081	GCAACGGCGCCA	0,12
2095	GCTCGGATACCA	0,12
2220	ACCTGGCTCATGATGCCA	0,11
2374	CCCAGCAAACCA	0,06
2378	GGTCCTCATCCA	0,16
2380	CAACCTGATCCA	0,06
2384	GTAATGGGTCCA	0,21
2385	CCATTGGGTCCA	0,01

7 tabula. Nepieciešamie PCR reaģenti (\*pievieno pēdējos)

Table 7. Reagents required for PCR preparation (\*added last)

Reaģents	Tilpums 1x paraugam (μL)
ddH <sub>2</sub> O	15,48
Dream Taq 10xBuferis	2,5
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	0,5
DMSO	1,5
dNTPs (0,2 mM)	0,3
Praimeris (10 μM)	2,5
<i>Dream taq</i> polimerāze*	0,2
<i>Pfu</i> polimerāze*	0,02
DNS (50ng/μL)	2

*Dream Taq* polimerāzes (*TFS*) un *Pfu* polimerāzes (*TFS*) PCR reaģentus (7. tabula) sagatavoja ar UV apstarotā laminārās gaisa plūsmas boksā ar atdzesētiem paliktņiem un reaģentiem pēc protokolā aprakstīta (Kalendar *et al.* 2010). Ūdeni molekulārām analīzēm (ddH<sub>2</sub>O) pagatavoja, izmantojot filtrētu dejonizētu ūdeni, kas sterilizēts autoklāvā 20 min 120 °C un atdzesēts. Pēc tam

šo ūdeni apstrādāja ar 0.01% DEPC inkubējot 8 h un atkārtoti autoklavēja 20 min 120 °C. Atzdesētu to fasēja 2 mL stobriņos un uzglabāja saldētavā.

8. tabula. iPBS PCR reakcijas apstākļi.

Table 8. iPBS PCR reaction.

Sākotnējā denaturācija		95 °C	3 min
40 cikli	Denaturācija	95 °C	15 s
	Praimeru pielipšana	50 °C	60 s
	Elongācija	68 °C	60 s
Beigu elongācija		72 °C	20 min
Uzglabāšana		4 °C	

## 2.7. iPBS produktu analīze

Iegūtos PCR produktus analizēja ar kapilāro gēla elektroforēzi mikrofluidiskā sistēmā LabChip-GX touch (*PerkinElmer*). Izmantoja čipa reaģentus DNA 5K Reagent Kit (*PerkinElmer*) un DNA 5K/RNA/CZE čips (*PerkinElmer*), kas tika sagatavoti atbilstoši ražotāja instrukcijām (9. tabula). Katra praimera iPBS paraugus atšķaidīja atbilstoši iepriekšēja testa rezultātiem. Mikrofluidiskā sistēma ļauj veikt augstas veiktspējas analīzes izmantojot niecīgus paraugu apjomus, kas būtiski paātrina fragmentu garuma analīzi. Tāpat šī sistēma ļauj izmantot vairākas garuma kontroles precīzai fragmentu garuma noteikšanai – viena kontrole tiek paņemta kopā ar katru paraugu, bet otra – ik pa 12 paraugiem. Visus paraugus analizēja ar vienu čipa sagatavi, lai novērstu iespējamās atšķirības fragmentu migrācijā izmantoto reaģentu dēļ.

9. tabula. LabChip-GX touch čipa sagatavošana un izmantošana.

Table 9. Preparation and use of LabChip-GX touch chip.

Čipa sagatavošana (pirms čipa pildīšanas to un paredzētos reaģentus inkubēja istabas temperatūrā 20–30 min).	
1.	Ar vakuumsūkni nosūca buferi no čipa tvertnēm, skaloja aktīvās čipa tvertnes 2x ar ddH <sub>2</sub> O; ar 70% izopropanolu attīrīja detektēšanas lodziņu no abām pusēm, pildīja čipu ar reaģentiem.
2.	DNS krāsvielu vorteksēja 15 s. Pievienoja 6,5 µL krāsvielas stobriņam ar 500 µL DNS gēla matricu. Vorteksēja 15 s, īsi nocentrifugēja. Pārnesa maisījumu uz komplekta

	centrifugēšanas koloniņu. Centrifugēja 9300 rcf 8 min., atzīmēja sagatavošanas datumu uz sāniem, glabāja tumsā 4 °C līdz 3 nedēļām.
3.	DNS garuma marķieri vorteksēja 10 s, centrifugēja. Eppendorfā pievienoja 12 µL marķiera pie 108 µL 1mM EDTA bufera. Samaisīja vorteksējot, centrifugēja, uzmanīgi pārnesa 120 µl uz 0,2 mL komplekta stobriņā (bez vāciņa), ievietoja tam paredzētajā vietā plates nodalījumā blakus buferim.
4.	Bufera stobriņā iepildīja 750 uL 1 mM EDTA buferi bez burbuļiem, ievietoja to tam paredzētajā vietā aparātā (plates nodalījumā).
Čipa uzpilde.	
1.	Izmantojot reversās pipetēšanas tehniku, pievienoja 75 µL (min.50 µL) gēla-krāsvielas sagataves čipa 3., 7., 8. tvertnē un 120 µL (50 µL) 10. tvertnē
2.	DNS marķiera maisījumu vorteksēja, īsi centrifugēja. 120 µL DNS marķieri pildīja 4. tvertnē. Šo tvertni papildināja ik pēc 240 paraugiem, jo tas izlietojas darbības laikā.
3.	Pārliccinājās, vai tvertne Nr. 1. ir tukša, vai čipa tvertnes malas ir sausas, uz detektēšanas lodziņa nav putekļu/netīrumu.
4.	Uz aparāta ekrāna atzīmēja “Unload Chip”, ielika čipu aparātā tā, lai kapilārs trāpa bufera tvertnē.
5.	Atzīmē “unload plate”, ievietoja sagatavoto 96 paraugu plati. (DNS garuma marķieri un bufera tube jau ielikti). Konfigurēja analīzi un palaida analīzi ar pogu “Run”.

## 2.8. iPBS rezultātu analīze

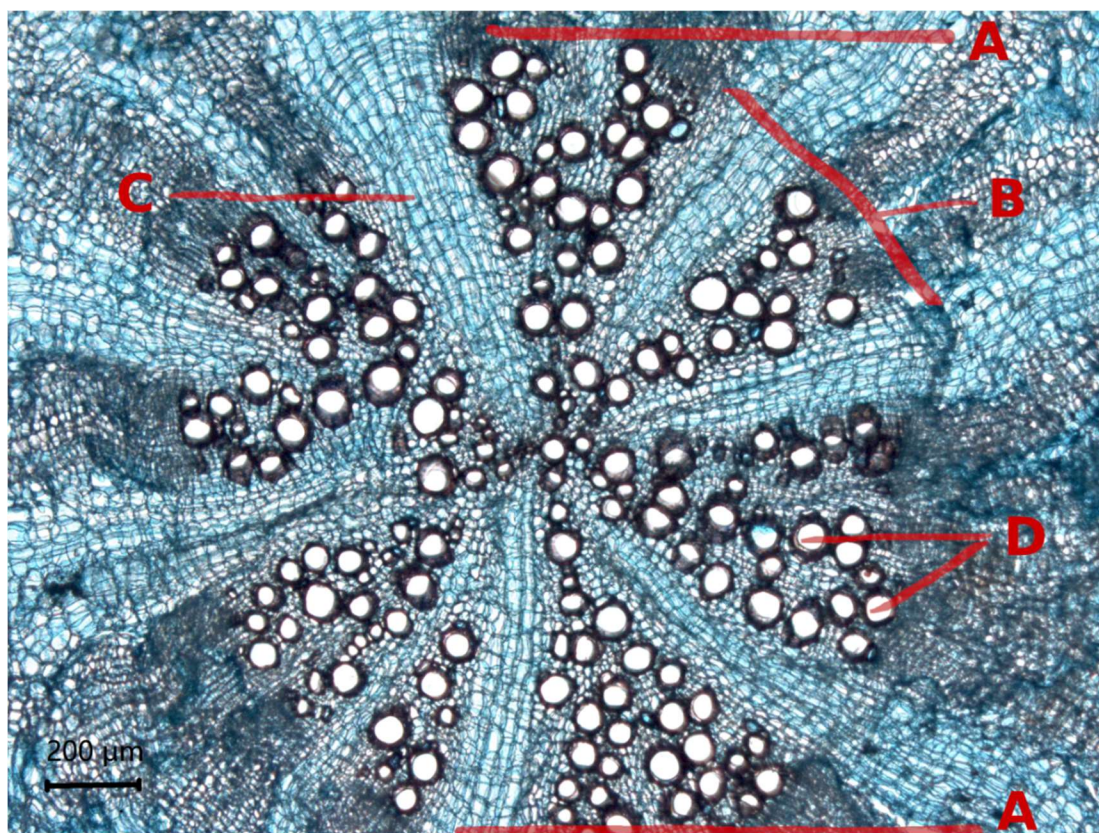
Rezultāti tika analizēti ar LabChip-GX programmatūru v.4.2, kas būtiski atviegloja un ļāva standartizēt fragmentu analīzi. Noteica tikai tos fragmentus, kuru koncentrācija tika noteikta augstāka par 0.2 (ng µL<sup>-1</sup>). Datu kopas tika analizēta izmantojot populāciju ģenētiskas analīzes programmatūras pielikumu Microsoft Excel – GenAlEx programmatūrai (Peakall, Smouse 2012), tika veikta alēļu frekvenču, heterozigositātes, polimorfisma, molekulārās variācijas un genotipu analīze, kā arī aprēķinātas marķieru PIC vērtības.

Visas kopas tika analizētas - GenAlEx 6.5 (Peakall, Smouse 2012).

### 3. REZULTĀTI

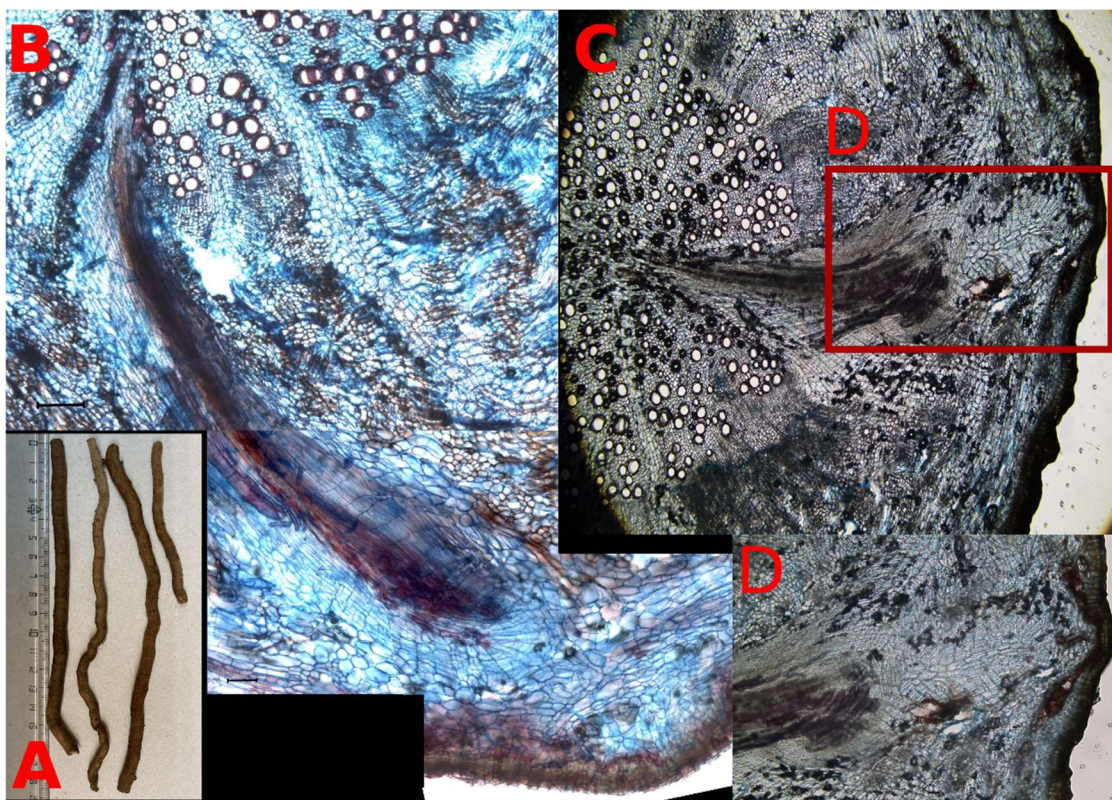
#### 3.1. Anatomisko griezumu izpēte

Lai pārlicinātos, vai ievāktajās *E. maritimum* saknēs ir atrodamas jaunus dzinumus veidojošas struktūras, veica liedagā ievāktā materiāla anatomisko griezumu sērijas. To darīja divas reizes. Pirmo reizi rudenī nesēn ievāktām saknēm (5. attēls B). Šajā laikā arī veica pirmo sakņu ievadīšanas eksperimentu audu kultūrā. Otrā reizi janvārī, pēc aukstuma perioda 4 °C (5. attēls C, D), šajā laikā arī veica sakņu ievadīšanas audu kultūrā eksperimentu. Pēc iegūtajos šķēsgriezumos redzamā centra (4. attēls A) konstatēja, ka izmantotais materiāls anatomiski ir saknes, jo centrā nebija serdes.



4. attēls. *E. maritimum* saknes šķēsgriezumā centra (x5). Centrālais cilindrs (A), pericikls (B), koksnes stars (C), traheja (D).

Figure 4. Cross section of *E. maritimum* root center (x5). Vascular cylinder (A), pericycle (B), xylem ray (C), vessel (D).

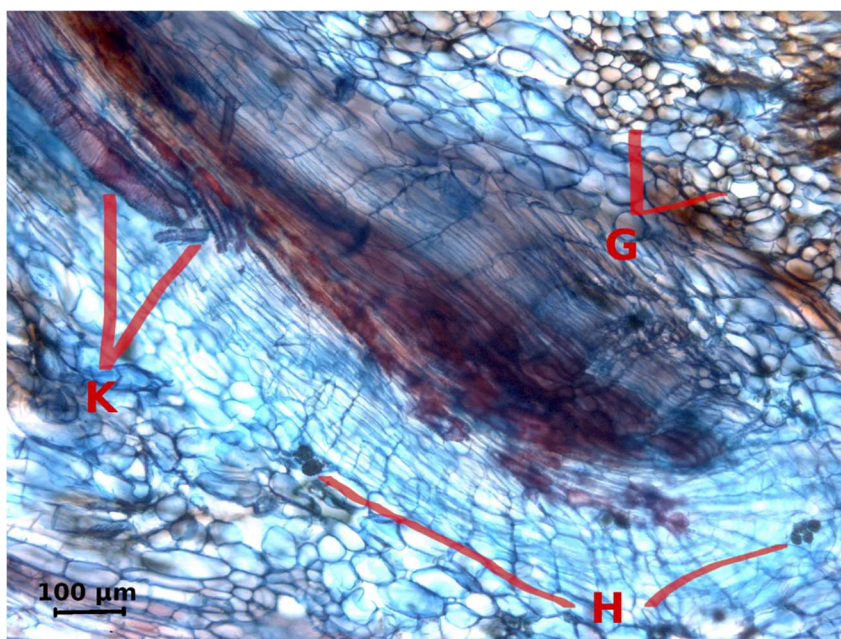


5. attēls. (A) izmantotās *E. maritimum* saknes, (B) svaigas *E. maritimum* saknes šķērs griezumus, (C) *E. maritimum* saknes šķērs griezumus pēc aukstuma perioda, (D) kambija zona. (Mērogs – 10  $\mu$ M).

Figure 5. (A) used roots of *E. maritimum*,; (B) cross section of fresh *E. maritimum* roots before, (C) cross section of *E. maritimum* roots after cold storage, (D) area of cambium. (Scale - 10  $\mu$ M).

Pirmajā griezumū sērijā, ko veica rudenī (5. attēls B), salīdzinot ar otro ziemas griezumū sēriju (5. attēls C, D), bija manāmas atšķirības. Rudens griezumos starp koksnes staru un segaudiem bija parenhīma – noapaļotas daudzstūrainas šūnas. Ziemas griezumos konstatēja izmaiņas – pēc aukstuma perioda starp koksnes staru un segaudiem bija novērojamas kambija šūnas, nevis parenhīma (D).

Secināja, ka no *E. maritimum* saknēm veidojas morfoloģiskas struktūras, kas piemērotas jaunu dzinumū veidošanai – šajā gadījumā no koksnes stariem. Citādi griezumos redzamais neatšķīrās pirms un pēc aukstuma perioda. Nevar izslēgt iespēju, ka kambijs bija izveidojies jau pirms aukstuma perioda. Tomēr šajā gadījumā svarīgi, ka kambija klātbūtne sakņu šķērs griezumos tika konstatēta.



6. attēls. *E. maritimum* koksnes stars (x10). Vadaudu elementi (K), kristālu drūzas (H), sveķu ailes (G).

Figure 6. Xylem ray of *E. maritimum*. (x10) Tracheids (K), druse crystals(H), resin canals (G).

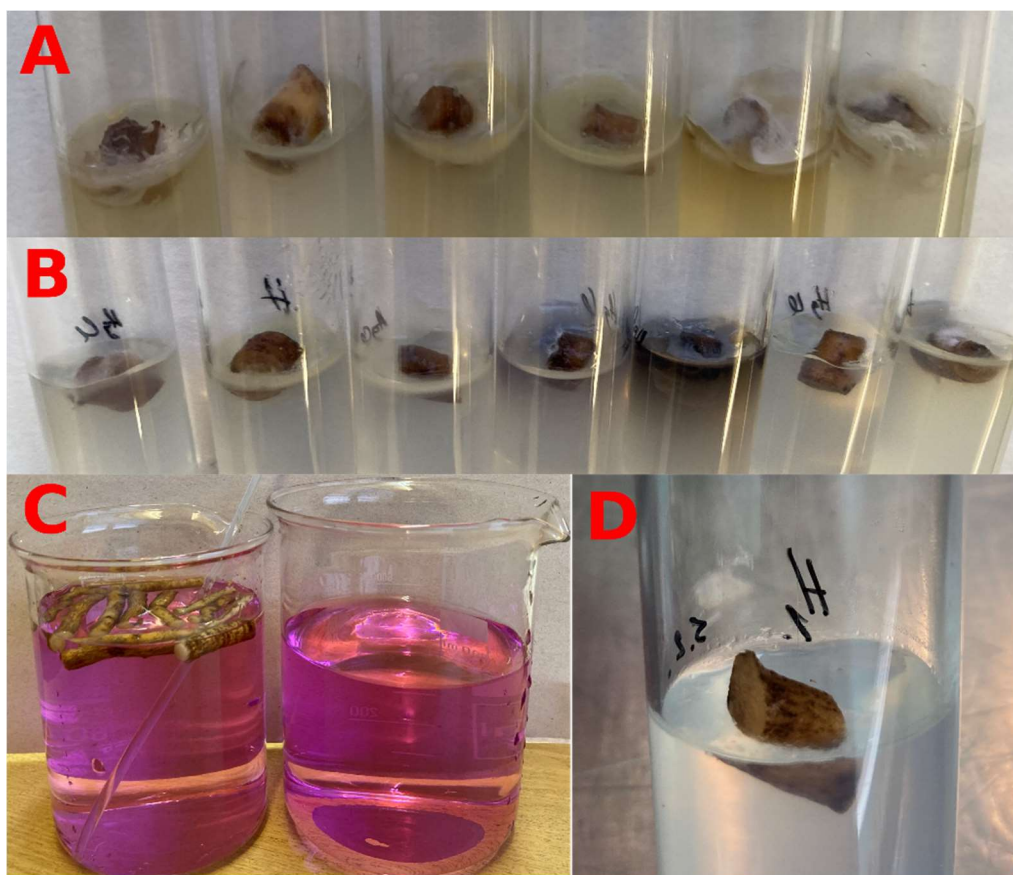


7. attēls. (A) *E. maritimum* saknes, ar sarkanu norādītas potenciālās jauno dzinumu vietas, (B) izrakts *E. maritimum* eksemplārs no NBD āra ekspozīcijas.

Figure 7. (A) roots of *E. maritimum*, red indicates potential sites for young shoots, (B) *E. maritimum* specimen from NBD outdoor exposition.

Pirmajā griezumū sērijā sakņu šķēsgriezumos konstatēja koksnes staru (6. attēls), ar vadaudu elementiem – traheīdām – tā sastāvā (K). To sekundārie šūnapvalki bija uzbiezināti gredzenu vai spirāļu veidā. Ap koksnes staru atradās daudz sveķu aiļu (G) un kristālu drūzu (H). No NBD apstādījumiem izraka *E. maritimum* eksemplāru, kas iegūts *in vitro* pavairošanas rezultātā (7. attēls B). Konstatēja, ka tā pazemes daļas tiecas gan dziļumā, gan uz sāniem. Ar sarkanu atzīmētās daļas uzskatīja par potenciālajām jauno pumpuru vietām (A). Anatomisko griezumū iegūšanā koncentrējās uz šo potenciālo jauno dzinumū zonu izpēti.

### 3.2. Sakņu mikrospraudeņu ievadišana *in vitro*



8. attēls. (A) inficēti sakņu fragmenti pēc apstrādes ar NaClO, (B) inficēti sakņu fragmenti pēc apstrādes ar HgCl<sub>2</sub>, (C) apstrāde ar KMnO<sub>4</sub> šķīdumu, (D) neinficēts saknes fragments pēc apstrādes ar HgCl<sub>2</sub>.

Figure 8. (A) infected root fragments after treatment with NaClO, (B) infected root fragments after treatment with HgCl<sub>2</sub>, (C) treatment with KMnO<sub>4</sub>, (D) uninfected root fragment after treatment with HgCl<sub>2</sub>.

Ar mērķi eksperimentāli kontrolētos apstākļos pārbaudīt *E. maritimum* sakņu spēju veidot jaunus dzinumus, veica sakņu materiāla *in vitro* ievadīšanas eksperimentus. Sakņu dezinfekcijas metodi izvēlējās ņemot vērā līdzšinējo laboratorijas pieredzi ar līdzīga tipa materiālu. Materiāla dezinfekcijai tika izmantoti trīs varianti – apstrāde ar 0,1% HgCl<sub>2</sub> un NaClO, kas atšķaidīts ar sterilu ūdeni attiecībās 1:1 un 1:2.

No šiem dezinfekcijas paņēmieniem neviens nebija pietiekami efektīvs, lai *in vitro* ievadītu atbilstošu daudzumu materiāla eksperimenta turpināšanai. Abos ievadīšanas mēģinājumos katrā ieguva vienu mēģeni bez infekcijas pēc apstrādes ar HgCl<sub>2</sub> (8. attēls, D). Novērotās infekcijas galvenokārt bija sēņu izraisītas (A, B).

Tomēr kopā divus sakņu fragmentus izdevās ievadīt bez infekcijas, izmantojot 0,1% HgCl<sub>2</sub>. Attiecīgi šo dezinfekcijas metodi varētu uzskatīt par piemērotāko *E. maritimum* sakņu ievadīšanai *in vitro*.

### 3.3. Pavairošana *in vitro*

Pēc mēneša audzēšanas eksperimenta barotnēs ar dažādiem augšanas regulatoriem noteica tādus parametrus kā sakņu garums, kallusa veidošanās pakāpe un sāndzinumu skaits. No tiem, kallusa attīstību un sakņu garumu noteica pēc gradācijas (9. attēls).



9. attēls. Sakņu garuma un kallusa attīstības pakāpes vizualizācija. (A) Skaitļi parāda sakņu garuma pakāpes. (B) Skaitļi parāda kallusa attīstības pakāpi.

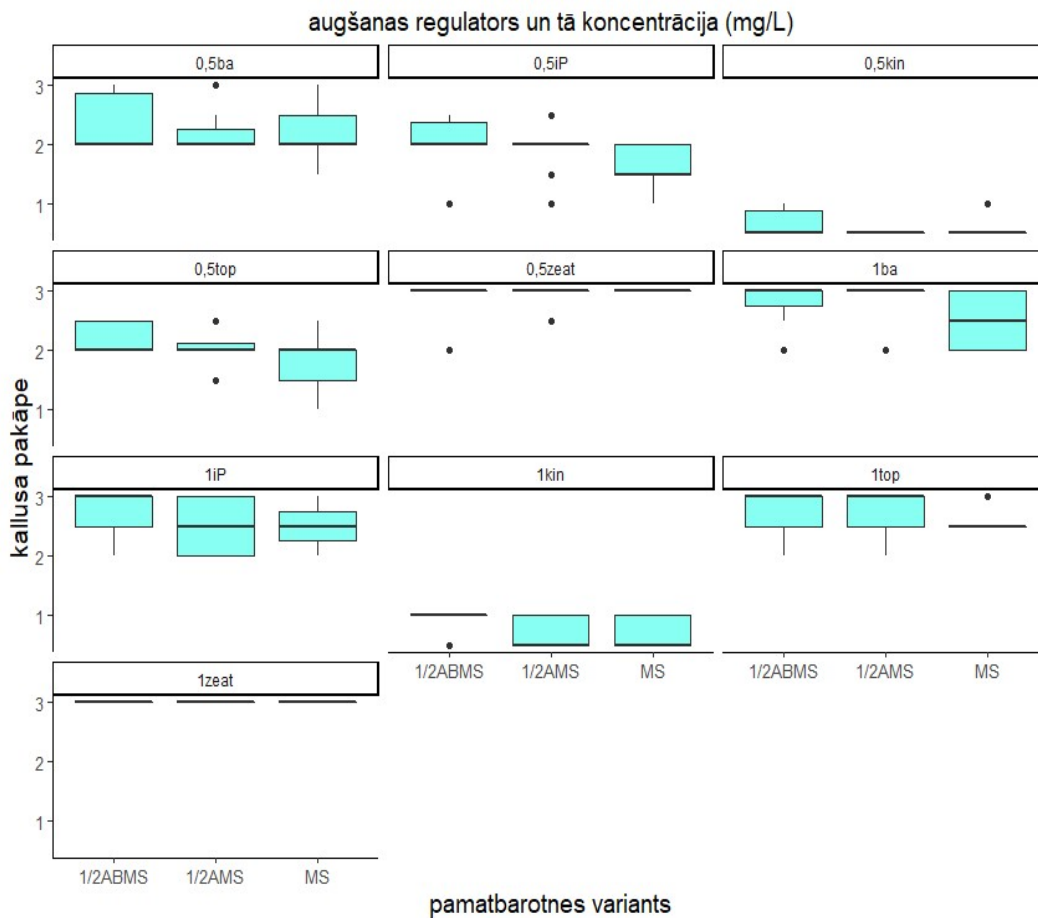
Figure 9. Visualization of root length un callus development degree. (A) The numbers represent degree of root length. (B) The numbers represent degree of callus development.

10. tabula. Pirmā *in vitro* eksperimenta parametru *p* vērtības pēc ANOVA.

Table 10. P values by ANOVA of the parameters of the first *in vitro* experiment.

Parametrs	Sāndzinumu skaits	Kallusa pakāpe	Sakņu garums
<i>p</i> vērtība pēc ANOVA	< 2e-16 ***	< 2e-16***	2.52e-06***

Pirmajā eksperimentā iegūtajām vērtībām veica ANOVA testu, lai uzzinātu, vai *p* vērtības (< 0,05) liecina par nozīmīgām rezultātu atšķirībām (10. tabula). Eksperimenta tiešais mērķis bija noskaidrot dažādu augšanas regulatoru un slāpekļa koncentrāciju ietekmi uz *E. maritimum* pavairošanas iespējām *in vitro*, tāpēc izveidoja *boxplot* grafikus, kuros attēloja kallusa veidošanās pakāpi un sāndzinumu skaitu, jo tie ir nozīmīgākie augu ātras pavairošanas aspekti (10., 11. attēls).

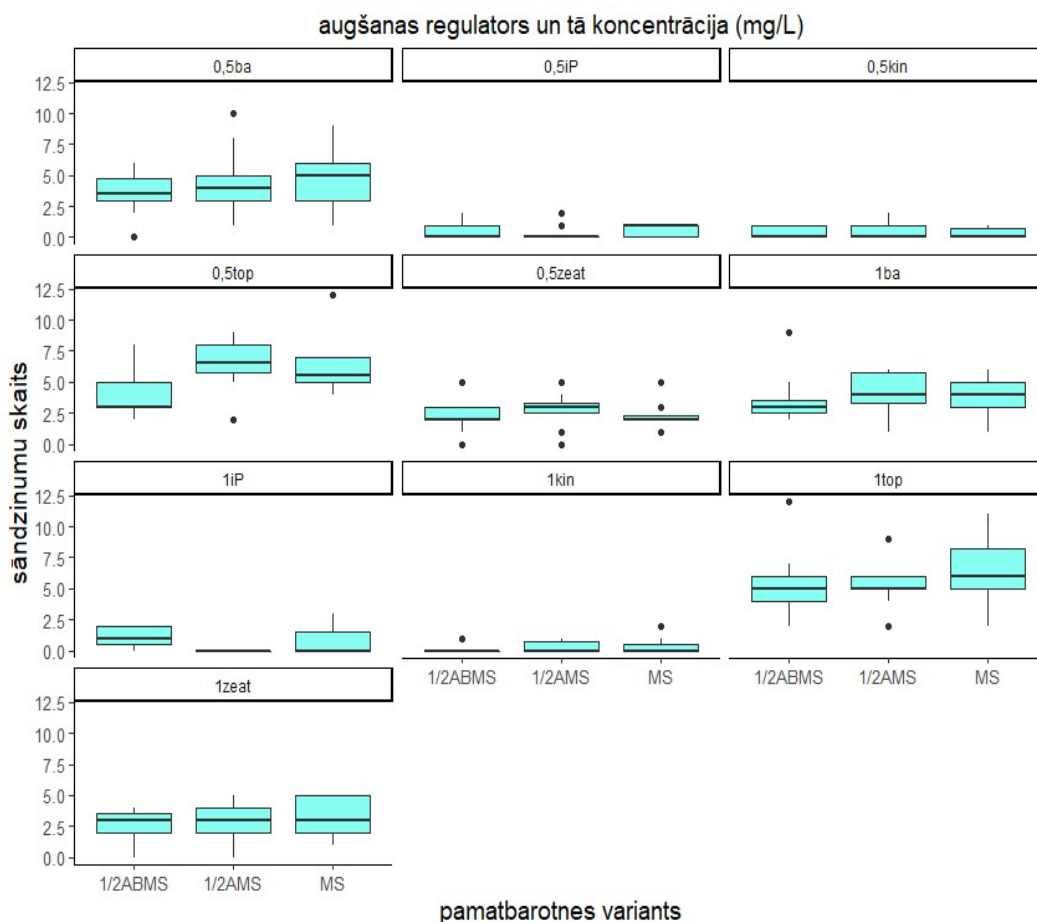


10 attēls. Kallusa veidošanās pakāpe atkarībā no izmantotās barotnes un augšanas regulatora.

Figure 10. Degree of callus formation depending on the medium and the growth regulator used.

Lielāko vidējo sāndzinumu skaitu ieguva, izmantojot 1 mg L<sup>-1</sup> topolīnu, nedaudz mazāks skaits bija ar 0,5 mg L<sup>-1</sup> topolīnu, 0,5 mg L<sup>-1</sup> BAP un 1 mg L<sup>-1</sup> BAP. Augstākās kallusa attīstības

pakāpes ieguva, izmantojot zeatīnu. Pie tik izteiktas kallusa veidošanās jauni sāndzinumi neveidojās. Zemākās kallusa pakāpes ieguva, izmantojot kinetīnu, kas nestimulēja arī sāndzinumu veidošanos. Ar pārējiem augšanas regulatoriem kallusa pakāpes vērtības bija no divi līdz trīs, bet kopumā vairāk mazāku vērtību ieguva, izmantojot zemāku koncentrāciju (0,5 mg L<sup>-1</sup>). Būtisku slāpekļa un saharozes koncentrācijas ietekmi nekonstatēja.



11. attēls. Sāndzinumu skaits atkarībā no izmantotās barotnes un augšanas regulatora.

Figure 11. Number of side shoots depending on the medium and the growth regulator used.

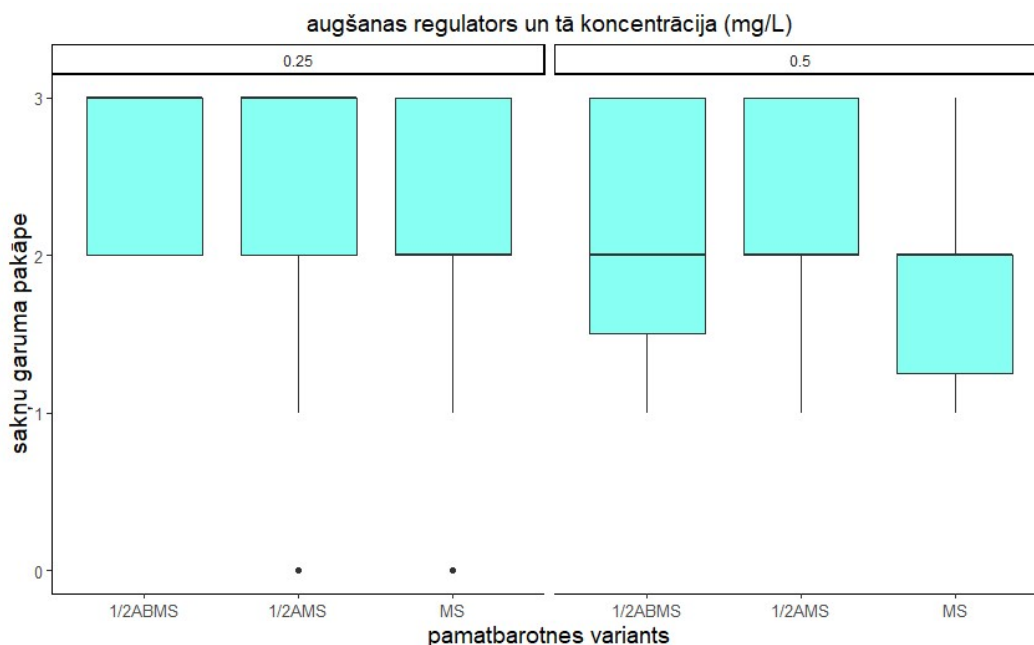
Otrajā eksperimentā iegūtos datus sadalīja pēc tā, kāda bija izmantotā pamatbarotne un kāda BAP koncentrācija, iegūstot trīs grupas pēc pamatbarotnes – MS, 1/2AMS un 1/2 ABMS, un divas grupas pēc BAP koncentrācijas – 0,25 un 0,5 mg L<sup>-1</sup>. Eksperimenta mērķis bija noskaidrot, kāda ir piemērotāka BAP koncentrācijas un pamatbarotnes kombinācija eksplantu apsākņošanās un augšanas veicināšanai, ar nolūku sagatavot materiālu izstādīšanai *ex vitro*.

11. tabula. Otrā eksperimenta parametru  $p$  vērtības pēc ANOVA.

Table 11. P-values by ANOVA of the parameters of the second in vitro experiment.

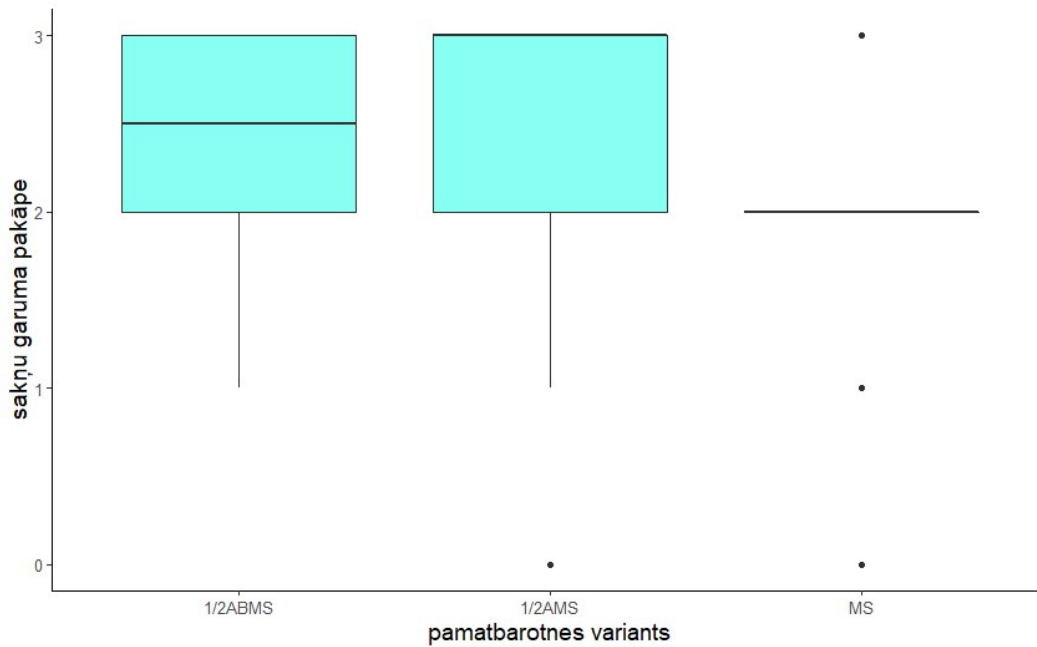
Variants	Sāndzinumu skaits	Kallusa pakāpe	Sakņu garuma pakāpe	Sakņu daudzums
$p$ vērtība pēc ANOVA	0,914	2,95957E-11	0,045192899	0,088372182

Otrā eksperimenta datiem veica Kendall rangu korelācijas analīzi un ieguva četras statistiski būtiskas korelācijas – starp sakņu garumu un N koncentrāciju barotnē ( $-0,20$ ), sakņu skaitu un N koncentrāciju barotnē ( $-0,17$ ), BAP koncentrāciju un sakņu garumu ( $-0,24$ ), BAP koncentrāciju un kallusa pakāpi ( $0,61$ ), jo attiecīgās  $p$  vērtības bija mazākas par noteikto būtiskuma līmeni ( $0,03$ ;  $0,04$ ;  $0,01$  un  $8.306e-11 < 0,05$ ). Pēc ANOVA testa  $p$  vērtībām nozīmīgas atšķirības, izmantojot eksperimenta barotnes, ieguva kallusa un sakņu garuma pakāpju attīstībai (11. tabula).



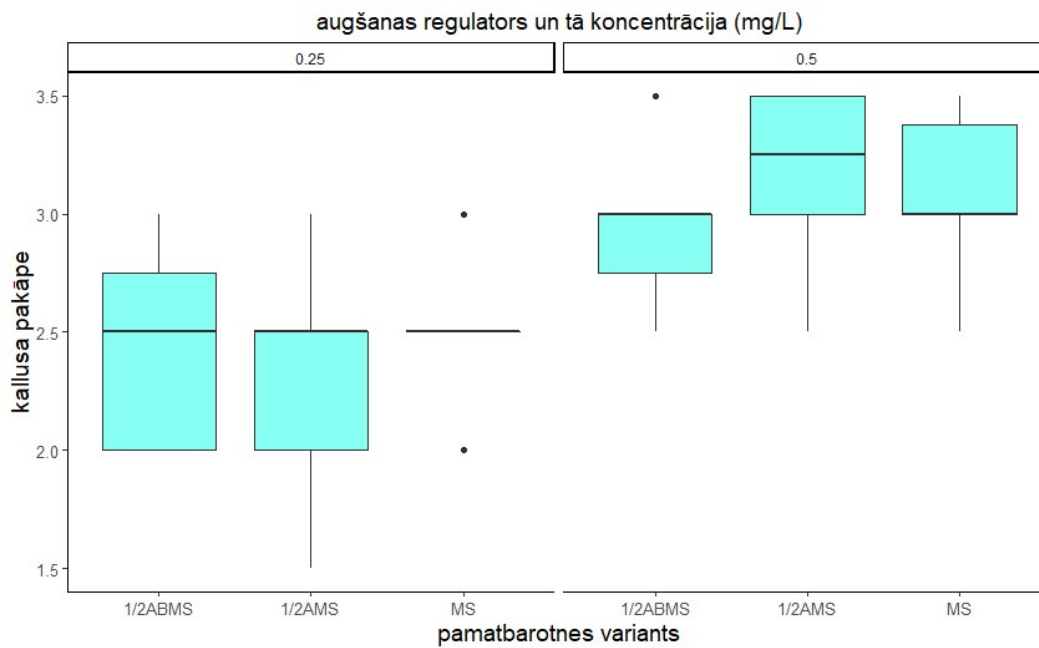
12. attēls. Sakņu garuma pakāpe atkarībā no barotņu tipa un izmantotās BAP koncentrācijas.

Figure 12. Degree of root length depending on the medium and the growth regulator and the concentration of BAP used.



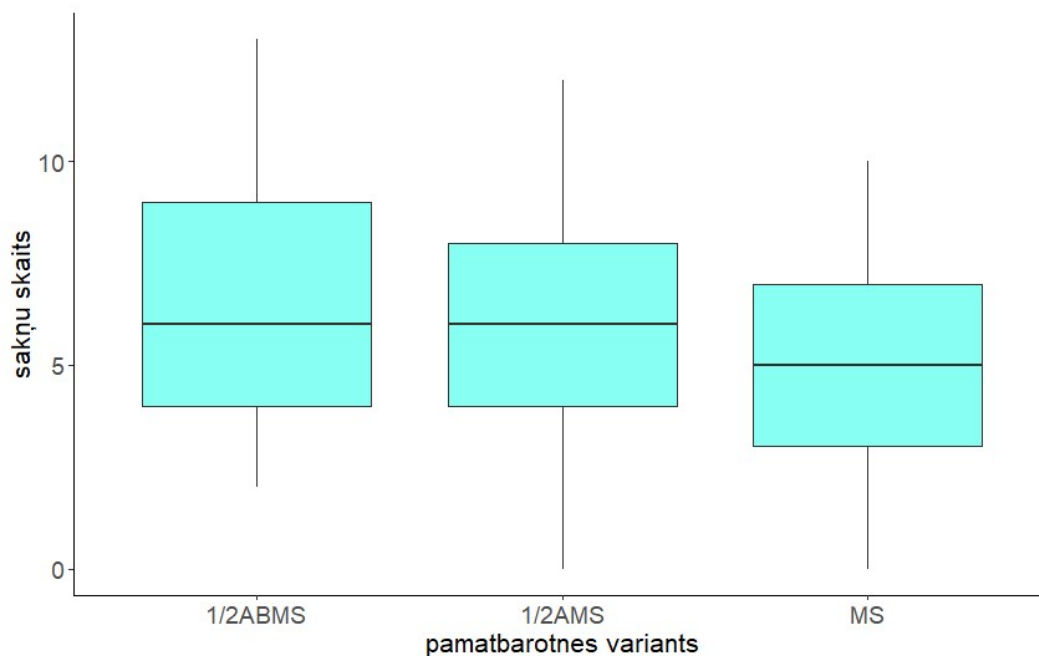
13. attēls. Sakņu garuma pakāpe atkarībā no pamatbarotnes.

Figure 13. Degree of root length depending on the medium used.



14. attēls. Kallusa veidošanās pakāpe atkarībā no barotņu tipa un BAP koncentrācijas.

Figure 14. Degree of callus formation depending on the medium and the concentration of BAP used.



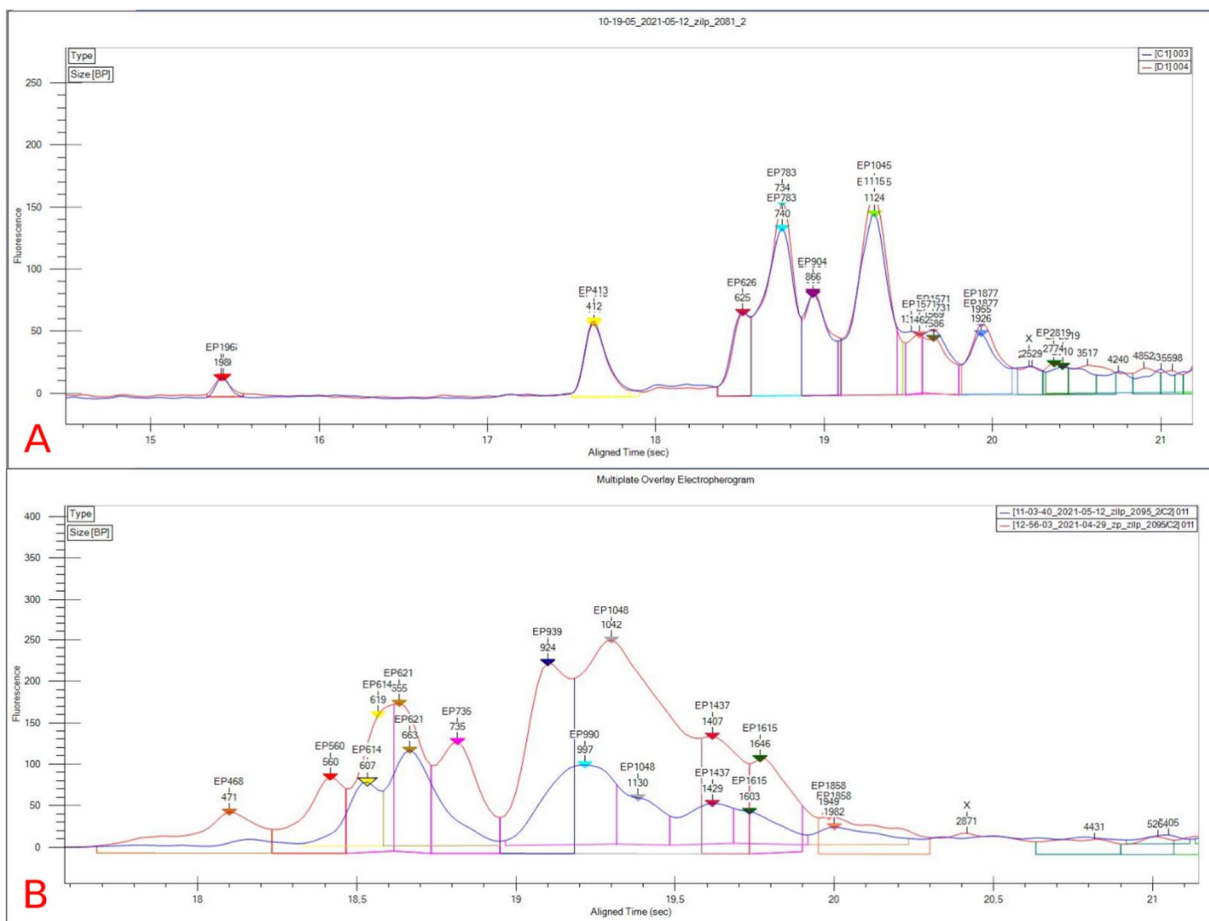
15. attēls. Sakņu skaits atkarībā no pamatbarotnes veida.

Figure 15. Number of roots depending on the medium used.

Balstoties uz Kendall rangu korelācijas analīzes iegūtajām statistiski būtiskajām korelācijām, izveidoja *boxplot* grafikus ar šīm vērtībām. Attiecīgi attēloja sakņu garuma pakāpes un BAP koncentrācijas saistību (12. attēls). Secināja, ka zemākā BAP koncentrācijā ( $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ ) sakņu garuma pakāpes bija lielākas. Turklāt ieguva saistību ar slāpekļa koncentrāciju barotnē – visvairāk garo sakņu bija viszemākajā slāpekļa koncentrācijā (1/2 ABMS). Attēloja saistību starp sakņu garuma pakāpi un izmantoto pamatbarotni jeb slāpekļa koncentrāciju barotnē, neņemot vērā pievienotā BAP koncentrāciju (13. attēls). Rezultātā visvairāk paraugu ar maksimālo vērtību ieguva, izmantojot 1/2 AMS barotni. Attēloja arī BAP koncentrācijas ietekmi uz kallusa attīstības pakāpi (14. attēls), kā arī pamatbarotnes ietekmi uz sakņu skaitu, neatkarīgi no pievienotās BAP koncentrācijas (15. attēls). Secināja, ka pie augstākas BAP koncentrācijas ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) iegūst augstākas kallusa pakāpes vērtības. Izteiktu slāpekļa koncentrācijas ietekmi nenovēroja. Salīdzinot pamatbarotnes saistību ar sakņu skaitu, novēroja, ka kopumā pie zemākas slāpekļa koncentrācijas (1/2 ABMS) attīstās vairāk sakņu. Izvērtējot visus aspektus, secināja, ka piemērotākā *E. maritimum in vitro* augsnes barotne ir 1/2 AMS vai 1/2 ABMS ar  $0,25 \text{ mg L}^{-1}$  BAP, jo šādos apstākļos ieguva augstākās sakņu attīstības vērtības un zemākās kallusa attīstības vērtības.

### 3.4. Ģenētiskās stabilitātes pārbaude

Ģenētiskajai analīzei izmantoja 71 paraugu, no tiem četri bija no Vācijas, viens no Itālijas, 53 no *in vitro* kolekcijas (sēklas no Užavas) un 15 no Užavas atradnes. Kā arī, izvēlējās deviņus piemērotākos praimerus, tiem amplifikāciju ar sekojošu produktu garuma analīzi atkārtoja divas reizes. Izmantojot kvalitatīvāko no atkārtojumiem, ieguva datu kopu no 127 lokusiem. Pēc zemas kvalitātes pīķu izņemšanas no analīzes, ieguva 115 lokusus (10% samazinājums).



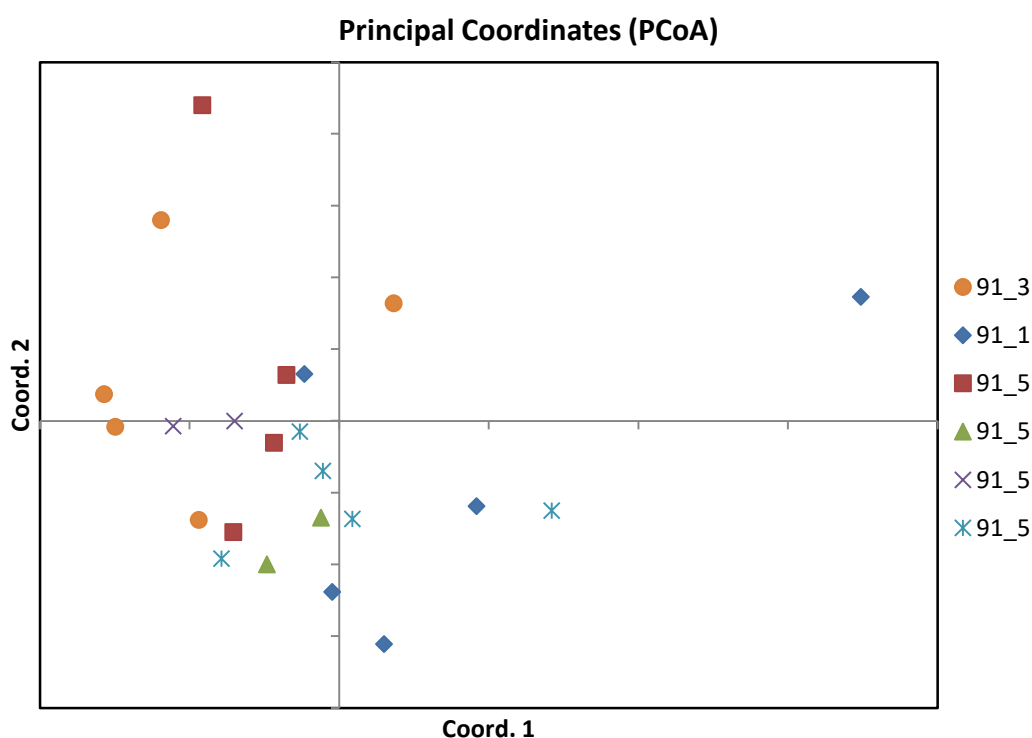
16. attēls. (A) Labas kvalitātes atkārtojumu hromatogrammas, (B) atkārtojumu hromatogrammas ar ievērojamu atšķirību.

Figure 16. Good quality replicate chromatograms, (B) replicate chromatograms with significant difference.

Analizējot amplifikācijas atkārtojumus, atklāja 23% variējošu lokusu, kas norāda uz zemu atkārtojamību starp analīzēm. Daļa viena DNS parauga atkārtojumu hromatogrammu ievērojami atšķirās pēc programmatūras noteiktās vidējās kopējās produktu koncentrācijas visiem paraugiem, norādot uz kopēju zemāku amplifikācijas kvalitāti kādā no atkārtojumiem (16. attēls). Tā kā

reaģentu tilpumi un reakcijas apstākļi bija nosacīti vienādi, šis rezultāts atspoguļo pipetēšanas atšķirības, iespējamās izmantoto reaģentu atšķirības, čipa sagataves iespējamās atšķirības nelielu paraugu tilpumu analīzē un rosina turpmāk izmantot vismaz trīs atkārtojumus.

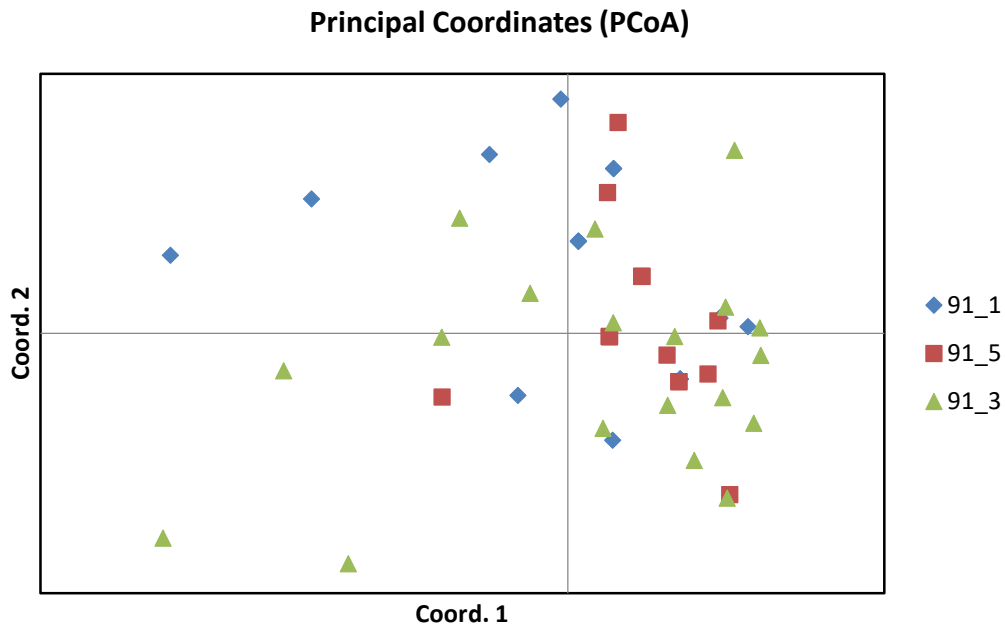
Lai pārliecinātos par metodes atkārtojamību no *in vitro* augiem iegūtajiem DNS paraugiem veica bioloģiskos atkārtojumus (t.i. DNS izdala no vairākām atsevišķām viena auga lapām). Veicot MM MS (*multilocus matches analysis for binary (diploid) data*) analīzi ar 88 iegūtajiem lokusiem starp bioloģiskajiem atkārtojumiem visi iegūtie genotipi bija unikāli. PCoA (*principal coordinate analysis*) testā ieguva grafiku ar izkliedētiem datiem (17. attēls). Vadoties pēc šiem datiem, no analīzes izslēdza četrus “nedrošos” lokusus, tāpēc turpmāko analīzi veica ar 84 lokusiem.



17. attēls. Bioloģisko atkārtojumu PCoA tests, izmantojot 88 lokusus.

Figure 17. PCoA test for biological replicates using 88 loci.

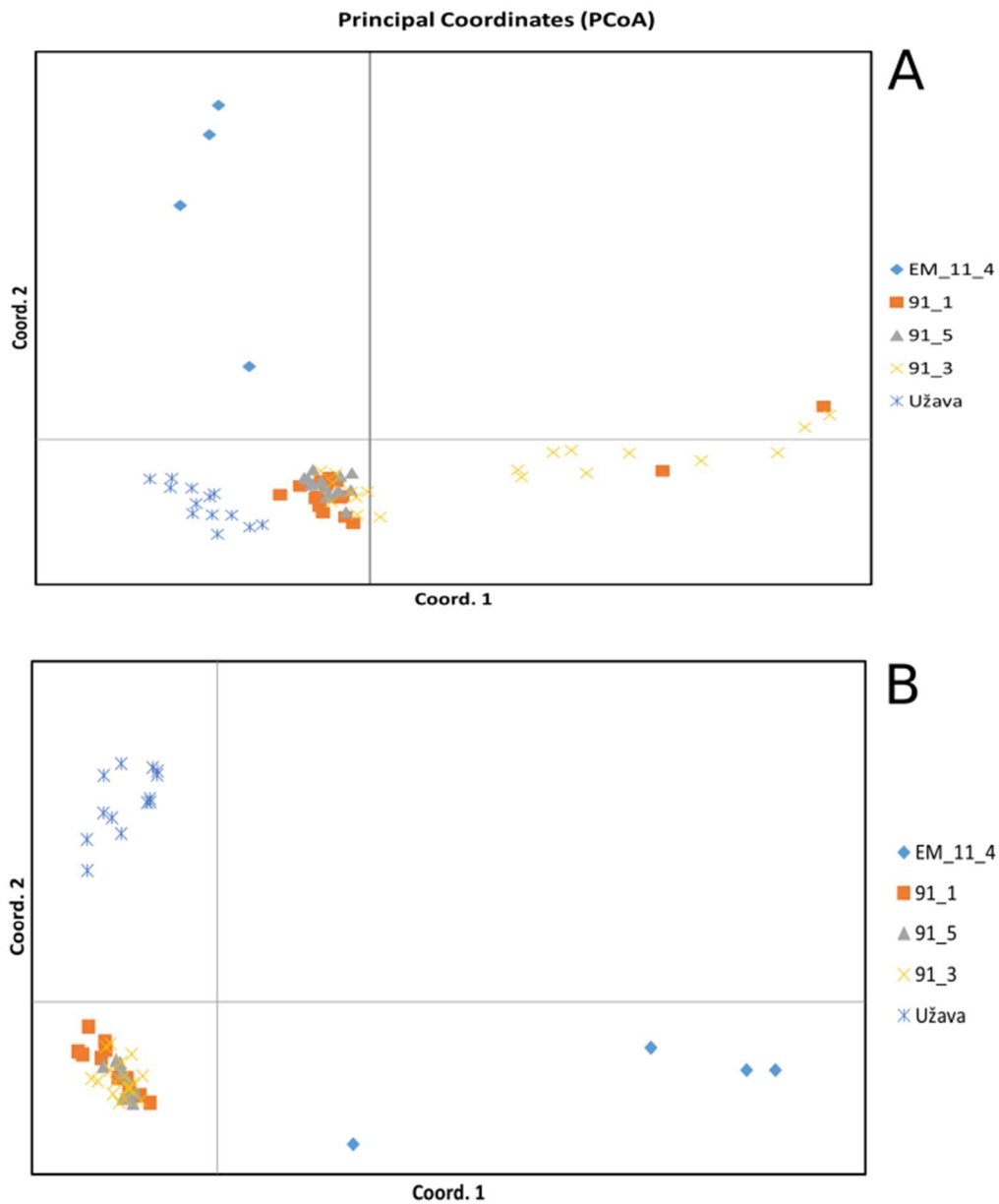
Salīdzinot rezultātus starp *in vitro* uzturētajiem *E. maritimum* merikloniem tāpat kā bioloģiskajiem atkārtojumiem PCoA testā, ieguva grafiku ar izkliedētiem datiem bez izteiktām populāciju tendencēm (18. attēls). Ar MM MS testu ieguva sešus atkārtojamus genotipus un 30 unikālus. Atkārtojamie genotipi bija identiski dažādu meriklonu paraugiem. Tātad *in vitro* ilgstošas uzglabāšanas apstākļos varētu būt notikušas somaklonālas izmaiņas. Tomēr ir nepieciešamība pievērst uzmanību arī metodikas precizitātes nepilnībām.



18. attēls. *In vitro* ilgstoši uzglabāto meriklonu PCoA tests, izmantojot 84 lokusus.

Figure 18. PCoA test of *in vitro* long-term storage mericlones using 84 loci

Kopējo populāciju analīzi veica gan izmantojot 88 lokusus (A), gan atlasītos 84 “drošos” lokusus (B) (19. attēls). Analīzē ar visiem lokusiem PCoA testā novēroja, ka atsevišķi grupējās Užavas, Vācijas, Itālijas un *in vitro* paraugi. Tomēr starp *in vitro* paraugiem 91<sub>3</sub> meriklonam 10 paraugi, kā arī divi 91<sub>5</sub> meriklona paraugi izkļiedēti grupējās atsevišķi no pārējiem *in vitro* paraugiem. Nobīdi skaidroja ar datu iztrūkumu konkrētajos genotipos. Veicot PCoA bez četriem “nedrošajiem” lokusiem kopējā tendence bija tāda pati un minētie 91<sub>3</sub> un 91<sub>5</sub> meriklona paraugi nenobīdījās.



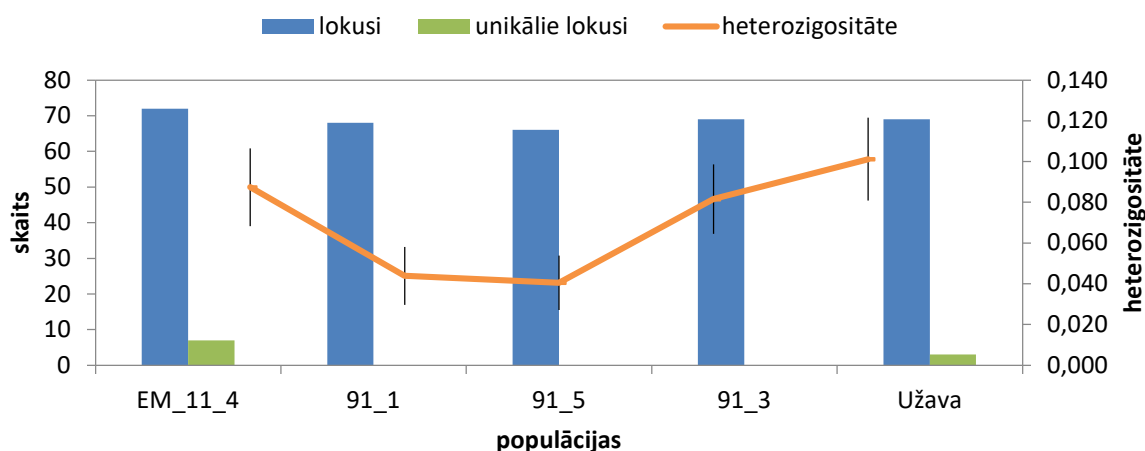
19. attēls. Kopējais populāciju PCoA tests izmantojot 88 lokusus (A), 84 lokusus (B).  
 Figure 19. PCoA test of all populations using 88 loci (A), 84 loci (B).

Veicot PCoA testu ar vidējiem populāciju rezultātiem, izmantojot 84 lokusus, ieguva grafiku, kurā cieši grupējās *in vitro* populācijas – 91<sub>1</sub>, 91<sub>3</sub> un 91<sub>5</sub>. No tām savstarpēji tuvākas bija 91<sub>5</sub> un 91<sub>1</sub>, kas arī fenotipiski atšķiras no 91<sub>3</sub>. Užavas, Vācijas un Itālijas populācijas grafikos bija ar līdzīgu ģenētisko distanci pret *in vitro* populācijām.

12. tabula Populāciju molekulārā variānce.

Table 12. Molecular variance of populations.

Molekulārā variānce, izmantojot 88 lokusus	
Starp populācijām	Populāciju iekšienē
42 %	58 %
Molekulārā variānce, izmantojot 84 lokusus	
56 %	44 %



20. attēls. Populāciju heterozigositātes rādītāji.

Figure 20. Heterozygosity indicators of populations

Pēc AMOVA (*analysis of molecular variance*) PhiPT testa ieguva salīdzinoši augstu, molekulāro variānci starp populācijām un to iekšienē (12. tabula), liecinot par daudzveidīgām populācijām. fq BAFL testa polimorfisma un fq BAPT testa heterozigositātes rezultātos starp populācijām bija atšķirības daudzveidībā (20. attēls). No *in vitro* glabātajiem merikloniem 91<sub>3</sub> bija augstākā heterozigositāte, līdzīgi kā Užavas izcelsmes paraugiem. Tomēr dabiskās Užavas populācijas heterozigositāte bija nedaudz augstāka, liecinot par lielāko ģenētisko mainību starp analizētajām populācijām. Tomēr, ņemot vērā, ka 91<sub>1</sub>, 91<sub>5</sub> un 91<sub>3</sub> populācijas veidoja kloni, iegūtie rezultāti norādīja uz *in vitro* apstākļu izraisītām izmaiņām genomā.

## 4. DISKUSIJA

Darba izstrādes procesā pārbaudītas aužu kultūru izmantošanas iespējas *E. maritimum* bioloģijas pētījumos. Viens no darba uzdevumiem bija eksperimentāli pārbaudīt *E. maritimum* veģetatīvo vairošanos ar saknēm. Lai to izdarītu veica ievadīšanas *in vitro* izmēģinājumu ar dabā ievāktām saknēm. Pirms sakņu ievadīšanas veica to anatomisko izpētīti, lai noskaidrotu, vai tās satur struktūras, kas liecinātu par adventīvo pumpuru veidošanos.

Augu saknēs ir sastopami divu veidu adventīvie pumpuri – papildus (*additional*) un reperatīvie (*reperative*) (Bosela, Ewers 1997; Hayashi *et al.* 2001; Appezzato-da-Glória *et al.* 2008). Papildu pumpuri veidojas nesavainotu sakņu agrīnās augšanas laikā. Tie saglabājas augot uz āru kopā ar kambiju un tiem veidojas pumpuru pēdas sekundārajā ksilēmā. Reperatīvie pumpuri veidojas *de novo*, reaģējot uz novecošanos, ievainojumiem vai cita veida traucējumiem. Tie veidojas no kambija, pericikla vai parenhīmas proliferācijas un tiem nav pumpura pēdu sekundārajā ksilēmā. Papildu pumpuru klātesamība liecina par veģetatīvo izplatīšanos ar pazemes daļām (Bosela, Ewers 1997; Appezzato-da-Glória *et al.* 2008).

Appezzato-da-Glória *et al.* 2008. gada publikācijā iegūtajos attēlos no *Chresta sphaerocephala* sakņu šķērsgriezumiem redzama adventīvo pumpuru veidošanās, līdzīgi kā redzams šajā darbā iegūtajos šķērsgriezumos no *E. maritimum* saknēm. Tātad var secināt, ka *E. maritimum* saknēm veidojas adventīvie pumpuri, attiecīgi notiek veģetatīvā izplatība ar pazemes daļām. Publikācijā aprakstīto Brazīlijas savannas un klinšaino apgabalu augu sugu pazemes daļas tiek dēvētas par ksilopodijiem (*xylopodium*). Pirmo reizi šādu terminu lietoja Lindman 1900. gadā, aprakstot augus, kam pazemes daļas ir koksnainas, bet virszemes daļas katru sezonu nomainās, nelabvēlīgos apstākļus pārciešot ar pazemes sistēmām (Appezzato-da-Gloria 2008). Tās ir kompleksas struktūras, kas var veidoties no vasas un saknes (Lopes-Mattos *et al.* 2013). Tie veido jaunus dzinumus un ļauj augiem izdzīvot skarbos apstākļos. *E. maritimum* dzīvotņu apstākļi ir līdzības ar aprakstītajiem augiem, tāpēc to pazemes daļu morfoloģijai un augšanas raksturam ir daudz analogiju.

Literatūrā ir aprakstīts, ka piesaknes un sānsaknes veidojas endogēni, attīstoties no saknes centrālā cilindra dzīvās šūnu kārtas jeb pericikla (Bumbura *et al.* 1967). Tāpēc var pieņemt, ka no iegūtajos attēlos redzamajām struktūrām, kas veidojas no koksnes stariem, var attīstīties jauni dzinumi un sugai piemīt veģetatīvā vairošanās ar sakņu adventīvajiem pumpuriem. Attiecīgi ieguva secinājumu, ka ir pamats tālākiem *E. maritimum* sakņu veģetatīvās pavairošanas eksperimentiem,

izmantojot audu kultūras, iegūstot no tiem jaunus dzinumus caur tiešo organoģenēzi no sakņu adventīvajiem pumpuriem.

Līdz šim literatūrā nav aprakstīta *E. maritimum* sakņu ievadīšana *in vitro* (Isermann, Rooney 2014). Bakalaura darbā pārbaudīja, vai ir iespējams izmantot dabā ievāktus *E. maritimum* sakņu fragmentus ievadīšanai *in vitro*. Veica divus ievadīšanas eksperimentus, no kuriem katrā tikai vienā mēģenē ar saknes fragmentu no vismaz 20 sagatavotajām nebija infekcijas ar sēni vai baktēriju. Šāds skaits nebija pietiekams, lai varētu veikt tālāku eksperimentu, kurā pārbauda jaunu dzinumu veidošanos no sakņu fragmentiem un to reakciju pret dažādiem augšanas regulatoriem. Galvenokārt mēģenēs novērotās infekcijas bija sēņu izraisītas. Tas varētu būt saistīts ar to, ka Latvijas atradnēs sugai ir relatīvi augsta mikorizas simbioze visu veģetācijas sezonu neatkarīgi no vides faktoriem (Andersone *et al.* 2011).

Ņemot vērā, ka tomēr divi no ievadītajiem fragmentiem tika veiksmīgi dezinficēti, var secināt, ka sakņu fragmentus ir iespējams ievadīt *in vitro*. Būtu ieteicams pārbaudīt citas literatūrā aprakstītās augu materiāla dezinfekcijas metodes, piemēram, apstrāde ar 7% etanolu (da Silva *et al.* 2011), pēc dezinfekcijas ar balinātāju vai HgCl<sub>2</sub> veicot vairāk nekā trīs skalošanas ar sterilu ūdeni (da Cruz *et al.* 2014; Liang *et al.* 2020), apstrādājot ar 2% Bavistin® 30 min (Franklin *et al.* 2004).

No saknēm ievadīts materiāls ir vērtīgs, īpaši reto un aizsargājamo augu gadījumā. Tas nodrošina dabisko populāciju klonu iegūšanu. Šādi kloni ir vērtīgi gadījumos, kad sugai ir farmaceutisks potenciāls un kad ir nepieciešams pavairot un veikt eksperimentus ar indivīdiem, kas reprezentē dabisko atradņu augu īpašības. *E. maritimum* atradnes Latvijā ir aprakstītas kā kritiski apdraudētas un to sēklu kvalitāte ir zema, tāpēc ieteicams turpināt metodikas izstrādi to sakņu ievadīšanai *in vitro*.

Jau vairāk nekā 10 gadu NBD aizsargājamo un reto augu sugu *in vitro* kolekcijā tiek uzglabāti trīs *E. maritimum* merikloni, kas iegūti no Užavas atradnē ievākta sēkla materiāla. To izmantoja, lai noskaidrotu efektīvāko darba objekta pavairošanas metodi *in vitro*. Veica divus audu kultūru eksperimentus. Eksperimentu mērķis bija noskaidrot, kā augšanas regulatori un to koncentrācijas, kā arī slāpekļa un saharozes daudzums barotnē ietekmē sakņu, sāndzinumu un kallusa veidošanos.

Pirmajā eksperimentā izmantoja biežāk izmantotos augšanas regulatorus (13. tabula) un trīs dažādas pamatbarotnes. Šajā eksperimentā visiem noteiktajiem parametriem starp barotnēm pēc ANOVA ieguva nozīmīgas atšķirības, kam būtiskuma līmenis ir < 0,05. Kā nozīmīgākos parametrus uzskatīja kallusa veidošanos un sāndzinumu skaitu, jo eksperimenta mērķis bija

noskaidrot piemērotāko barotnes variantu vienveidīga materiāla pavairošanai. Lielāko sāndzinumu skaitu ieguva barotnēs ar BAP un topolīnu. Ņemot vērā līdzīgo sāndzinumu skaitu šiem variantiem un to izmaksas, var secināt, ka BAP ir labāks augšanas regulators intensīvai veģetatīvajai *in vitro* pavairošanai, jo viens grams šīs vielas maksā aptuveni 14 reizes mazāk nekā topolīns (13. tabula).

13. tabula. *In vitro* izmantoto augšanas regulatoru cenu salīdzinājums pēc

Table 13. Price comparison of *in vitro* growth regulators

(<https://www.duchefa-biochemie.com/>)

Augšanas regulators	Cena (eur) par 1g
Zeatīns	1005.00
Meta-topolīns	118.50
2-iP	47.00
Kinetīns	17.00
6-Benzilaminopurīns (6-BAP)	8.60

Kalluss ir nediferencētu šūnu masa, kas veidojas griezuma vietās kā rētas dziedējoša forma pēc svaigi griezta eksplanta ievietošanas augšanai labvēlīgos apstākļos (Neumann *et al.* 2009; Vētra 2016). Kallusa veidošanos uzskata par nevēlamu faktoru gadījumos, kad nepieciešams iegūt ģenētiski identisku materiālu, jo pastāv uzskats, ka tā veidošanās veicina somaklonālās mutācijas (Wang, Wang 2012). Šajā eksperimentā kopumā starp visiem variantiem kallusa veidošanās būtiski atšķīrās, tomēr starp topolīna un BAP variantiem, kuros bija visaugstākais sāndzinumu skaits, būtiskas atšķirības nebija. No pārbaudītajiem variantiem par visveiksmīgāko var uzskatīt 0,5 mg L<sup>-1</sup> topolīna 1/2 AMS, jo veidojas visvairāk sāndzinumu un kallusa pakāpe ir zemāka, nekā izmantojot 0,5 mg L<sup>-1</sup> BAP. Tomēr, ņemot vērā lielo cenas atšķirību, masveida pavairošanai izdevīgāk ir izmantot 0,5 mg L<sup>-1</sup> BAP, jo tas ir daudz lētāks, bet iegūtie rezultāti ir līdzīgi.

Otro audu kultūru eksperimentu uzsāka ar mērķi noskaidrot piemērotāko barotni eksplantu apsākņošanai un sagatavošanai izmantošanai *ex vitro*. Kopumā būtiskas atšķirības starp variantiem bija kallusa pakāpei un sakņu garuma pakāpei. Vērtējot pēc kallusa pakāpes, mazāk izteikti kalluss veidojas, izmantojot 0,25 mg L<sup>-1</sup> BAP. Vērtējot pēc sakņu garuma pakāpes, augstākie rezultāti tiek iegūti ar 1/2 ABMS pamatbarotni, neatkarīgi no pievienotās BAP koncentrācijas. Tātad var secināt, ka no pārbaudītajām barotnēm piemērotākā *in vitro* apsākņošanai ir 0,25 mg L<sup>-1</sup> BAP vai 1/2 ABMS. Šāda barotne ir ne tikai piemērotākā sugas apsākņošanai, bet nodrošina arī zemākās izmaksas, kas ir būtisks faktors.

Slāpekļa uzņemšanas efektivitāte augiem ir augstāka no amonija, nekā no nitrāta, jo nitrātu asimilācijai ir nepieciešams patērēt vairāk enerģijas, kā arī to asimilācija veicina pasārmināšanos (Zhang *et al.* 2019). MS barotnē nitrātu un amonija attiecība ir 2:1. Kā piemērotākā barotne šajā darbā apsākšanai ir ar samazinātu nitrātu un amonija saturu (1/2 ABMS). Tas varētu būt saistīts ar to, ka pie samazināta slāpekļa daudzuma ir nepieciešamas veidot vairāk sakņu, lai uzņemtu pietiekami daudz slāpekļa. Kā arī, BAP pievienošana nelielā koncentrācijā veicina sakņu veidošanās procesu. Šī eksperimenta rezultāti ir noderīgi, lai izvēlētos piemērotākās eksperimenta barotnes sakņu ievadīšanas *in vitro* gadījumā. Jo bieži vien ievadīšanas procesā tiek iegūts ierobežots daudzums materiāla, kuru nedrīkst izšķērdēt ievietojot barotnēs ar augšanas regulatoriem, kas nav bijuši efektīvi šīs sugas pavairošanai.

Augu materiāla pavairošanai ar audu kultūrām var būt arī negatīvi aspekti. Ir zināms, ka audu kultūru apstākļos augiem ir novērojamas mutācijas, ko izraisa oksidatīvais stress (Krishna *et al.* 2016). Vides un populāciju faktori, kā arī stress var inducēt migrējošo elementu aktivitāti. Sekas paaugstinātai migrējošo elementu aktivitātei ir jauna ģenētisko variāciju veidošanās, kas var būt izdevīgi stresa apstākļos (Capy *et al.* 2000). Stresu iedala divās klasēs – tāds, kas izraisa fizioloģisku atbildi, un tāds, kas izraisa fenotipisku un/vai ģenētisku atbildi. Svarīgi ņemt vērā, ka atbilde uz stresu var būt lokāla, ja stress ir izraisīts lokāli.

*E. maritimum* ir Latvijā reti sastopama un apdraudēta suga, kam piemīt arī farmakoloģiski vērtīgas īpašības. Ir nepieciešams vērst uzmanību gan tās dabisko populāciju, gan ģenētisko resursu identitātes saglabāšanai. *In vitro* kolekcijas ir viena no reto augu *ex situ* saglabāšanas metodēm. Ņemot vērā literatūrā aprakstīto par mutāciju veidošanos *in vitro* apstākļos, NBD *in vitro* kolekcijā ilgstoši uzglabājamiem merikloniem veica ģenētiskās stabilitātes pārbaudi, izmantojot iPBS marķierus.

DNS izdalīšanai no augu lapām izvēlējās izmantot CTAB metodi, balstoties uz iepriekšēju DNS izdalīšanas no augu materiāla pieredzi. Arī literatūrā šo metodi novērtē kā vienu no labākajām. Piemēram, pētījumā, kur tika pārbaudīti trīs dažādi protokoli DNS ekstrakcijai no kukurūzas un sojas – CTAB, *DNeasy*, *Wizard Genomic*, ar CTAB metodi ieguva augtāko DNS saturu, zemāko proteīnu saturu un augstu tīrības pakāpi (Jensen 2003). Darbā no *E. maritimum* izdalītajam DNS iegūtā tīrības pakāpe, kā arī DNS saturs bija salīdzinoši zems. Zema tīrības pakāpe apgrūtina kapilārās elektroforēzes izmantošanu, jo metode ir ārkārtīgi jutīga. Attiecīgi paraugiem ar zemu tīrības pakāpi rezultāti var būt neprecīzi, jo piesārņojums var gan uzrādīties kā pīķis rezultātu hromatogrammās, gan arī var piesārņot čipa kapilāru. DNS sekvenču kvalitāte ir tieši

atkarīga no izejas materiāla kvalitātes (Barry, Cohen 2013). Nukleīnskābes bieži tiek pakļautas traumējošiem procesiem laikā no ievākšanas līdz attīrīšanai. Neatbilstoša uzglabāšana un agresīvi ekstrakcijas procesi var inducēt mehāniskus un ķīmiskus DNS molekulu bojājumus.

Zemā izdalītā DNS kvalitāte var būt saistīta ar *E. maritimum* dzīvotnes apstākļiem. Kā kāpu augam tai, lai pielāgotos augšanas videi, ir vaskainas un cietas lapas, kā arī augsts fenolu saturs, kas padara to par vērtīgu sugu farmakoloģiskiem mērķiem. Tomēr šīs īpašības apgrūtina kvalitatīvas DNS ekstrakcijas iespējas, tāpēc šādām sugām, kas aug specifiskos apstākļos un ir ar papildus aizsargmehānismiem, bieži ir nepieciešams pielāgot īpašus DNS ekstrakcijas protokolus. Ar CTAB metodi var iegūt kvalitatīvu DNS no augiem, kam nav specifisku aizsargmehānismu. Kā viena no metodēm, ko ieteicams pārbaudīt šai sugai, ir DNS ekstrakcija ar sārmainu PVPP izdalīšanas buferi un attīrīšanu ar CsCl (Kasajima *et al.* 2013). Šī metode ir veiksmīgi pārbaudīta uz tādām ģintīm kā *camelia*, *chrysanthemum*, *orchid*, *pine*, *rose*, *tea*. PVPP parasti izmanto, lai atbrīvotos no polifenoliem, tāpēc varētu uzlabot iespējas iegūt kvalitatīvu DNS no *E. maritimum*.

Veica 58 *in vitro* un 13 Užavas DNS paraugu ģenētisko analīzi ar kapilāro gēla elektroforēzi mikrofluidiskā sistēmā LabChip-GX touch (*PerkinElmer*). Kapilārā mikročipa elektroforēzes tehnoloģija tiek automatizēta ar *LabChip* elektroforēzes sistēmu, nodrošinot DNS fragmentu sadalīšanu, detekciju un analīzi (Panaro *et al.* 2000; Fajardo *et al.* 2009). Mikročipu elektroforēzes ieguvums ir samazināts analīžu veikšanas laiks, toksisku reaģentu un paraugu patēriņš, jo analītiskās laboratorijas procedūras tiek veiktas un mikrofluīdu čipa (Castro, Manz 2015). Ievērojami tiek paaugstināta veikšanas kapacitāte, jo dienā ir iespējams izanalizēt 576 paraugus, jeb līdz 1152 paraugiem divās dienās ar vienu čipa sagatavi, kamēr trīs standarta elektroforēzes iekārtas ļauj izanalizēt ap 108 paraugiem dienā. Tomēr mikrofluīdu čipa tehnoloģija ir salīdzinoši jauna un netika plaši pielietota multilokusu analīzei, ko sniedz iPBS marķieru metode.

Lai pārbaudītu metodes precizitāti, izmantoja bioloģiskos atkārtojumus, t.i. DNS tika izdalīts arī no vairākām viena auga lapām, kā arī divus PCR reakciju atkārtojumus. No *in vitro* paraugiem ieguva sešas bioloģisko atkārtojumu sērijas. Izmantojot strikti atlasītus 88 lokusus PCoA testā ieguva grafiku, kurā veidojas trīs grupas - *in vitro* ilgstoši uzglabātie trīs merikloni, Užavas atradne un Itālijas sēklu paraugi, kā arī viens Vācijas sēklu paraugs (19. attēls). Šāds rezultāts ir gaidāms, jo grupas veido paraugi ar tuvu izcelsmi. Izmantojot 88 lokusus, MM MS testā starp visiem paraugiem konstatēja trīs identiskus genotipus un 65 unikālus. Arī daļai bioloģisko atkārtojumu genotipi nesakrita. Šāds rezultāts norāda uz to, ka metodei nav augsta atkārtojamība. Tas liecina

par metodikas kļūdām un zemu piemērotību multilokusu analīzei. Attiecīgi arī nepieciešamību izmantot vairākus atkārtojumus, lietojot iPBS metodi.

Ņemot vērā šos rezultātus, no analīzes izslēdza četrus lokusus, kurus uzskatīja par “nedrošiem” – analīzi turpinot ar 84 lokusiem. Ar MM MS metodi starp visiem paraugiem ieguva sešus identiskus un 46 unikālus genotipus. Jāpiebilst, ka daži no identiskajiem genotipiem atkārtojās dažādu ilgstoši uzglabāto meriklonu paraugiem. Tas liecina par metodes precizitātes nepilnībām, lai varētu noteikt atšķirības radniecīgi tuvu populāciju līmenī. Bez tam, tas arī rosina domāt par to, vai ilgstošas uzturēšanas laikā *in vitro* apstākļos augiem ir veidojušās mutācijas.

Starp visiem izmantotajiem paraugiem PCoA testā ieguva ainu, kurā kopā grupējas visi Latvijas *in vitro* merikloni, tiem tuvu grupējas no Užavas atradnes iegūtie paraugi, tuvāk ir arī vienas atsevišķs paraugs ar Vācijas izcelsmi, un vistālāk ir visi paraugi ar Itālijas izcelsmi (19. attēls, B). Šajā testā izteikti no grupas atšķiras daļa 91<sub>3</sub> meriklona paraugi. Tas skaidrojams ar to, ka 10 no 19 91<sub>3</sub> meriklona paraugiem iztrūka dati. Datu iztrūkums visticamāk rodas no sliktas kvalitātes DNS, kas ietekmē visu tālāko darbību kvalitāti. Tomēr vērā jāņem tas, ka tieši šim meriklonam no audu kultūrā uzturētajiem ir izteikti labāka vitalitāte. Tātad *in vitro* apstākļos tiešām varētu būt veidojušās genoma izmaiņas. Kā arī no vienas populācijas iegūtu sēklu augiem var būt atšķirīgas īpašības. Lai varētu droši runāt par genotipa izmaiņām, būtu jāpārlicinās, vai šim meriklonam jau no pirmsākumiem ir bijusi labāka vitalitāte.

Ar PCoA testu apskatot vidējos katras populācijas rezultātus var redzēt, ka 91<sub>1</sub> un 91<sub>5</sub> populācijas salīdzinot ar 91<sub>3</sub> ir tuvākas. Arī fenotipiski šie merikloni ir līdzīgāki. 91<sub>3</sub> meriklons izceļas ar lielāku sāndzinumu skaita veidošanos, kā arī spilgtāk zaļām un biežākām labām (vizuāli izskatās veselīgāks). Ņemot vērā heterozigositātes rezultātus no visiem merikloniem LV3 tie ir augstākie un tuvākie dabiskās Užavas populācijas rezultātiem (20. attēls). Augstāka heterozigositāte nozīmē 91<sub>3</sub> lielāku ģenētisko mainību, attiecīgi arī potenciāli labākas pielāgošanās spējas vides apstākļiem. No tā var secināt, ka, izmantojot iPBS metodi, 91<sub>3</sub> meriklons vislabāk reprezentē dabisko Užavas populāciju. Attiecīgi arī, ka šis meriklons ir piemērotākais eksperimentu veikšanai, reintrodukcijai un sekundāro savienojumu iegūšanai.

Lai gan zemās PIC vērtības liecina par to, ka analizētas populācijas ar nelielām atšķirībām, tomēr analizējot tuvradniecīgas populācijas arī nelielām atšķirībām ir liela nozīme. Dažādie klonu genotipi pēc kvalitātes rūpīgi atlasītiem datiem liecina, ka ilgstošas *in vitro* uzglabāšanas laikā var rasties epiģenētiskas izmaiņas. Katru indivīdu uzglabāšanas laikā ir ietekmējis unikāls apstākļu kopums, kas var novest pie dažādām izmaiņām.

Atsaucoties uz Kaeppler *et al.* (2000) rezultātiem, DNS modifikācijas, kas radušās audu kultūrā, biežāk ir atgriezeniskas, salīdzinot ar tām, kas radušās dabiskos apstākļos. Arī Bednarek, Orłowska 2020 (un šajā darbā minētie pētījumi) ir aprakstījuši, ka *in vitro* apstākļos ir bieži novērotas mutācijas un fenotipiskas izmaiņas. Novērots, ka audu kultūrās rodas arī stresa izraisīti hromosomu plīsumi (McClintock 1984), kā arī izmainās migrējošo elementu aktivitāte. Tomēr mehānismi, kas izskaidro somaklonālo variāciju, joprojām tiek pētīti. Literatūrā ir aprakstītas somaklonālu variāciju izraisītas fenotipiskas atšķirības, kas rodas audu kultūru apstākļos (Gimenez *et al.* 2016). Pētījumā ar *Allium sativum* L. *in vitro* apstākļos epiģenētiskais polimorfisms sasniedza maksimālo variāciju 6 mēnešus pēc ievadīšanas kultūrā, bet tad stabilizējās, tomēr ģenētiskās izmaiņas uzglabāšanas laikā akumulējās.

Pēdējo gadu pētījumi liecina par to, ka somaklonālās izmaiņas audu kultūrā ir saistītas ar mobilo elementu aktivitātes izmaiņām (Kaeppler *et al.* 2000; Gozukirmizi *et al.* 2015; Grandbastien 2015) Tos aktivizē stresa apstākļi – paaugstināta temperatūra (Cavrak *et al.* 2014), aukstums, sausums, sāļums, ievainojumi, UV gaisma, patogēni (Grandbastien 2015). Normālos apstākļos aktīvās skābekļa formas (*reactive oxygen species*, ROS) tiek pārtvertas ar antioksidantu palīdzību, bet stresa apstākļos arī to ražošana un izslēgšana nav balansā un ietekmē mobilos elementus (Bednarek, Orłowska 2020). Stresa apstākļi *in vitro* metodēs ir vienmēr klātesoši un kā būtisku LTR regulācijas izmaiņu faktoru min augšanas regulatoru, piemēram auksīnu, lietošanu (Grandbastien 2015).

Ņemot vērā literatūrā aprakstīto, turpmāk būtu vēlams veikt eksperimentu ar mērķi noskaidrot, vai radušās ģenētiskās izmaiņas ir atgriezeniskas un ietekmē fenotipu. Piemēram, atkārtojot šo metodiku ar DNS materiālu, kas iegūts no lauka apstākļos audzētiem izmantotajiem merikloniem. Tas ir svarīgi, lai objektīvi novērtētu iespēju izmantot *in vitro* ilgstoši uzglabāto materiālu sugas reintrodukcijai nepieciešamības gadījumā. Uzskata, ka gan *ex situ* uzglabāšanas, gan reintrodukcijas gadījumā izmantotajam augu materiālam ir jāreprezentē dabisko populāciju (González-Benito, Martín 2011). Kā arī ieteicams sekot līdzi *in vitro* uzglabātā materiāla ģenētiskajai stabilitātei, īpaši, ja ir pieejams svaigi ievadīts materiāls. Tādā veidā pastāv iespēja identificēt daļu ģenētiskās pārmaiņas ierosinošos faktoros un no tiem izvairīties vai mazināt to ietekmi.

Viens no iemesliem, kāpēc retos augus uzglabā *in vitro* kolekcijās, ir bioloģiski aktīvie savienojumi, ko tie satur. Arī *E. maritimum* uzskata par farmakoloģiski vērtīgu augu, jo tā ir ar augstu saponīnu un fenolu saturu (Kikowska *et al.* 2014). Turklāt augiem raksturīgs, ka sekundārie

savienojumi veidojas vairāk sugas izplatības areāla robežu populācijās (Hohtola 2010). Attiecīgi, lai materiālam būtu vēlamā vērtība, ir svarīgi, lai uzglabātā augu materiāla īpašības nav krasi mainījušās no izcelsmes populācijas īpašībām. Tas arī ir iemesls, kāpēc ir vērts pārbaudīt, vai radušās izmaiņas ir paliekošas un stipri ietekmē fenotipu.

Līdz šim veiktos pētījumos, kur ir salīdzinātas Latvijas dabisko *E. maritimum* ģenētiskās atšķirības, ir secināts, ka augi Latvijas populācijās galvenokārt vairojas veģetatīvi, jo vienas populācijas ietvaros ir daudz ģenētiski identisku īpatņu (Ieviņa *et al.* 2019). Šajā darbā *in vitro* uzglabātajiem indivīdiem, kas ir iegūti no Užavas populācijas sēklām, nav izteiktu atšķirību starp genotipiem un tie PCoA testā grupējas kompaktā grupā. Tātad, izmantojot šo metodi, tuvradniecīgi genotipi neizslēdz iespēju, ka dabiskajās atradnēs vairošanās ar sēklām ir aktuāla. Tomēr līdzīgā 91<sub>3</sub> un Užavas paraugu heterozigositāte, kā arī dati par somaklonālajām mutācijām apstiprina *E. maritimum* veģetatīvās vairošanās kā dominējošās iespēju.

## 5. SECINĀJUMI

Dabiskajā atradnē ievāktu *E. maritimum* sakņu šķērsriezumu anatomiskā izpētē noskaidrots, ka to saknēs veidojas morfoloģiskas struktūras, kas liecina par adventīvo pumpuru veidošanos.

Efektīvākā metode *E. maritimum* sakņu mikrospraudeņu ievadīšanai *in vitro* ir apstrāde ar HgCl<sub>2</sub>, bet metodi nepieciešams pilnveidot, lai izvairītos no baktēriju un sēņu izraisītām infekcijām.

*E. maritimum* sāndzinumu veidošanās stimulēšanai piemērotākais augšanas regulators *in vitro* apstākļos ir BAP koncentrācijā 0,5 mg L<sup>-1</sup>. Slāpekļa un saharozes koncentrācijai barotnē nav konstatēta būtiska nozīme.

Apsakņošanās veicināšanai *E. maritimum* mikrospriedņiem *in vitro* piemērotākais augšanas regulators ir BAP koncentrācijā 0,25 mg L<sup>-1</sup> un kombinācijā ar uz pusi samazinātu slāpekļa un saharozes koncentrāciju *Murashige & Skoog* barotnē.

*Labchip* kapilārās elektroforēzes izmantošana kombinācijā ar iPBS metodi ir pietiekami efektīva, lai identificētu somaklonālu variāciju klātbūtni dažādas izcelsmes *E. maritimum* DNS paraugos.

Ilgstošas uzglabāšanas laikā *in vitro* apstākļos *E. maritimum* indivīdiem ir radušās somaklonālas variācijas.

Audu kultūru izmantošana reto un aizsargājamo augu sugu bioloģijas pētījumos dod iespēju iegūt zinātniski būtisku informāciju, nenodarot kaitējumu savvaļas populācijai. Iegūto informāciju var izmantot gan sugu aizsardzības plānošanā, gan praktiskās izstrādēs.

## 6. PATEICĪBAS

Paldies darba vadītājam profesoram Ģedertam Ieviņam un darba konsultantam Angelikai Voronovai par ieguldīto laiku, paskaidrojumiem, labojumiem un padomiem darba izstrādē. Pateicos Nacionālā Botāniskā dārza augu ekofizioloģijas nodaļai, īpaši Dacei Kļaviņai un Dacei Megrei, kā arī LVMI "Silava" ģenētisko resursu centram par iespēju izstrādāt pētījuma praktisko daļu, palīdzību tās izstrādē un zinātniskajiem materiāliem.

## 7. LITERATŪRAS SARAKSTS

Andersone U., Druva-Lūsīte I., Ieviņa B., Karlsons A., Ņečajeva J., Samsone I., Ievinsh G. 2011. The use of nondestructive methods to assess a physiological status and conservation perspectives of *Eryngium maritimum* L. – Journal of Coastal Conservation, 15: 509-522.

Appezato-da-Glória B., Cury G., Soares M. K. M. 2008. Underground systems of Asteracea species from the Brazilian Cerrado. – Journal of the Torrey Botanical Society, 135: 103-113.

Arora K., Sharma M., Srivastava J., Ranade S. A., Sharma A. K. 2010. In vitro cloning of *Azadirachta indica* from root explants. – Biologia Plantarum, 55: 164-168.

Atta R., Laurens L., Boucheron-Dubuisson E., Guivarc'h A., Carnero E., Giraudat-Pautor V., Rech P., Chirqui D. 2009. Pluripotency of *Arabidopsis* xylem pericycle underlies shoot regeneration from root and hypocotyls explants grown in vitro. – The Plant Journal, 57: 626-644.

Aviziene D., Pakalnis R., Sendzikaite J. 2008. Status of red-listed species *Eryngium maritimum* L. on the Lithuanian coastal dunes. Environmental Engineering. Proceeding of the 7th International Conference, May 22–28, 2008. Vilnius Gediminas Technical University, pp. 22-28.

Bairu M. W., Stirk W. A., Doležal K., van Staden J. 2008. The role of topolins in micropropagation and somaclonal variation of banana cultivars “Williams” and “Grand Naine” (*Musa* spp. AAA). – Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 95: 373-379.

Baroniņa V., Cepurīte B., Cinovskis R., Eglīte Z., Fatāre I., Gavrilova G., Kabucis I., Rēriha I., Šmite D., Šulcs V., Tabaka L. 2003. Latvijas Sarkanā grāmata. 3. daļa. Vaskulārie augi. Rīga: LU Bioloģijas institūts, 691.lpp. (278 lpp)

Barry A., Cohen S. 2013. Quality assessment of genomic DNA degradation. – Genetic Engineering & Biotechnology News, 33: 16.

Bednarek P. T., Orłowska R. 2020. Plant tissue culture environment as a switch-key of (epi)genetic changes. – Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 140: 245-257.

Bosela M. J., Ewers F. W. 1997. The mode of origin of root buds and root sprouts in the clonal tree *Sassafras albidum* (Lauraceae). – American Journal of Botany, 84: 1466-1481.

Botstein D., White R. L., Skolnick M., Davis R. W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. – American Journal of Human Genetics, 32: 314-331.

Braune W., Leman A., Taubert H. 1999. *Pflanzenanatomisches Praktikum I*. – Akademischer Verlag, Heidelberg. 368 S.

- Brumlop S., Finckh M. R. 2011. Applications and potentials of marker assisted selection (MAS) in plant breeding. – Federal Agency for Nature Conservation.
- Bumbura M., Jaudzeme V., Muižarāja E., Pētersone A. (1967). Augu morfoloģija un anatomija. Izdevniecība “Zvaigzne”, Rīga, 449 lpp. (27–39 lpp)
- Capy P., Gasperi G., Biémont C., Bazin C. 2000. Stress and transposable elements: copecololution or useful parasites? – *Heredity*, 85: 101-106.
- Carvalho D. C., Biasi L. A. 2004. Organogenesis of Japanese persimmon from root segments. – *Ciencia Rural* 34: 1401-1406.
- Castro E. R., Manz A. 2015. Present state of microchip electrophoresis: state of the art and routine applications. – *Journal of Chromatography A*, 1382: 66-85.
- Cavrak V. V., Lettner N., Jamge S., Kosarewicz A., Bayer L. M., Scheid O. M. 2014. How a retrotransposon exploits the plant's heat stress response for its activation. – *PLOS Genetics*, 10(1): e1004115.
- Clausing G., Vickers K., Kadereit J. W. 2000. Historical biogeography in a linear system: genetic variation of Sea Rocket (*Cakile maritima*) and Sea Holly (*Eryngium maritimum*) along European coasts. – *Molecular Ecology*, 9: 1823-1833.
- Coetes D. J., Byrne M. 2005. Genetic variation in plant populations. In *plant diversity and evolutions - genotypic and phenotypic variation in higher plants*, edited by R. J. Henry, ch. 9: 139-164. Wallingford, Oxfordshire, UK: CABI Publishing.
- Curle C. M., Stabbetorp O. E., Nordal I. 2004. *Eryngium maritimum*, biology of a plant at its northernmost localities. – *Nordic Journal of Botany*, 24: 617-628.
- Curle M., Stabbetorp O. E., Nordal I. 2007. *Eryngium maritimum*, biology of a plant at its northernmost localities. – *Nordic Journal of Botany*, 24: 617-628.
- da Cruz A. C. F., Rocha D. I., Iarema L., Ventrella M. C., Costa M. G. C., Neto V. B. P., Otoni W. C. 2014. *In vitro* organogenesis from root culture segments of *Bixa orellana* L. (Bixaceae). – *In Vitro Cellular & Development Biology – Plant*, 50: 76-83.
- da Silva C. V., de Oliveira L. S., Loriato V. A. P., da Silva L. C., Campos J. M. S., Viccini L. F., de Oliveira E. J., Otoni W. C. 2011. Organogenesis from root explants of commercial populations of *Passiflora edulis* Sims and a wild passionfruit species, *P. cincinnata* Masters. – *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 107: 407-416.
- Dornelas M. C., Vieira M. L. C. 1994. Tissue culture studies on species of *Passiflora*. – *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 36: 211-217.

- Engelmann F. 1997. In vitro conservation methods. *Biotechnology and Plant Genetic Resources*. Callow J.A. ed., 119-161.
- Engelmann F., Engels J.M.M. 2002. Technologies and strategies for *ex situ* conservation. UK, Wallingford: CABI Publishing, 89-104.
- Evert R. F. 2006. *Esau's plant anatomy, meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development*, 3rd ed. Wiley, New Jersey. 624 pp.
- Fajardo V., Gonzalez I., Dooley J., Garret S., Brown H. M., Garcia T., Martin R. 2009. Application of polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphisms analysis and lab-on-a-chip capillary electrophoresis for the specific identification of game and domestic meats. – *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89: 843-847.
- Fambrini M., Cionini G., Conti A., Michelotti V., Pugliesi C. 2003. Origin and development in vitro of shoot buds and somatic embryos from intact roots of *Helianthus annuus* X *H. Tuberosus*. – *Annals of Botany*, 92: 145-151.
- Feschotte C., Jiang N., Wessler S. R. 2002. Plant transposable elements: where genetics meets genomics. – *Nature Reviews Genetics*, 3: 329-341.
- Feschotte C. 2008. Transposable elements and the evolution of regulatory networks. – *Nature Reviews Genetics*, 9: 397-405.
- Franklin G., Sheeba C. J., Sita G. L. 2004. Regeneration of eggplant (*solanum melongena* L.) from root explants. – *In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 40: 188-191.
- Gailīte A. 2012. Fizioloģiskie un ģenētiskie aspekti Iguanijas rūgtlapes (*Saussurea esthonica*) saglabāšanā. Promocijas darbs. Rīga, Latvijas Universitāte, 93 lpp.
- Galenieks P. 1953 – 1959. Latvijas PSR flora, 4. sējums. Rīga: Latvijas Valsts Izdevniecība, 524 lpp.
- Gao D., Jiang N, Wing R. A., Jiang J., Jackson S. A. 2015. Transposons play an important role in the evolution and diversification of centromeres among closely related species. – *Frontiers in Plant Sciences*, 6: 216.
- Gentile A., Gutierrez M. J., Martinez J., Frattarelli A., Nota P., Caboni E. 2014. Effect of *meta*-Topolin on micropropagation and adventitious shoot regeneration in *Prunus* rootstocks. - *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 118: 373-381.
- George E.F. 1993. *Plant propagation by tissue culture Part 1 The Technology*. Great Britain: Butler & Tanner Ltd, 3-4. 514 pp.

Gimenez M. D., Yanez-Santos A. M., Paz R. C., Quiroga M. P., Marfil C. F., Conci V. C., Garcia-Lampasona S. C. 2016. Assessment of genetic and epigenetic changes in virus-free garlic (*Allium sativum* L.) plants obtained by meristem culture followed by in vitro propagation. – Plant Cell Reports, 35(1): 129-41.

Gonzalez-Benito M. E., Martin C. 2011. *In vitro* preservation of Spanish biodiversity. – In Vitro Cellular & Development Biology – Plant, 47: 46-54.

Gozukirmizi N., Yilmaz S., Marakli S., Temel A. 2015. Retrotransposon-based molecular markers; tools for variation analysis in plants. – Applications of Molecular Markers in Plant Genome Analysis and Breeding, 2015: 19-44.

Grandbastien M. A. 2015. LTR retrotransposons, handy hitchhikers of plant regeneration and stress response. – Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Gene Regulatory Mechanisms, 1849: 403-416.

Grandbastien M. A., Spielmann A., Caboche M. 1989. Tnt1, a mobile retroviral-like transposable element of tobacco isolated by plant cell genetics. – Nature, 337: 376-380.

Handayani S., Yunus I., Sayuti M., Irawan E. 2019. In-vitro callus induction of durian (*Durio zibethinus* Murr.) leaves using kinetin and 2,4-D (dichlorophenoxyacetic acid). – Journal of Tropical Horticulture, 2: 59-64.

Hayashi A. H., Penha A. S., Rodrigues R. R., Appezzato-da-gloria B. 2001. Anatomical studies of shoot bud-forming roots of Brazilian tree species. – Australian Journal of Botany, 49: 745-751.

Hayashi A. H., Appezzato-da-Gloria B. 2007. Anatomy of the underground system in *Venonia grandiflora* Less. and *V. brevifolia* Less. (Asteraceae). – Brazilian Archives of Biology and Technology, 50: 979-988.

Hill M.O., Ellenberg H.H. 1999. Ellenberg's indicator values for British plants. ECOFACT Research Report. Volume 2: Technical Annex. Institute of Terrestrial Ecology.

Hirochika H. 1993. Activation of tobacco retrotransposons during tissue culture. – The EMBO Journal, 12: 2521-2528.

Hohtola A. 2010. Bioactive compounds from northern plants. – Advances in Experimental Medicine and Biology, 698: 99-109.

Holobiuc I., Rodica B. 2008. *In vitro* culture of the protected rare species *Gentiana lutea* L. for conservative purpose. – Contributii Botanice, 45: 125-134.

Hulten E., Fries M. 1986. Atlas of North European vascular plants north of the tropic of Cancer. – Koeltz Scientific Book, Königstein.

Idrees M., Irshad M. 2014. Molecular markers in plant for analysis of genetic diversity: a review. – European Academic Research, 2: 1513-1540.

Ieviņa B., Syed N. H., Flavell A. J., Ievinsh G., Rostoks N. 2010. Development of retrotransposon-based SSAP molecular marker system for study of genetic diversity in sea holly (*Eryngium maritimum* L.). – Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization, 8: 258-266.

Ieviņa B., Rostoks N., Syed N. H., Flavell A. J., Ievinsh G. 2019. Genetic diversity and structure of northern populations of the declining coastal plant *Eryngium maritimum*. – Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, Section B: Natural, Exact and Applied Sciences, 73: 446-454.

Ievinsh G., Andersone-Ozola U., Samsone I. 2020. Demographics of an endangered coastal plant, *Eryngium maritimum*, near the northeast border of the distribution range in relation to clonal growth. – Environmental and Experimental Biology, 18: 117-127.

Iserman M., Rooney P. 2014. Biological flora of the British Isles: *Eryngium maritimum*. – Journal of Ecology, 102: 789-821.

Iwasato M., Nagamatsu D. 2018. Plant species diversity and habitat conditions in a protected large coastal dune area of western Japan. – Landscape and Ecological Engineering, 14: 99-113.

Jafari N., Othman R. Y., Khalid N. 2011. Effect on benzylaminopurine (BAP) pulsing *in vitro* shoot multiplication of *Busa acuminata* (banan) cv. Berangan. – African Journal of Biotechnology, 10: 2446-2450.

Jensen M. 2003. Nested multiplex polymerase chain reaction for the determination of DNA from genetically modified corn and soy beans using Agilent 2100 Bioanalyzer. - Agilent Technologies, [www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem).

Jiang C., Mithani A., Gan X., Belfield E., Klinger J. P., Zhu J. K., Ragoussis J., Mott J., Harberd N. P. 2011. Regenerant *Arabidopsis* lineages display a distinct genome-wide spectrum of mutations conferring variant phenotypes. – Current Biology, 21: 1385-1390.

Johns M. A., Mottinger J., Freeling M. 1985. A low copy number, copia-like transposon in maize. – EMBO Journal, 4: 1093-101.

Kadereit J. W., Westberg E. 2007. Determinants of phylogeographic structure: a comparative study of seven coastal flowering plant species across their European range. – Watsonia, 26: 229-238.

Kaeppler S. M., Kaeppler H. F., Rhee Y. 2000 Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. – *Plant Molecular Biology*, 43: 179-188.

Kalendar R., Grob T., Regina M., Souniemi A., Schulman A. 1999. IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. – *Theoretical and Applied Genetics*, 98: 704-711.

Kalendar R., Antonius K., Smykal P., Schulman A. H. 2010. iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. – *Theoretical and Applied Genetics*, 121: 1419-1430.

Kalendar R., Flavell A. J., Ellis T. H. N., Sjakste T., Moisy C., Schulman A. H. 2011. Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers. – *Heredity*, 106: 520-530.

Kasajima I., Sasaki K., Tanaka Y., Terakawa T., Ohtsubo N. 2013. Large-scale extraction of pure DNA from mature leaves of *Cyclamen persicum* Mill. and other recalcitrant plants with alkaline polyvinylpyrrolidone (PVPP). – *Scientia Horticulturae*, 164: 65-72.

Kikowska M., Thiem B., Sliwinska E., Rewers M., Kowalczyk M., Stochmal A., Oleszek W. 2014. The effect of nutritional factors and plant growth regulators on micropropagation and production of phenolic acids and saponins from plantlets and adventitious root cultures of *Eryngium maritimum*. – *Journal of Plant Growth Regulation*, 33(4): 809-819.

Kļaviņa D., Gailīte A., Ievinsh G. 2006. Initial responses from rare and endangered coastal plant species during initiation of tissue culture. – *Acta Universitatis Latviensis*, 710: 81-91.

Krishna H., Alizadeh M., Singh D., Singh U., Chauhan N., Eftekhari M., Sadh R. K. 2016. Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. – *3 Biotech*, 6:54.

Kumar A., Bennetzen J. L. 1999. Plant retrotransposons. – *Annual Review of Genetics*, 33: 479-532.

Labuz T. A. 2007. Evaluation of past and present Sea Holly (*Eryngium maritimum*) habitats on Polish coastal dunes. – *Acta Universitatis Latviensis*, 723: 99-114.

Lee H., Zhang Z., Krause H. 2019. Long noncoding RNAs and repetitive elements: junk or intimate evolutionary partners? – *Trends in Genetics*, 35: 892-902.

Le T. N., Miyazaki Y., Takuno S., Saze H. 2015. Epigenetic regulation of intragenic transposable elements impacts gene transcription in *Arabidopsis thaliana*. – *Nucleic Acids Research*, 43(8): 3911-3921.

Liang H., Xiong Y., Guo B., Yan H., Jian S., Ren H., Zhang X., Li Y., Zeng S., Wu K., Zheng F., Teixeira da Silva J. A., Xiong Y., Ma G. 2020. Shoot organogenesis and somatic embryogenesis from leaf and root explants of *Scaevola sericea*. – Scientific Reports, 10: 11343.

Lieberman A. S., O'Neill C. R. 1988. Vegetation use in coastal ecosystems. – Information Bulletin (Cornell Cooperative Extension Publication), 198: 1-31.

Lindman C. 1900. Vegetationen i Rio Grande do Sul (Sydbrasilien). – Nordin & Josephson, Stockholm. 239 pp.

Levin N., Kidron G. J., Ben-Dor E. 2008. A field quantification of coastal dune perennial plants as indicators of surface stability, erosion or deposition. – Sedimentology, 55: 751-772.

Lopes-Mattos K. L. B., Azevedo A. A., Soares A. A., Meira R. M. S. A. 2013. Underground system of *Mandevilla atrovioleacea* (Stadelm.) Woodson (Apocynaceae, Apocynoideae) from the Brazilian high-altitude grassland. – South African Journal of Botany, 87: 27-33.

Madhulatha P., Anbalagan M., Jayachandran S., Sakthivel N. 2004. Influence of liquid pulse treatment with growth regulators on *in vitro* propagation of banana (*Musa* spp. AAA). – Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 76: 189-191.

Marwal A., Gaur R. K. 2020. Molecular markers: tool for genetic analysis. – Animal Biotechnology, 18: 353-372.

McClintock B. 1984. The significance of responses of the genome to challenge. – Science, 226: 792-801.

Megre D., Kondratovičs U., Grāve I. 2004. Graft union formation in elepidote rhododendrons. – Acta Universitatis Latviensis, 676: 71-77.

Minasiewicz J., Borzyszkowska S., Zolkos K., Bloch-Orlowska J., Afranowicz R. 2011. Population genetic structure of the rare species *Eryngium maritimum* L. (Apiaceae) on the Gulf of Gdansk: Implications for conservation and management. – Biodiversity and Conservation, 24: 39-48.

Miranda T. D., Palhares D., Cury N. F., Pereira L. A. R., Silveira C. E. D. S. 2018. Comparative wood and bark anatomy of stem, root and xylopodium of *Jacaranda ulei* (Bignoniaceae). – Balduinia, 64: 01-18.

Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. – Physiologia Plantarum, 15: 473-497.

Narum S. R., Buerkle C. A., Davey J. W., Miller M. R. 2013. Genotyping-by-sequencing in ecological and conservation genomics. – Molecular Ecology, 22: 2841-2847.

- Necajeva J., Ievinsh G. 2013. Seed dormancy and germination of an endangered coastal plant *Eryngium maritimum* (Apiaceae). – Estonian Journal of Ecology, 62: 150-161.
- Neumann K., Kumar A., Imani J. 2009. Plant cell and tissue culture – a tool in biotechnology: basics and application. – Springer Berlin, Heidelberg. 333 pp.
- Olšauskas A. 1996. Influence of recreation on plant cover in west Lithuania. – Klaipėdas universitāte, Klaipėda, Lietuva.
- Olšauskas A. M., Urbonienė R. 2008. State of *Eryngium maritimum* L. population on the Curonian Spit coastal dunes. Environmental Research, Engineering and Management, 2: 69-74.
- Padutov V. E., Baranov O. Y., Voropaev E. V. Molecular genetic analysis methods; Unipol: Minsk, Belarus, 2007; 176 pp.
- Panaro N. J., Yuen P. K., Sakazume T., Fortina P., Kricka L. J., Wilding P. 2000. Evolution of DNA fragment sizing and quantification by the Agilent 2100 Bioanalyzer. – Clinical Chemistry, 46: 1851-1853.
- Park S., Ahn J., Lee W., Murthy H. N., Paek K. Y. 2005. Mass production of *Eluetherococcus koreanum* plantlets via somatic embryogenesis from root cultures and accumulation of eleutherosides in regenerants. – Plant Science, 168: 1221-1225.
- Peakall R., Smouse P. E. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population software for teaching and research – an update. – Bioinformatics, 28: 2537-2539.
- Peres L. F. P., Morgante P. G., Vechi C. A., Kraus J. E., Van Sluys M. A. 2001. Shoot regeneration capacity from roots and transgenic hairy roots of different tomato cultivars and wild related species. – Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 65: 37-44.
- Peschke V., Phillips R., Gengenbach B. 1987. Discovery of transposable element activity among progeny of tissue culture-derived maize plants. – Science, 238: 804-807.
- Picard C., Ponsionnet C., Paget E., Nesme X., Simonet P. 1992. Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. – Applied and Environmental Microbiology, 58: 2717-2722.
- Priedītis N. Latvijas augi. 2014. Rīga: Gandrs, 888 lpp. (390.lpp)
- Rocha D. I., Vieira L. M., Tanaka F. A. O., da Silva L. C., Otoni W. C. 2012. Anatomical and ultrastructural analyses of in vitro organogenesis from root explants and commercial passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). – Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 111: 69-78.

Rosa Y. B. C. J., Monte-Bello C. C., Dornelas M. C. 2016. *In vitro* organogenesis and efficient plant regeneration from root explants of *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae). – *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 52: 64-71.

Rubio-Piña J. A., Zapata-Perez O. 2011. Isolation of total RNA from tissues rich in polyphenols and polysaccharides of mangrove plants. – *Electronic Journal of Biotechnology*, 14: 10.

Rungis D., Voronova A., Kokina A., Veinberga I., Skrabule I., Rostoks N. 2017. Assessment of genetic diversity and relatedness in the Latvian potato genetic resources collection by DArT genotyping. – *Plant Genetic Resources*, 15: 72-78.

Ružić D. V., Vujović T. I. 2008. The effects of cytokinin types and their concentration on *in vitro* multiplication of sweet cherry cv. Lapins (*Prunus avium* L.). – *Horticultural Science*, 35: 12-21.

Sabot F., Picault N., El-Baidouri M., Llauro C., Chaparro C., Piegu B., Roulin A., Guiderdoni E., Delabastide M., McCombie R., Panaud O. 2011. Transpositional landscape of the rice genome revealed by paired-end mapping of high-throughput re-sequencing data. – *The Plant Journal*, 66: 241-246.

Sambrook J., Fritsch E. R., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual* (2nd ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Simoes C., Albarello N., Callado C. H., Castro T. C., Mansur E. 2009. New approaches for shoot production and establishment of *in vitro* cultures of *Cleome rosea* Vahl. – *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 98: 79-86.

Singh B. D., Singh A. K. *Marker-Assisted Plant Breeding: Principles and Practices*. 2015. New Delhi: Springer, 514 pp.

Smet I., Vanneste S., Inze D., Beeckman T. 2006. Lateral root initiation or the birth of a new meristem. – *Plant Molecular Biology*, 60: 871-887.

Skoog F., Miller C. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultures *in vitro*. – *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 11: 118-130.

Steinger T., Korner C., Schmid B. 1996. Long-term persistence in a changing climate: DNA analysis suggests very old ages of clones of alpine climate: DNA analysis suggests very old ages of clones of alpine *Varex vuvula*. – *Oecologia*, 105: 94-99.

Tautz D., Trick M., Dover G. 1986. Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. – *Nature*, 322: 652-656.

Tenaillon M. I., Hollister J. D., Gaut B. S. 2010. A triptych of the evolution of plant transposable elements. – *Trends in Plant Science*, 15: 471-478.

Tessonniere H., Vidal S., Barnavon L., Alexandre H., Remize F. 2009. Design and performance testing of a real-time PCR assay sensitive and reliable direct quantification of *Brettanomyces* in wine. – *International Journal of Food Microbiology*, 129: 237-243.

Thakuria D., Schmidt O., Siurtain M. M., Egan D., Doohan F. M. 2008. Importance of DNA quality in comparative soil microbial community structure analyses. – *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 1390-1403.

Tyler G. 1969. Regional aspects of Baltic shore-meadow vegetation. – *Vegetatio*, 19: 60-86.

Tyler T., Herbertsson L., Olofsson J., Olsson P. A. 2021. Ecological indicator and traits values for Swedish vascular plants. – *Ecological Indicators*, 120: 106923.

Vētra A. 2016. Retās un apdraudētās augu sugas jūrmalas zilpodzes (*Eryngium maritimum* L.) pavairošana in vitro un audu fenolu saturs atkarībā no barotnes sastāva. Bakalaura darbs. Rīga, Latvijas Universitāte, 45 lpp.

Vētra A. 2018. Reto un apdraudēto augu sugu jūrmalas zilpodzes (*Eryngium maritimum* L.) un jūrmalas sālsasteres (*Aster tripolium* L.) audu fenolu saturs un antioksidantu aktivitāte in vitro dzinumu kultūrā atkarībā no nitrātu un saharozes koncentrācijas barotnē. Maģistra darbs. Rīga, Latvijas Universitāte, 42 lpp.

Vila S., Gonzalez A., Rey H., Mroginski L. 2005. Plant regeneration, origin, and development of shoot buds from root segments of *Melia azedarach* L. (Meliaceae) seedlings. – *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 41: 746-751.

Vinocur B., Carmi T., Altman A., Ziv M. 2000. Enhanced bud regeneration in aspen (*Populus tremula* L.) roots cultured in liquid media. – *Plant Cell Reports*, 19: 1146-1154.

Voronova A., Rendon-Anaya M., Ingvarsson P., Kalendar R., Ruņģis D. 2020. Comparative study of pine reference genomes reveals transposable element interconnected gene networks. – *Genes*, 11: 1216.

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. – *Nucleic Acids Research*, 23: 4407-4414.

Walmsley C. A., Davy A. J. 1997. Germination characteristics of shingle beach species, effects of ageing and their implications for vegetation restoration. – *Journal of Applied Ecology*, 34: 131-142.

Wang Q. M., Wang L. 2012. An evolutionary view of plant tissue culture: somaclonal variation and selection. – *Plant Cell Reports*, 31: 1535-1547.

Waugh R., McLean K., Flavell A. J., Pearce S. R., Kumar A., Thomas B. B. T., Powell W. 1997. Genetic distribution of Bare-1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP). – *Molecular and General Genetics*, 253: 687-694.

Weising K., Nybom H., Wolff K., Kahl G. 2005. Detecting DNA variation by molecular markers. In *DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications*, Ch. 2: 21-74. 2nd ed. Boca Raton, FL: Taylor and Francis.

Werbrouck S. P. O., Strnad M., Van Onckelen H. A., Debergh P. C. 1996. *Meta*-topolin, an alternative to benzyladenine in tissue culture? – *Physiologia Plantarum*, 98: 291-297.

Wessler S. R. 1996. Plant retrotransposons: turned on by stress. – *Current Biology*, 6: 959-961.

Wessler S. R. 1998. Transposable elements and the evolution of gene expression. – *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 51: 115-122.

Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. – *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-6535.

Xing Y., Yu Y., Luo X., Zhang J. N., Zhao B., Guo Y. D. 2010. High efficiency organogenesis and analysis of genetic stability of the regenerants in *Solanum melongena*. – *Biologia Plantarum*, 54: 231-236.

Yamashita H., Tahara M. 2006. A LINE-type retrotransposon active in meristem stem cells causes heritable transpositions in the sweet potato genome. – *Plant Molecular Biology*, 61: 79-94.

Yang J. L., Seong E. S., Kim M. J., Ghimire B. K., Kang W. H., Yu C. Y., Li C. H. 2010. Direct somatic embryogenesis from pericycle cells of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *Italica*) root explants. – *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 100: 49-58.

Zhang K., Wu Y., Hang H. 2019. Differential contributions of  $\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+$  to nitrogen use in response to a variable inorganic nitrogen supply in plantlets of two Brassicaceae species in vitro. – *Plant Methods*, 15:86.

Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. – *Genomics*, 20: 176-183.

Żółkoś K., Afranowicz R., Bloch-Orłowska J., Koziel K. 2007. Distribution and the resources of Sea Holly (*Eryngium maritimum* L.) on the western shore of the Gulf of Gdansk. – Biodiversity and Conservation, 5-8: 55-60.

## Pielikumi

1. pielikums. 1/2 Murashige & Skoog (MS) barotnes sastāvs.

Annex 1. Composition of tissue culture medium – 1/2 MS. (Murashige, Skoog 1962)

(no duchefa biochemie)

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	975 mg
KNO <sub>3</sub>	800 mg
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	440 mg
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	370 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170 mg
Na <sub>2</sub> x EDTA	37,3 <sup>1</sup> mg
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	27,8 <sup>1</sup> mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2 mg
MnSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O	22,3 mg
ZnSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O	8,6 mg
KI	0,83 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,25 mg
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,025 mg
CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,025 mg
Saharoze	20 g
Agars	6 g
Glicīns	2 mg
Mezoinozīts	100 mg
Nikotīnskābe	0,5 mg
Tiamīna hlorīds	0,1 mg
Piridoksīna hlorīds	0,5 mg
pH	5,7
Destilēts ūdens	1 L

2. pielikums. Ekstrakcijā izmantoto buferu sastāvs (100 mL).

Annex 2. Compounds of buffers used for extraction (100 mL).

Ekstrakcijas buferis	
2% CTAB	2 g
1,4 M NaCl	8,19 g
0,1 M TRIS-HCL	1,21 g
20 mM EDTA	0,58 g
PVP	4 g
β-merkaptoetanolis	4 mL
Destilēts H <sub>2</sub> O	Līdz 100 mL, pH 8
5X CTAB buferis	
5% CTAB	5 g
350 mM EDTA	13 g
Destilēts H <sub>2</sub> O	Līdz 100 mL

3. pielikums. TE bufera sastāvs.

Annex 3. Compounds of TE buffer

1 M TRIS-HCL Ph8.0	1,0 mL
0,5 M EDTA	0,2 mL
H <sub>2</sub> O	98,8 mL
Kopējais tilpums	1000,0 mL

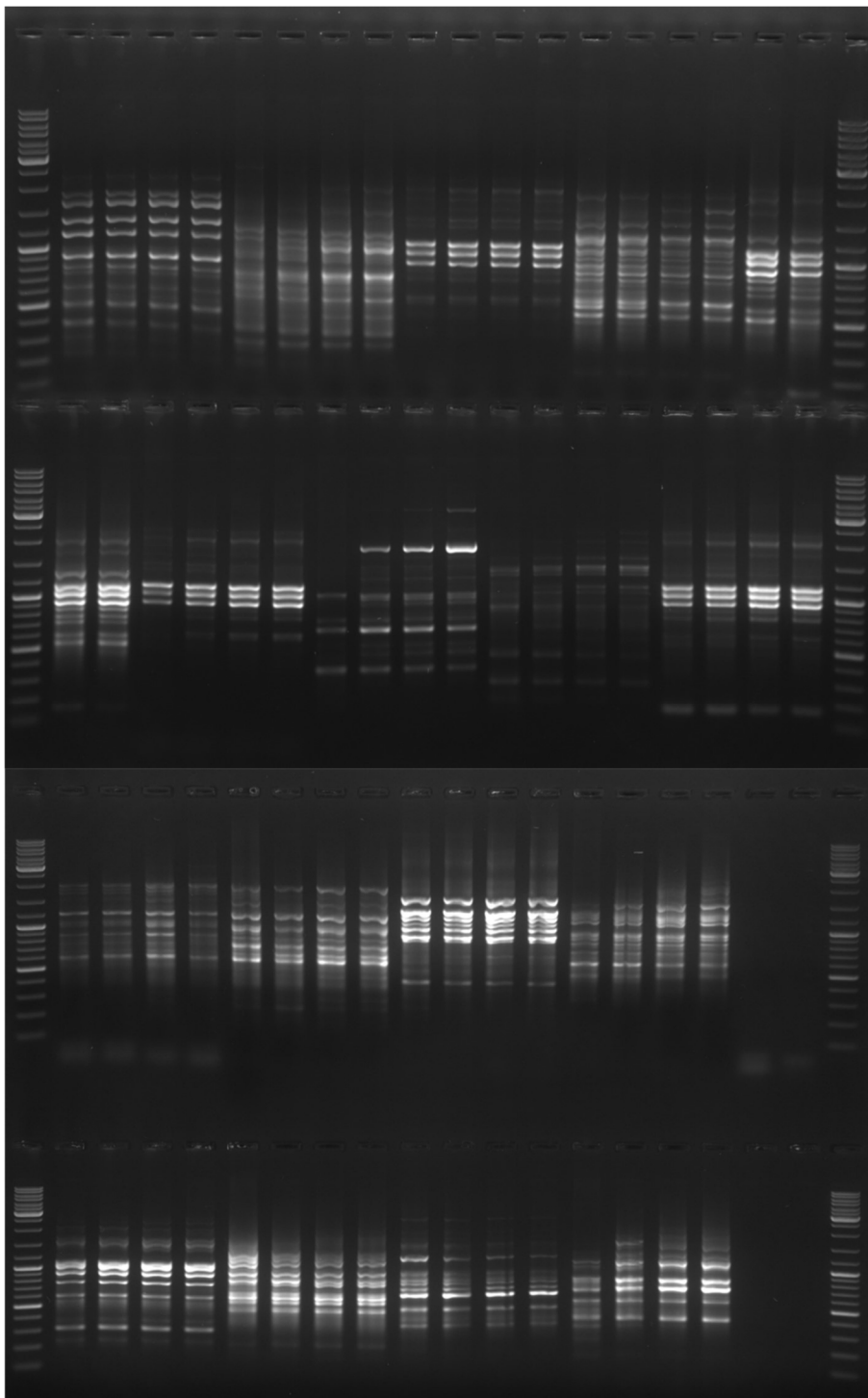
4. pielikums. TAE bufera sastāvs.

Annex 4. Compounds of TAE buffer

40 mM Tris base	4,844 g
20 mM etiķskābe	1,21 mL
1 mM EDTA	0,372 g
H <sub>2</sub> O	Līdz 1000 mL

5. pielikums. iPBS praimeru amplifikācijas pārbaude elektroforēzes gēlā.

Annex 5. Control of iPBS primer amplification on an electrophoresis gel.



6. pielikums. Darbā izmantotā aparatūra.

Annex 6. Devices used in work.

<b>Iekārta</b>	<b>Ražotājs</b>
Mastercycler EPgradient	Eppendorf, Vācija
NanoDrop8000 spektrofotometrs	ThermoFisher scientific, ASV
Centrifuge 5804	Eppendorf, Vācija
UVT-5-AR DNA/RNA UV-cleaner box	BioSan, Latvija
1-14 K centrifūga	Sigma, Vācija
Water bath WB 4	BioSan, Latvija
M-universal	MPW, Polija
Vortex V-1plus	BioSan, Latvija
Microspin FV-2400	BioSan, Latvija
Elektroforēzes vanna	Cleaver scientific, Lielbritānija
E143	Consort, Vācija
Uvitec FireReader V10	Cleaver scientific, Lielbritānija
LabChip GX Touch HT	PerkinElmer, ASV
Mixer mill MM 400	Retsch, Vācija
HT DNA 5K/RNA/CZE LabChip	PerkinElmer, ASV

7. pielikums. Darbā izmantotie reaģenti.

Annex 7. Reagents used in work.

<b>Reaģents</b>	<b>Ražotājs</b>
<i>Pfu</i> DNA Polymerase (recombinant)	Thermo Scientific, ASV
25 mM MgCl <sub>2</sub>	Thermo Scientific, ASV
10x BreamTaq buffer	Thermo Scientific, ASV
dNTP MIX	Solis BioDyne, Igaunija
DMSO	Sigma, Vācija
DreamTaq DNA Polymerase	Thermo Scientific, ASV
DNA Dye concentrate	PerkinElmer, ASV
DNA Gel Matrix	PerkinElmer, ASV
DNA Ladder	PerkinElmer, ASV
DNA marker	PerkinElmer, ASV
Chip Storage Buffer	PerkinElmer, ASV

Bakalaura darbs „Augu audu kultūru izmantošana retās piekrastes sugas *Eryngium maritimum* bioloģijas pētījumos” 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: Vendija Lazdiņa *paraksts* 20.05.2022.

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: Dr. hab. biol., prof. Ģederts Ieviņš *paraksts* 20.05.2022.

Recenzents: *paraksts* Msc. biol. Līva Purmale

Darbs iesniegts LU Bioloģijas fakultātē 20.05.2022.

Lietvede: ..... *paraksts*

Darbs aizstāvēts Bioloģijas bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē

prot. Nr.      , vērtējums

Komisijas sekretārs/e: