

Latvijas Universitāte
Bioloģijas fakultāte

Agnese Gailīte

FIZIOLOĢISKIE UN ĢENĒTISKIE ASPEKTI IGAUNIJAS
RŪGTLAPES (*SAUSSUREA ESTHONICA*) SAGLABĀŠANĀ

Promocijas darba kopsavilkums
bioloģijas doktora zinātniskā grāda iegūšanai
Apakšnozare: augu fizioloģija

Rīga, 2012

Promocijas darbs izstrādāts:



Latvijas Valsts mežzinātnes institūtā (LVMI) „Silava” no 2008.-2011. gadam.



IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ

Šis darbs izstrādāts ar Eiropas Sociālā fonda atbalstu projektā «Atbalsts doktora studijām Latvijas Universitātē» Nr.2009/01381/ IDP/1.1.2.1.2./ 09/IPIA/ VIAA/004.

Darbs sastāv no ievada, 4 nodaļām, secinājumiem, literatūras saraksta.
Darba forma: disertācija bioloģijas nozarē, augu fizioloģijas apakšnozarē.

Darba zinātniskais vadītājs: Dr. habil.biol., prof. Ģederts Ieviņš.
Zinātniskie konsultanti: Dr.biol. Dace Kļaviņa, Dr.biol. Dainis Ruņģis.

Darba recenzenti: Anita Osvalde, Dr. biol., vad. pētn., LU Bioloģijas institūts,
Nils Rostoks, Dr. biol., vad. pētn., Latvijas Universitāte,
Inga Straupe, Dr. silv., asoc. prof., Latvijas Lauksaimniecības
universitāte.

Promocijas darba aizstāvēšana notiks LU Bioloģijas nozares promocijas padomes atklātā sēdē 2012.g. 19. decembrī plkst. 14.30 LU Bioloģijas fakultātē, Kronvalda bulvārī 4, 2. klausītavā.

Ar promocijas darbu var iepazīties Latvijas Universitātes Akadēmiskās bibliotēkas filiālē, Rīgā, Raiņa bulv. 19-203.

LU bioloģijas zinātņu nozares promocijas
padomes priekšsēdētājs _____ /Dr. biol., prof. Guntis Brūmelis /

Promocijas padomes sekretāre _____ /Daina Eze/

ANOTĀCIJA

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Valsts mežzinātnes institūtā „Silava”. Darba mērķis bija veikt kompleksu pētījumu par Igaunijas rūgtlapes (*Saussurea esthonica* Baer ex Rupr.) bioloģiju, kas ietver *in vitro* kultūru, fizioloģiju, reprodukciju, ģenētisko izpēti, tā rezultātā iegūstot izpratni par aizsargājamo sugu saglabāšanai nepieciešamo bioloģiskās informācijas apjomu un izmantojamām pieejām. Lai netraucētu dabīgo populāciju, reto sugu izpētei ir svarīgi izmantot nedestruktīvās analīzes metodes. Reto augu sugu saglabāšanai paralēli saglabāšanai *in situ* nepieciešama arī *ex situ* saglabāšanas metožu optimāla izvēle un izmantošana. Augus eksperimentiem iespējams izaudzēt *in vitro* un pēc tam tos izmantot turpmākajos pētījumos, tādējādi neapdraudot dabisko populāciju. Pētīt citokinīnu ietekmi uz Igaunijas rūgtlapes proliferāciju un rizoģenēzi *in vitro* konstatēts, ka BAP ir optimāls proliferācijas inducētājam, savukārt 2-IP veicina sakņu veidošanos. Lai izprastu sugas pastāvēšanu apdraudošos faktorus, ar nedestruktīvām metodēm dabiskos apstākļos pētīta vides ietekme uz fotosintēzi raksturojošajiem parametriem. Tā kā Igaunijas rūgtlape aug kaļķainos zāļu purvos vai pļavās, tad kontrolētos apstākļos analizēta substrāta sastāva un mitruma ietekme uz fotosintēzes fotoķīmiju, tādējādi izslēdzot pārējo vides faktoru ietekmi. Reprodukcija ir viens no galvenajiem faktoriem, kas nodrošina sugas pastāvēšanu. Igaunijas rūgtlapei raksturīga gan ģeneratīvā, gan veģetatīvā vairošanās, pie kam viens augs var veidot vairākus jaunus dzinumus, kas ir svarīgi sugas pastāvēšanai, tā kā sēklu kvalitāte ir zema. Apstrāde ar GA₃ vai KNO₃ uzlabo sēklu dīgspēju. Lai prognozētu sugas spēju pielāgoties mainīgiem vides apstākļiem un līdz ar to izdzīvot ilglaicīgi, pētīta ģenētiskā daudzveidība starp Latvijas populācijām un populācijām Latvijā un Igaunijā. Abās Latvijas populācijās ģenētiskā daudzveidība ir nedaudz augstāka nekā pētītajās populācijās Igaunijā, lielākā daudzveidība bija vērojama populāciju iekšienē. Igaunijas rūgtlapi salīdzināja ar astoņām citām *Saussurea* sugām, t.sk., trim Eiropas sugām – *S. alpina*, *S. pygmaea* un *S. discolor*, izmantojot divas molekulāro marķieru tehnikas, un konstatēja, ka *S. esthonica* veido klasteri ar *S. discolor* un *S. alpina*, tādējādi norādot uz radniecību starp šīm sugām.

SATURS

Darba vispārējs raksturojums	5
1. Pētījuma teorētiskais pamatojums	8
2. Materiāls un metodes	12
3. Galvenie rezultāti	14
4. Diskusija	23
Secinājumi	30
Pateicības	31
Izmantotās literatūras saraksts	65

DARBA VISPĀRĒJS RAKSTUROJUMS

Tēmas aktualitāte, darba mērķi un uzdevumi

Pastāv viedoklis, ka globālo klimata izmaiņu gaitā var pazust 20 līdz 30% no šobrīd zināmajām sugām un iespējama vietējo sugu biotopu samazināšanās. Tā kā tas rada ģenētiskās erozijas draudus, nepieciešami pētījumi, kas palīdzētu izprast pieejas un nepieciešamos pasākumus bioloģiskās daudzveidības saglabāšanai gan ekosistēmas, gan starpsugu, gan populāciju līmenī. Tāpēc galvenajos bioloģiskās daudzveidības saglabāšanas plānošanas dokumentos viens no noteiktajiem pamatuzdevumiem ir globālās bioloģiskās daudzveidības saglabāšana, izpēte un izmantošana.

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

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

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

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

Mērķa sasniegšanai izvirzīti sekojoši uzdevumi:

- 1) veikt sugas saglabāšanas *in vitro* pētījumus, īpašu uzmanību pievēršot citokinīnu ietekmei uz proliferāciju un rizoģenēzi;
- 2) trīs sezonu garumā veikt fizioloģiskos pētījumus dabiskos augšanas apstākļos, izmantojot nedestruktīvās analīzes metodes;

- 3) vadoties no pētījumu rezultātiem, realizēt fizioloģiskos eksperimentus kontrolētos apstākļos;
- 4) analizēt izvēlētās sugas vairošanās potenciālu, veicot sēklu dīgtspējas pētījumus, sēklu kvalitātes un nepieciešamos apstākļu, kas nodrošina optimālu dīgtspēju, noteikšanai, kā arī, analizēt veģetatīvo reprodukciju;
- 5) analizēt sugas populāciju ģenētisko daudzveidību un veikt vairāku *Saussurea* sugu salīdzinošo ģenētisko analīzi.

Aizstāvēšanai izvirzītās tēzes

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

Īss metožu raksturojums

Izmantotas augu mikroklonālās pavairošanas metodes – ievadīšana *in vitro*, pavairošana (proliferācija), apsākšana un izstādīšana *ex vitro*. Analizēta dažādu *Saussurea* sugu sēklu dīgtspēja *in vitro* un pēc tam iegūtie augi izmantoti ģenētiskajos pētījumos. Noskaidrota citokinīnu ietekme uz proliferāciju un rizoģenēzi, augi savairoti fizioloģiskajiem pētījumiem kontrolētos apstākļos.

Fizioloģiskajiem pētījumiem dabiskajos un kontrolētajos apstākļos izmantoti hlorofila un hlorofila *a* fluorescences mērījumi, lai ar nedestruktīvām metodēm noteiktu ar fotosintēzi saistītos rādītājus, kas raksturo izmaiņas fotoķīmiskajos procesos.

Dīgtspējas pētījumiem dažādos apstākļos izmantots klasiskais dīgtspējas tests Petri traukos uz filtrpapīra.

Ģenētiskajos pētījumos izmantotas AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), iPBS (*Inter-Primer Binding Sites*) un ITS (*Internal Transcribed Spacer*) molekulāro marķieru tehnikas. AFLP un iPBS izmantoti ģenētiskās daudzveidības pētījumos, ITS un iPBS - filoģenētiskajos pētījumos.

Ar darbu saistīto publikāciju saraksts

Gailīte A., Rungis D. 2012. An initial investigation of the taxonomic status of *Saussurea esthonica* Baer ex Rupr. utilising DNA markers and sequencing. *Plant Systematics and Evolution* 298 (5): 913-919.

Gailīte A., Ievinsh G., Ruņģis D. 2011. Genetic diversity analysis of Latvian and Estonian *Saussurea esthonica* populations. *Environmental and Experimental Biology* 9: 115–119.

Gailīte A., Kļaviņa D., Ievinsh G. 2010. *In vitro* propagation of an endangered plant *Saussurea esthonica*. *Environmental and Experimental Biology* 8: 43–48.

Gailīte A., Ruņģis D., Ieviņš Ģ. 2010. Preliminary studies on the genetic diversity of an endemic and endangered species *Saussurea esthonica* Baer ex Rupr. in Latvia. *Acta Biol. Univ. Daugavp.* 10 (1): 37-42.

Iesniegšanai sagatavota publikācija. Gailīte A., Ievinsh G. Understanding reproductive potential for species conservation: *Saussurea esthonica* in Latvia. *Annales Botanici Fennici*.

Konferences, kur darbs apspriests, tajās publicētās tēzes

Promocijas darba rezultāti prezentēti 5 starptautiskajās un 3 nacionālā līmeņa zinātniskajās konferencēs.

Gailite A., Rungis D. 2012. Genetic diversity of Latvian and Estonian *Saussurea esthonica* populations and phylogenetic comparison with *S. alpina* and *S. discolor*. 5th Baltic Congress of Genetics. Kauņa, Lietuva. Book of Abstracts 33-34.

Gailite A., Karlsons A., Ievinsh G. 2012. Ecophysiology of *Saussurea esthonica*: changes of growth and photochemistry of photosynthesis in respect to mineral nutrition and soil moisture. Plant Biology Congress, Freiburga, Vācija. Book of Abstracts 505-506.

Gailīte A., Ieviņš Ģ. 2012. Igaunijas rūgtlapes (*Saussurea esthonica*) ekofizioloģija: minerālās barošanās un augsnes mitruma ietekme. LU 70. konference Rīga, Latvija.

Gailīte A., Kļaviņa D. 2011. *In vitro* seed germination capacity of *Saussurea* species. Starptautiskā zinātniskā konference „Advances in Plant Biotechnology in Baltic Sea Region“ Kauņa, Lietuva. Abstract Book 51-52.

Gailīte A. 2011. Factors influencing seed germination of *Saussurea esthonica* Baer ex Rupr. 6. starptautiskā konference “Research and Conservation of Biological Diversity in Baltic Region” Daugavpils, Latvija. Book of Abstracts 49. lpp.

Gailīte A., Ruņģis D. 2011. Igaunijas rūgtlapes ģenētiskās daudzveidības izpēte. LU 69. konference Rīga, Latvija.

Gailīte A., Andersone U., Samsone I., Ruņģis D., Ieviņš Ģ. 2010. Ar fotosintēzi saistīto parametru dinamika Igaunijas rūgtlapes lapās dažādās augšanas vietās dabiskos apstākļos. LU 68. konference Rīga, Latvija.

Gailīte A., Ruņģis D., Ieviņš Ģ. 2009. Preliminary studies on the genetic diversity of an endemic and endangered species *Saussurea esthonica* Baer ex Rupr. in Latvia. 5. starptautiskā konference “Research and Conservation of Biological Diversity in Baltic Region” Daugavpils, Latvija. Book of Abstracts 42. lpp.

Darba apjoms un struktūra

Promocijas darba apjoms ir 93 lpp. Darbā ietvertas 19 tabulas un 35 attēli. Darbs sastāv no ievada, 4 nodaļām (Literatūras apskats, Materiāls un metodes, Rezultāti un Diskusija). Darba nobeigumā formulēti 11 secinājumi. Darbā izmantoti 205 literatūras avoti.

1. PĒTĪJUMA TEORĒTISKAIS PAMATOJUMS

1.1. Sugas vispārīgais raksturojums un stāvoklis Latvijā

Igaunijas rūgtlape [*S. esthonica* Baer ex Rupr., *S. alpina* (L.) DC. subsp. *esthonica* (Baer ex Rupr.) Kupffer, *S. alpina* auct.] ir daudzgadīgs kurvjziežu (*Compositae*) dzimtas lakstaugs, ziedi ir divdzimuma stobrziedi, sakārtoti kurvīšos (Andrušaitis 2003). *Saussurea* ģintī ir ap 400 sugu un ģints izcelsmes centrs ir Centrālā un Austrumāzija, izplatības rietumu spārns ir Rietumeiropa un austrumu spārns – Ziemeļamerika (Lipschitz 1979). Igaunijas rūgtlape sastopama Baltijas reģionā - Latvijā, Sanktpēterburgas apkārtnē un Igaunijā (iekļauta Baltijas reģiona Sarkanajā grāmatā) (Ingelög *et al.* 1993). Suga iekļauta Latvijas Sarkanajā grāmatā (1. kategorija, statuss – izzūdoša suga), Eiropas Savienības direktīvas „Par dabisko biotopu, savvaļas augu un dzīvnieku sugu aizsardzību” (92/43 EEC) II pielikumā un Nacionālajā vides (bioloģiskās daudzveidības) monitoringa programmā (Kļaviņa *et al.* 2004). No 1930. līdz 1991. gadam tika uzskatīts, ka populācija Latvijā izzudusi. Tomēr 1991. gadā izdevās atrast 1884. gadā konstatēto atradni, kā arī atrast jaunu (Andrušaitis 2003). Šobrīd Latvijā zināmas divas atradnes – Apšuciema un Popes apkārtnē (Andrušaitis 2003). Suga iekļauta Nacionālā Botāniskā dārza reto un apdraudēto augu kolekcijā (gan *in vitro*, gan lauka kolekcijā) (Kļaviņa, Šmite 2009). Eiropas vaskulāro augu Sarkanajā sarakstā suga apzīmēta kā taksons, par kuru nav pietiekošu datu (Bilz *et al.* 2011).

Daži autori Igaunijas rūgtlapi neizdala kā atsevišķu sugu, bet gan kā Alpu rūgtlapes pasugu (*S. alpina* subsp. *esthonica* (Baer ex Rupr.) Kupff.) (Narits *et al.* 2000; Kell *et al.* 2005). Alpu rūgtlape ir arktu-alpīnais augs (Stevanović *et al.* 2009) ar plašu izplatības areālu – no Ķīnas līdz Centrālajai un Ziemeļeiropai, aug alpīnajās stepēs, klinšainās un akmeņainās nogāzēs (Lipschitz 1979; Shi *et al.* 2011). Kultūraugu savvaļas radnieku informatīvajā sistēmā Alpu rūgtlapei izdala četras pasugas - *S. alpina* subsp. *alpina*, *S. alpina* subsp. *depressa* un *S. alpina* subsp. *macrophylla*, *S. alpina* subsp. *esthonica* (Kell *et al.* 2005). Eiropā sastopamo ģints pārstāvju skaits dažādos literatūras avotos ir atšķirīgs. Tiek minētas 3-9 vai vairāk sugas (Dickore 2001, Narits *et al.* 2000).

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

In vitro metodes lieto augu banku veidošanai, kā arī sugām ar vāju reprodukcijas spēju (Paunescu 2009). Izmantojot *in vitro* saglabāšanas metodes, iespējams saglabāt daudz sugu mazā laukuma vienībā, kā arī atjaunot dabiskās populācijas (Edson *et al.* 1997).

In vitro kolekcijas izveidē izšķir sekojošus posmus: eksplanta dezinfekcija un ievadīšana *in vitro*, kultivēšana (uzturēšana) un pavairošana, ilgtermiņa saglabāšana (Paunescu 2009). Ja augus izmanto reintrodukcijai vai ekspozīciju veidošanai botāniskajos dārzos, tad beigu posmi ir apsākšana un izstādīšana *ex vitro*. Katram no šiem posmiem ir vairāki būtiski priekšnoteikumi, lai veiksmīgi uzturētu un attīstītu *in vitro* kultūru. Reto augu kolekciju veidošanai parasti iesaka par eksplantiem izmantot sēklas, tādējādi nodrošinot ģenētiskās daudzveidības saglabāšanos, tomēr dažām sugām sēklas var nebūt pieejamas un tad izmanto citas auga daļas (Fay 1992).

Literatūrā ir dati par dažu *Saussurea* sugu pavairošanu ar audu kultūru metodi (Arora, Bhojwani 1989; Guo *et al.* 2007; Dhar, Joshi 2005), taču aprakstītā metode ietver augu pavairošanu izmantojot kallusa kultūras, kuras nav ieteicamas reto augu saglabāšanai (Fay 1992).

Kā pamatbarotni galvenokārt lieto MS (Murashige & Skoog 1962) barotni ar dažādām modifikācijām (Fay 1992; Holobiuc, Blindu 2007; Kļaviņa *et al.* 2004; Paunescu 2009; Sarasan *et al.* 2006). No fitohormoniem barotnēm galvenokārt pievieno auksīnus un/vai citokinīnus. Arī pārējie fitohormoni – abscīzskābe, etilēns un giberelīni ir būtiski audu kultūrās, tomēr daudzos gadījumos tos papildus nepievieno, jo tie sintezējas audos, kur aktīvi, bet netieši veic regulatoro lomu (Gaspar *et al.* 1996). Citokinīnus plaši lieto audu kultūrās, lai stimulētu šūnu dalīšanos, adventīvo pumpuru un dzinumumu veidošanos un sakņu morfoģenēzi (Gaspar *et al.* 1996; Subotić *et al.* 2009). Tie reducē primāro sakņu augšanu un laterālo sakņu daudzumu (Laplaze *et al.* 2007). Citokinīnu loma sakņu morfoģenēzē nav skaidri zināma, tomēr to klātbūtnē mainās sakņu struktūra (Kuroha, Satoh 2007). Sakņu garums un diametrs ir galvenie lielumi, lai aprakstītu un salīdzinātu sakņu sistēmas (Bouma *et al.* 2000), tāpēc tos var lietot dažādu augšanas regulatoru radītā efekta raksturošanai. Optimālākā katra fitohormona koncentrācija ir atkarīga gan no auga, gan kultivēšanas apstākļiem, gan konkrētā fitohormona. Salīdzinoši augstās koncentrācijās citokinīni var sekmēt somaklonālo izmaiņu rašanos (Chuenboonngarm *et al.* 2001), tāpēc reto augu kultivēšanai nepieciešams atrast optimālas citokinīnu koncentrācijas.

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

Aizsargājamo sugu pētīšanai *in situ* svarīgi lietot nedestruktīvas metodes, lai netraumējot augus, iegūtu informāciju par auga fizioloģisko stāvokli, kuru nosaka auga ģenētiskās, augšanas un attīstības īpatnības. Pie šādām metodēm pieder hlorofila fluorescences un hlorofila satura mērīšana ar optiskajām metodēm, kas ir nozīmīgas bioloģiskās daudzveidības izpētē, t.sk., savvaļas augu ekofizioloģijas pētīšanā *in situ* (Mohammed *et al.* 2003; Samsone *et al.* 2007), jo tādējādi iegūst informāciju par hlorofila saturu un izmaiņām fluorescencē un līdz ar to izmaiņām fotoķīmiskajos procesos. Abas metodes ļauj atkārtoti, ilgākā laika periodā netraumējot augus pētīt ar fotosintēzi saistītos procesus.

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

Hlorofila fluorescences ir ļoti jutīga reakcija un to ietekmē lapu fizioloģiskais stāvoklis, līdz ar to, var ātri novērtēt individuālā auga stāvokli. Izmaiņas fluorescences rādītājos parādās karstuma, aukstuma, sausuma, applūšanas, minerālelementu, substrāta īpašību (sāļuma) ietekmē (Sayed 2003; Baker, Rosenqvist 2004).

1.4. Minerālelementu ietekme uz savvaļas augu augšanu

Minerālvielu pieejamība, uzņemšana un akumulācija augā atkarīga gan no vides, gan augsnes faktoriem (Osvalde 2011). Minerālelementu uzņemšana caur saknēm atkarīga no sakņu morfoloģiskajiem (skaita, garuma, blīvuma), fizioloģiskajiem (sakņu / dzinumu attiecības, sakņu mikroorganismu ietekmes, ūdens uzņemšanas spējas), bioķīmiskajiem parametriem un minerālelementu spējas virzīties difūzijas vai ūdensplūsmas veidā (Baligar *et al.* 2001). Minerālelementi darbojas kā antagonisti vai sinerģisti un viena elementa pārbagātība vai nepietiekamība augā var izsaukt cita elementa koncentrācijas izmaiņas (Osvalde 2011).

Kaļķainās augsnēs augošie augi ir adaptējušies augstajam kalcija saturam augsnē, un apiet pārmērīgu kalcija uzņemšanu lapās, tiem kalcija klātbūtnē ir raksturīgs lielāks fosfora saturs lapās, nekā kalcifobiem augiem, vai augiem, kas auguši skābās augsnēs (Zohlen, Tyler 2004). Ar kalciju bagātās sausākās augsnēs kalcifilie augi labāk uzņem dzelzi, cinku un kalciju, savukārt mitrākās – kāliju, magniju, mangānu un fosforu, tomēr tas atkarīgs no auga sugas (Misra, Tyler 1999).

Augsnē sastopami arī smagie metāli, kas pat ļoti mazās koncentrācijās augiem ir toksiski. Šo elementu toksiskums izpaužas šūnu membrānu caurlaidības izmainīšanā, reaģējot ar metabolītiem vai nomainot elementus enzimatiskajās reakcijās un receptoru proteīnos. Rezultātā samazinās augu augšana, tiek bojātas saknes, samazinās arī fotosintēzes pigmentu daudzums (Fargašová 1998).

1.5. Mitruma un sausuma ietekme

Dabiskajā vidē augošie augi parasti ir piemērojušies ūdens līmeņa svārstībām, Pārmērīgu ūdens daudzumu saņemošās slikti adaptētās sugas cieš no skābekļa trūkuma audos, kas atrodas zem ūdens, kā arī uzņem anaerobo mikroorganismu radītos produktus (Mn^{2+} , Fe^{2+} , S^{2-} , H_2S , karboksilskābes) (Jackson, Colmer 2005), līdz ar to saindējot augu saknes. Samazinās citokinīnu sintēze saknēs un auga virszemes daļu apgāde ar tiem. Mitruma stresa ietekmē (augiem applūstot) samazinās hlorofila daudzums lapās (Clua *et al.* 2009; Panda *et al.* 2006), kā arī izmainās fotosintēze (Kozłowski 2002). Tomēr pret applūšanu tolerantiem augiem lapās vērojams paaugstināts hlorofila saturs (Das *et al.* 2009; Macek 2006). Dzinumu elongācija notiek samazinoties iekšējās abscīzskābes līmenim, ko radījis etilēna pieaugums, un līdz ar to palielinās giberelīnu daudzums, kā arī augu jutība pret tiem (Voesenek *et al.* 2003). Minerālo elementu (slāpekļa, fosfora un kālija) absorbcija pārmitros apstākļos samazinās (Kozłowski 2002).

Sausuma ietekmē vērojama fotoinhibēšana. Augi var izvairīties no fotoinhibēšanas samazinot gaismas absorbciju vai palielinot absorbētās gaismas pārpalikumu. Viens no veidiem ir hlorofila satura samazināšanās, kas nodrošina gaismas absorbcijas samazināšanu, nesamazinot fotoķīmisko aktivitāti. Lai apietu fotoinhibēšanu, galvenās fotoaizsargājošās atbildes kopā ar iespējamu lapas gaismas absorbcijas spējas samazināšanos, ir palielināta fotoelpošana un termālā iztvaikošana (Galmés *et al.* 2007).

1.6. Savvaļas augu sēklu dīgšana un to noteicošie faktori

Sēklu dīgšana ir nozīmīgs posms auga dzīvē, tā atkarīga no sēklu kvalitātes, vides apstākļiem un daudzos gadījumos saistīta ar miera periodu.

Sēklu dīgšanas un miera perioda mehānisms ietver abscīzskābes (inhibitors) un giberelīnu (stimulators) antagonismu. Abscīzskābe kontrolē sēklas attīstību, miera perioda uzsākšanu, savukārt giberelīni veicina un nodrošina dīgšanu (Kermonde 2005). Šie fitohormoni regulē gan miera perioda sākumu, gan uzturēšanu, gan beigas. Arī etilēns ir iesaistīts šo procesu regulācijā, galvenokārt, samazinot sēklu jutību pret endogēno abscīzskābi. Sēklu daudzums, kam nav miera perioda, kā arī miera perioda veids var variēt starp gadiem un sugas robežās, atkarībā no atrašanās vietas ziedkopā vai auglī, no apkārtējās vides ietekmes uz mātesaugu laikā, kad notiek sēklu attīstība (Baskin, Baskin 2004).

1.7. Savvaļas augu veģetatīvā vairošanās

Nereti savvaļas augiem raksturīga gan ģeneratīvā, gan veģetatīvā vairošanās. Veģetatīvās vairošanās formas ir dažādas, tās ir veidojušās sugas evolūcijas gaitā, piemērojoties specifiskiem vides apstākļiem (Klimeš, Klimešová 1999; Klimeš 2008). Pēdējās desmitgadēs parādās arvien vairāk pētījumu par vides apstākļu un augu sabiedrību ietekmi uz augu augšanu veģetatīvi vairojoties (Tamm *et al.* 2002; Sammul *et al.* 2004; Klimeš 2008). Galvenie faktori, kas raksturo šādus augus, ir veģetatīvā izplatība laikā un telpā un rametu ilgdzīvotība (Groenendael *et al.* 1996; Tamm *et al.* 2002). Literatūrā nav ziņu par *S. esthonica* veģetatīvās reprodukcijas veidiem, tomēr tas ir viens no būtiskākajiem faktoriem sugas izdzīvošanai ilgtermiņā. Uzskata, ka *S. obvallata* vairojas ģeneratīvi un veģetatīvi (ar sakneņiem) (Dhar, Joshi 2005), savukārt *S. alpina* veido stolonus (Hill *et al.* 2004).

1.8. Molekulāro marķieru tehnikas un to pielietojums augu bioloģijas pētījumos

Ģenētiskās daudzveidības izpētei lieto morfoloģiskās, bioķīmiskās un DNS marķieru metodes. Jaunākie ir DNS marķieri, t.i., nukleotīdu sekvences, kas atbilst noteiktai vietai genomā, un ko identificē no kopējā genoma. DNS marķieru metodes plaši lieto ģenētiskās daudzveidības pētīšanai, tās parāda ģenētisko daudzveidību gan populāciju iekšienē, gan starp populācijām (Agarwal *et al.* 2008). Pārsvarā ir pētīti lauksaimniecības augi. Līdz ar to, pieejams plašs informācijas apjoms par to sekvencēm, kā arī daudz un dažādi marķieri (Varshney *et al.* 2005). *Saussurea* ģints ir maz pētīta ar molekulārajiem marķieriem, jo tā ir liela un sugu iekšienē ir liela daudzveidība (Raab-Straube 2003; Wang, Liu 2004), līdz ar to, izpēte ir apgrūtināta. Molekulārie marķieri *Saussurea* ģints sugām nav izveidoti, tāpēc molekulārajos pētījumos jāizmanto anonīmie marķieri.

Molekulāri ģenētiskajos pētījumos, lai atšķirtu tuvradniecīgus indivīdus, kā arī gēnu kartēšanai bieži izmanto AFLP analīzi (Vos *et al.* 1995). Viena no jaunākajām DNS marķieru tehnikām ir uz retrotranspozonu konservatīvajām sekvencēm balstītā iPBS metode (Kalendar *et al.* 2011). Viena no biežāk lietotajām metodēm filoģenētiskajos pētījumos ir ribosomālās ITS metode (Poczai, Hyvönen 2010).

2. MATERIĀLS UN METODES

2.1. Pētījumu vietas un apstākļi

Ekofizioloģiskos pētījumus *in situ* veica un lapas ģenētiskajām analīzēm ievāca abās populācijās Latvijā (turpmākajā tekstā populācijas nosauktas tuvākās apdzīvotās vietas vārdā, t.i., Apšuciems un Pope) un divās populācijās Igaunijā (Pärnu-Jaagupi un Kalevi). Latvijas *S. esthonica* atradnes ir ar īpašu juridisko statusu kā īpaši aizsargājamas un Natura 2000 teritorijas: mikroliegums „Dubļukrogs” netālu no Apšuciema un dabas liegums „Popes zāļu purvs” netālu no Popes. Abām atradnēm raksturīgs zāļu purvs ar kaļķainu augsni. Igaunijā pētītās *S. esthonica* atradnes ir aizaugusi pļava pie Pärnu-Jaagupi un zāļu purvs pie Kalevi. *S. esthonica* vai nu veido lapu rozeti un nezied (turpmāk tekstā veģetatīvie augi), vai veido ziedkopu un tad lapas izkārtotas uz ziedkāta (turpmāk tekstā ģeneratīvie (ziedošie) augi).

2.2. Pētījumi *in vitro* kultūrā

No 14 botāniskajiem dārziem caur botānisko dārzu sēklapmaiņas sistēmu *Index Seminum* saņēma 11 *Saussurea* ģints sugu sēklu paraugus no Eiropas un Āzijas. Izmantoja divus modificētas *Murashige & Skoog* (1962; MS) barotnes variantus: (1) ar ½ MS makroelementiem, 2% saharozi, 0.6% agaru un (2) ar ¼ MS makroelementiem, 2% saharozi, 0.6% agaru, papildinātu ar 0.2 mg L⁻¹ kinetīna. Uzskaitīja inficētās sēklas, aprēķināja dīgtspēju procentos un dīgšanas laiku dienās.

Lai noteiktu citokinīnu ietekmi uz *S. esthonica* proliferāciju un rizoģenēzi, *in vitro* savairotus augus pārnesa uz barotnēm ar ½ vai 1 MS makroelementiem, 3% saharozi, 0.6% agaru, un citokinīniem. Lietoja šādus citokinīnus: kinetīnu 0.5, 1.0, 1.5 un 2.0 mg L⁻¹; N6-(delta 2-izopentenil)-adenīnu (2-iP) – 0.25, 0.5, 0.75 un 1.0 mg L⁻¹ vai 6-benzilaminopurīnu (BAP) – 0.25, 0.5, 0.75 un 1.0 mg L⁻¹. Kā kontroli izmantoja bezhormonu barotni ar ½ vai 1MS makroelementiem. Dzinumus kultivēja 300 ml kultivēšanas traukos, kuros ielieti 50 ml barotnes. Katrā variantā bija 30 mikrodzinumi trīs atkārtojumos. Pēc četrus nedēļas kultivēšanas uzskaitīja dzinumus veidojošos eksplantus, dzinumu un sakņu skaitu. Saknes, kas izveidojās barotnēs ar kinetīnu un 2-iP, ieskenēja izmantojot skeneri PERFECTION V750 PRO (*Epson*) un, lai novērtētu sakņu morfoloģiju, analizēja izmantojot attēla analīzes sistēmu WinRHIZO 2008. *In vitro* kultūras audzēja telpā 24 ± 2 °C temperatūrā ar fotoperiodu 16 h, fotonu plūsmas blīvumu 40 μmol s⁻¹ m⁻².

2.3. Ekofizioloģiskie pētījumi

2.3.1. Pētījumi dabiskos apstākļos

S. esthonica ekofizioloģiskos pētījumus *in situ* veica abās Latvijas atradnēs veģetācijas periodā reizi mēnesī (2009. gadā jūlija, augusta un septembra sākumā, 2010. un 2011. gadā jūnija, jūlija, augusta un septembra sākumā), kā arī 2009. līdz 2011. gada jūlijā divās Igaunijas atradnēs. Ar hlorofilmetru SPAD 502 (*Konica-Minolta*, Japāna) mērīja hlorofila saturu lapās un hlorofila *a* fluorometru Handy PEA (*Hansatech Instruments*, Lielbritānija) rādītājus - F_v/F_m, PI, RC/ABS, F_v/F₀, (1-V_j)/V_j.

2.3.2. Pētījumi kontrolētos apstākļos

Eksperimentā par substrāta ietekmi kontrolētos apstākļos izmantoja četrus dažādus substrātus, kas atšķīrās ar minerālvielu sastāvu tajos. Kontroles varianta substrāts saturēja minerālvielas tādā sastāvā un koncentrācijā, kas optimāla lielākajai daļai kultūraugu, bet, tā kā *S. esthonica* aug kaļķainās augsnēs, papildus pievienojot dolomīta miltus. Otrā varianta substrāta minerālvielu sastāvs bija līdzīgs Apšuciema atradnes augsnei ar paaugstinātu mangāna un dzelzs saturu. Trešā varianta augsnes sastāvs bija līdzīgs Popes atradnes augsnei, bet ceturtā varianta augsne (Pope +) bija kā trešajā variantā, atšķiroties tikai ar palielinātu slāpekļa un sēra saturu. Substrātu receptūru izstrādāja Dr. biol. Andis Karlsons LU BI Augu minerālās barošanās laboratorijā.

Eksperimentā ar dažādiem mitruma režīmiem izmantoja 4. varianta substrātu. Audu kultūrā pavairotus *S. esthonica* augus pārstādīja pa vienam plastmasas veģetācijas traukos (9×9×10 cm), tiem atļāva iesakņoties un pēc trim nedēļām sadalīja četrās eksperimentālajās grupās, kas atšķīrās ar laistīšanas režīmu. Lai uzturētu atbilstošu laistīšanas režīmu, optimālā režīma gadījumā uzturēja 100% individuālo trauku (kopā ar substrātu un augu) masu, mērenā sausuma variantā tā bija 90% no optimālā varianta masas, bet mitrajā variantā – 150% no optimālās masas. Slapjo režīmu uzturēja, traukus ar augiem ievietojot ūdenī 3 cm dziļumā, kā rezultātā trauku masa sasniedza 200% no optimālā varianta masas.

Abu eksperimenta gaitā vizuāli noteica augu stāvokli to izsakot kā vitalitāti ballēs un lapu skaitu. Reizi nedēļā mērija hlorofila saturu lapās un hlorofila *a* fluorescenci.

2.4. Reprodukcija

2.4.1. Dīgšanas spējas pētījumi

S. esthonica sēklas dīgšanas spējas pētījumiem ievāca 2009. un 2010. gadā dabiskajās populācijās un 2011. gadā no Nacionālajā botāniskajā dārzā augušie augiem. Lai noskaidrotu zieda kurvītī esošo sēklu izmērus, izmērija piecu augu sēklas (kopā 33 kurvīši) vāktas dabiskajās populācijās. Sēklu izmēru noteikšanai izmantoja milimetru papīru. Noteica, kādā proporcijā sastopamas katra izmēra sēklas. Pēc tam sēklas vizuāli izvērtēja un saskaitīja tukšās sēklas.

Lai noteiktu dīgšanas spējas atkarību no sēklu izmēriem, izmantoja ranžētas 3, 4, 5 mm sēklu frakcijas. Sēklas novietoja Petri traukos, kuros ieklāts filtrpapīrs divās kārtās, kas samitrināts ar H₂O, 10⁻² M, 10⁻³ M, 10⁻⁴ M GA₃ vai 0.2% KNO₃, un diedzēja 22 °C tumsā.

Dīgšanas spējas testam, kurā noteica dīgšanas spējas atkarību no kultivēšanas apstākļiem, izmantoja 4 mm sēklu frakciju. Daļu sēklu glabāja vienu mēnesi 4 °C ledusskapī, bet pārējās 17 °C temperatūrā līdz eksperimenta sākumam. Sēklas novietoja Petri traukos, kuros ieklāts filtrpapīrs divās kārtās, kas samitrināts H₂O, 10⁻² M, 10⁻³ M, 10⁻⁴ M GA₃ vai 0.2% KNO₃ veica trīs atkārtojumos. Sēklas diedzēja 22 °C tumsā un 22 °C ar fotoperiodu 16/8 h. Rezultātus analizēja, izmantojot ANOVA analīzi.

2.4.2. Veģetatīvās vairošanās izvērtējums

Desmit augus no dīgšanas spējas testā uzdīgušām kontroles varianta sēklām izstādīja veģetācijas traukos kūdras substrātā, audzēja pa vasaru lauka apstākļos, pārziemināja un pēc pārziemošanas lauka apstākļos noteica izveidojušos dzinumus un ziedkāmus

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

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

2.5.1. *Saussurea esthonica* Latvijas populāciju ģenētiskā daudzveidība

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

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

2.5.2. Latvijas un Igaunijas populāciju ģenētiskās daudzveidības salīdzināšana

Analīzēm izmantoja četrus iPBS DNS marķierus: (2001, 2076, 2081, 2083 (Kalendar *et al.* 2010). Ģenētisko daudzveidību Latvijas un Igaunijas populāciju starpā noteica divos veidos: (1) ar neiezīmētajiem PBS praimeriem, amplificētos fragmentus sadalot elektroforēzē agarozes gēlā un pēc tam fotografējot, izmantojot digitālo sistēmu Alpha DigiDoc; (2) ar HEX un 6-FAM krāsu iezīmētajiem PBS praimeriem. Rezultātus sakārtoja binārajā sistēmā un analizēja, izmantojot programmu GenAEx 6 (Peakall, Smouse 2006).

2.5.3. Vairāku *Saussurea* ģints sugu filoģenētiskais salīdzinājums

Ģenētiskajām analīzēm izmantoja iPBS un ITS metodes. iPBS analizē amplificētos fragmentus sadalīja izmantojot ABI PRISM 3130xl ģenētisko analizatoru un genotipēja izmantojot GeneMapper v4.0, veidoja bināro datu matrici un analizēja ar GenAEx 6 (Peakall, Smouse 2006). Filoģenētisko koku veidoja izmantojot *Neighbour-joining* klasteru analīzi MEGA 4 programmā (Tamura *et al.* 2007). ITS sekvenēšanas analīzes veica ar ABI PRISM 3130xl ģenētisko analizatoru un datus analizēja ar programmu MEGA 4 (Tamura *et al.* 2007).

3. GALVENIE REZULTĀTI

3.1. *In vitro* kultūras

3.1.1. *Saussurea* sugu dīgtspēja *in vitro*

Dīgtspēja bezhormonu barotnēs ar ½ MS bija 14.3% un ¼ MS, kam pievienots kinetīns - 16.6%. Dažādām sugām dīgtspēja atšķīrās: *S. alpina* – 13% līdz 100% *S. maximowiczii*. Kopumā 92% sēklu uzdīga 3 nedēļu laikā, 6% turpmākajās 2 nedēļās un tikai 2% dīga 3 mēnešus.

3.1.2. Dažādu citokinīnu ietekme uz augu kultivēšanu in vitro

Barotnē bez citokinīniem dzinumu proliferāciju nenovēroja. Barotnēs, kurām bija pievienots BAP, augošajiem dzinumiem novēroja izteiktu proliferāciju. BAP ietekmē palielinājās jaunos dzinumus veidojošo eksplantu skaits, kā arī dzinumu skaits no eksplanta. Vienīgā statistiski būtiskā atšķirība starp citokinīnu koncentrācijām parādījās variantā ar 1 MS makroelementiem un BAP ($p < 0.05$). Variantos ar dažādām makroelementu koncentrācijām būtiska atšķirība parādījās variantos ar 1 mg L⁻¹ BAP un makroelementiem ½ un 1 MS ($p < 0.05$). Dzinumu garums variēja starp 0.8 un 3.3 cm, tomēr ne fitohormona veids, ne koncentrācija būtiski neietekmēja dzinumu stiepšanos. Parādījās tikai tendence, ka BAP pievienošana barotnei varētu kavēt dzinumu elongāciju.

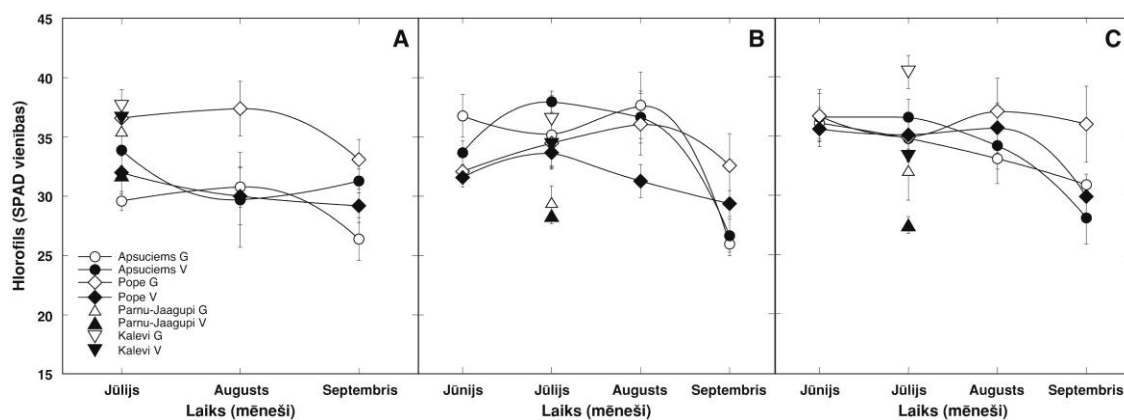
Saknes vislabāk veidojās barotnēs bez fitohormoniem un ar 2-iP. BAP inhibēja sakņu veidošanos. Mazāk par 30% eksplantu veidoja saknes barotnēs ar BAP un tās bija pāresninātas un īsas. Jo lielāka bija lietotā BAP koncentrācija, jo mazāk sakņu novēroja. Būtiskas bija atšķirības gan saknes veidojošo eksplantu skaitā, gan sakņu skaitā no eksplanta visos variantos izņemot variantus ar kinetīnu un 2-iP ar 1MS makrosāļu koncentrāciju.

Visi sakņu parametri barotnēs ar ½ MS atšķīrās starp variantiem ar kinetīnu un 2-iP. Savukārt, lietojot makroelementus koncentrācijā 1MS, nebija būtisku atšķirību starp apstrādi ar citokinīniem un kontroli. Novēroja, ka sakņu vidējais diametrs variantos ar kinetīnu mazliet samazinājās. Gan sakņu garums, gan laukums samazinājās palielinot citokinīnu koncentrāciju. 2-iP lietojot koncentrācijā 0.25 mg L⁻¹ novēroja sakņu skaita palielināšanos un šī koncentrācija parādīja labāku rezultātu nekā kontrole. Variantos ar 2-iP un variantos ar ½ MS sakņu galiņu skaits bija lielāks, līdz ar to var teikt, ka ½ MS veicina sakņu zarošanos salīdzinot ar pilnu MS makroelementu formulu un 2-iP palielina sakņu skaitu.

3.2. Ekofizioloģiskie pētījumi

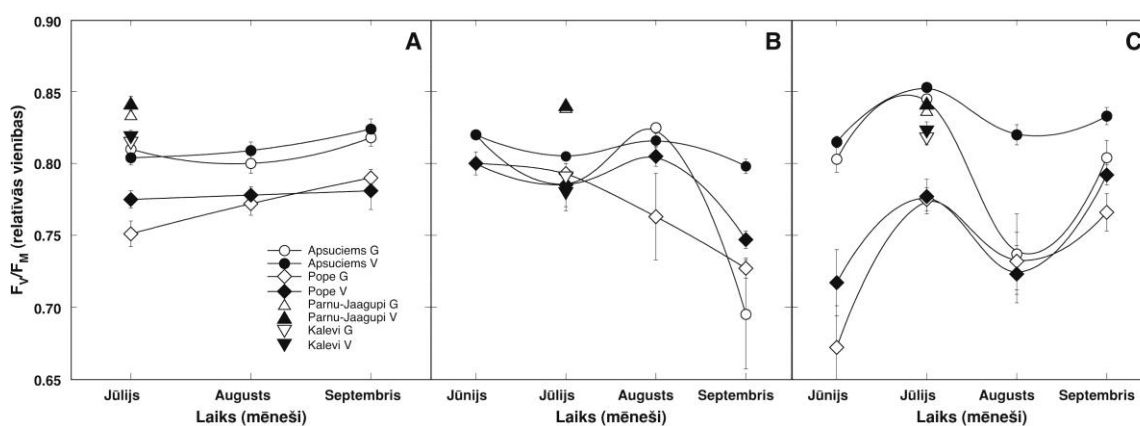
3.2.1. Pētījumi dabiskos apstākļos

Kopumā hlorofila saturs lapās sezonas laikā mainījās nedaudz, varēja novērot tendenci tam samazināties veģetācijas sezonas beigās, septembrī (1. attēls).



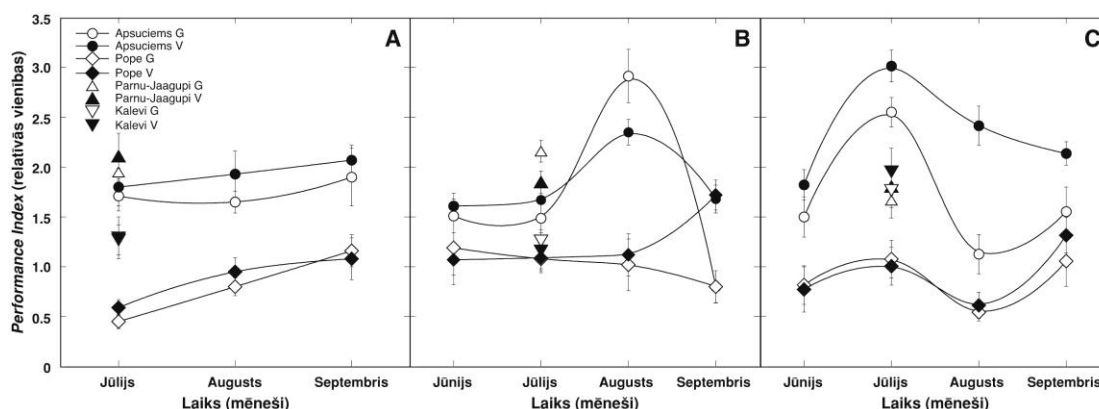
1. attēls. Hlorofila satura sezonālās izmaiņas 2009. gadā (A), 2010. gadā (B), 2011. gadā (C) ģeneratīvo (G) un veģetatīvo (V) *Saussurea esthonica* augu lapās savvaļas apstākļos dažādās atradnēs.

Statistiski būtisks samazinājums bija novērojams Apšuciema atradnē augošajiem ģeneratīvajiem augiem 2009. gadā, kā arī, abu veidu augiem šajā atradnē 2010. un 2011. gadā. Salīdzinot ziedošos un neziedošos *S. esthonica* augus dažādās atradnēs, varēja konstatēt, ka atšķirības lielākoties bija nebūtiskas, bet bija raksturīga tendence, ka veģetatīvajiem augiem F_v/F_m bija augstāks (2. attēls). Statistiski būtiski augstāks F_v/F_m līmenis veģetatīvajiem augiem bija novērojams 2010. gada augustā Popē un septembrī Apšuciemā, kā arī, 2011. gada augustā Apšuciemā. Augiem Igaunijas atradnēs F_v/F_m vērtības bija nedaudz augstākas vai Apšuciema atbilstošo vērtību līmenī (izņemot 2011. gada jūliju).



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

Kompleksā fluorescences parametra *Performance Index* (PI), kas raksturo augu kopējo fizioloģisko vitalitāti, izmaiņas parādīja līdzīgas tendences kā F_v/F_m gadījumā, bet ar mazākām variācijām samazināšanās virzienā un lielākām – paaugstināšanās virzienā (3. attēls).

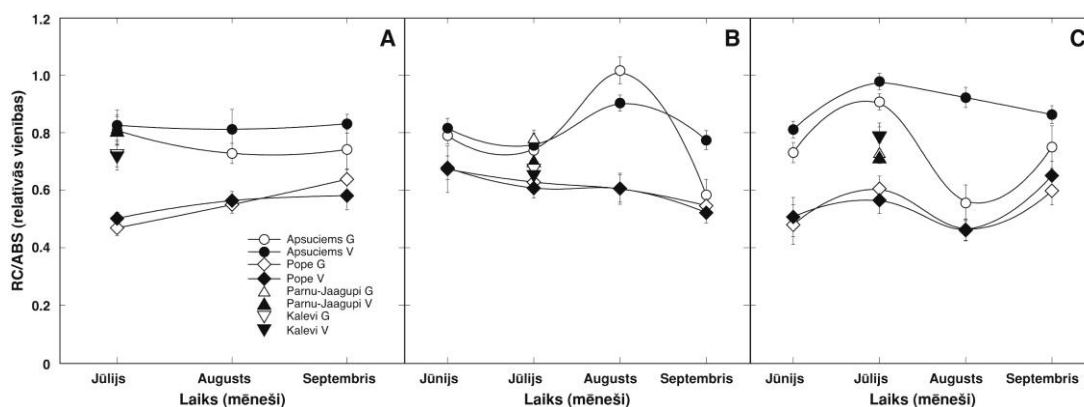


3. attēls. Hlorofila fluorescences parametra *Performance Index* sezonālās izmaiņas 2009. gadā (A), 2010. gadā (B) un 2011. gadā (C) ģeneratīvo (G) un veģetatīvo (V) *Saussurea esthonica* augu lapās savvaļas apstākļos dažādās atradnēs.

Ja 2009. gadā sezonas laikā nebija novērojamas krasas PI svārstības, tad 2010. gada augustā un 2011. gadā no jūnija līdz augustam Apšuciemā augošajiem augiem šis

rādītājs būtiski pieauga. Popes atradnes augiem PI visās sezonās bija būtiski zemāks nekā Apšuciema augiem. Atšķirības starp ģeneratīvajiem un veģetatīvajiem indivīdiem nebija statistiski būtiskas, izņemot 2010. gada augustā Apšuciemā un septembrī Apšuciemā un Popē, kā arī, 2011. gadā Apšuciemā visā sezonas garumā.

F_v/F_0 izmaiņas *S. esthonica* augu lapās bija līdzīgas PI izmaiņām, bet ar būtiski mazāku amplitūdu. Būtiski augstāks F_v/F_0 līmenis Apšuciema augu lapās saglabājās visas sezonas garumā 2009. gadā, 2010. gadā tas bija vienāds ar Popes augu F_v/F_0 līmeni, bet 2011. gadā šāda atšķirība bija raksturīga sezonas pirmajā pusē (jūnijā un jūlijā), bet augustā un septembrī tas bija novērojams paaugstinātā līmenī tikai veģetatīvajiem augiem. Arī aktīvo reakcijas centru īpatsvaru raksturojošā parametra RC/ABS izmaiņas (4. attēls) bija līdzīgas PI un F_v/F_0 izmaiņām.



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

Novēroto izmaiņu amplitūda bija lielāka nekā F_v/F_0 , bet mazāka nekā PI. Raksturīgi, ka Apšuciema augiem RC/ABS bija augstākā līmenī nekā Popes augiem, bet Igaunijas atradņu augiem RC/ABS bija tuvu Apšuciema augu līmenim vai zem tā. Salīdzinoši nelielas atšķirības starp dažādu atradņu augiem varēja novērot attiecībā uz fluorescences parametru $(1-V_j)/V_j$, kas parāda tumsas reakciju ietekmi uz PS II (fotosistēmas II) aktivitāti. Novēroja, ka ar PS II fotosintētisko aktivitāti saistītie rādītāji kopumā augstāki bija veģetatīvajos, nevis ģeneratīvajos augos, tomēr šīs atšķirības nebija ļoti izteiktas. Krasākas atšķirības starp ar PS II saistītajiem rādītājiem parādījās augusta mērījumos, kas varētu būt saistīts ar ģeneratīvo augu lapu ātrāku novecošanos.

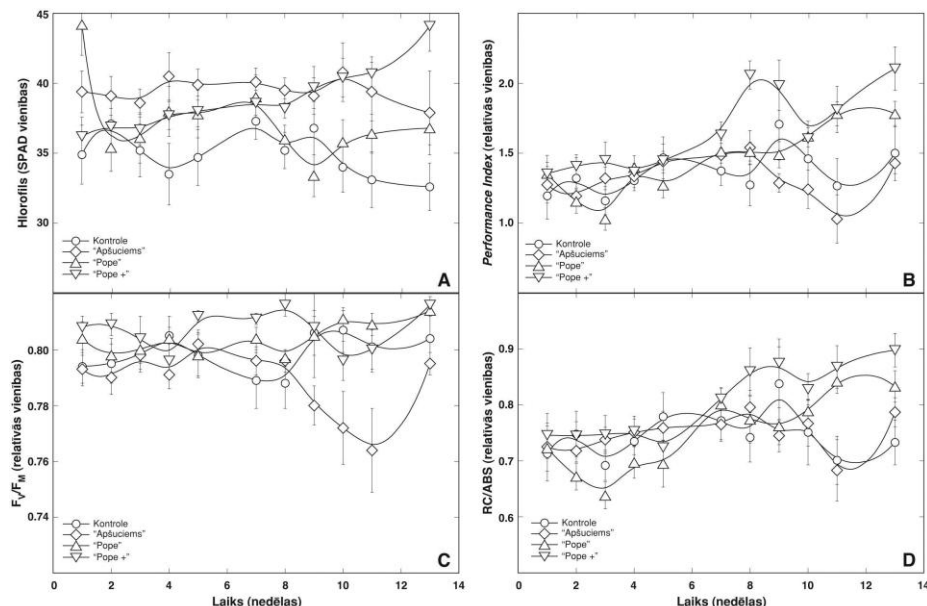
Visu ar PS II aktivitāti saistīto rādītāju pazeminātā aktivitāte Popē, iespējams, ir kompleksa mitruma un augsnes minerālā sastāva ietekmes izpausme. Tādēļ turpmākajos eksperimentos kontrolētos apstākļos pētīja šo divu parametru ietekmi.

3.2.2. *Augsnes minerālsastāva un mitruma ietekme uz Saussurea esthonica* augšanu kontrolētos apstākļos

Lai noskaidrotu, kā mainās *S. esthonica* augu augšana un fizioloģiskā vitalitāte atkarībā no augsnes minerālelementu sastāva, augus audzēja kontrolētos apstākļos substrātā ar četrām atšķirīgām minerālelementu kombinācijām. Analizējot lapu skaita izmaiņas dažādās augsnēs, konstatēts, ka lapu skaits krasī samazinājās Apšuciema

augsnē, savukārt lielākais lapu skaits bija uzlabotā Popes (Pope +) varianta augiem. Šī likumsakarība parādījās arī attiecībā uz vizuāli novērtēto augu vitalitāti. Kopumā vērtējot morfoloģiskos rādītājus eksperimenta beigās, augu attīstībai labvēlīgākā bija Pope + augsne, kurai sekoja Popes augsne un kontroles augsne, bet Apšuciema augsne bija vismazāk labvēlīga.

Eksperimenta sākumā nelabvēlīga ietekme uz lapu hlorofila saturu bija vērojama Popes augsnes varianta augiem, bet vēlākā laikā tas saglabājās vidējā līmenī (5. attēls A).



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

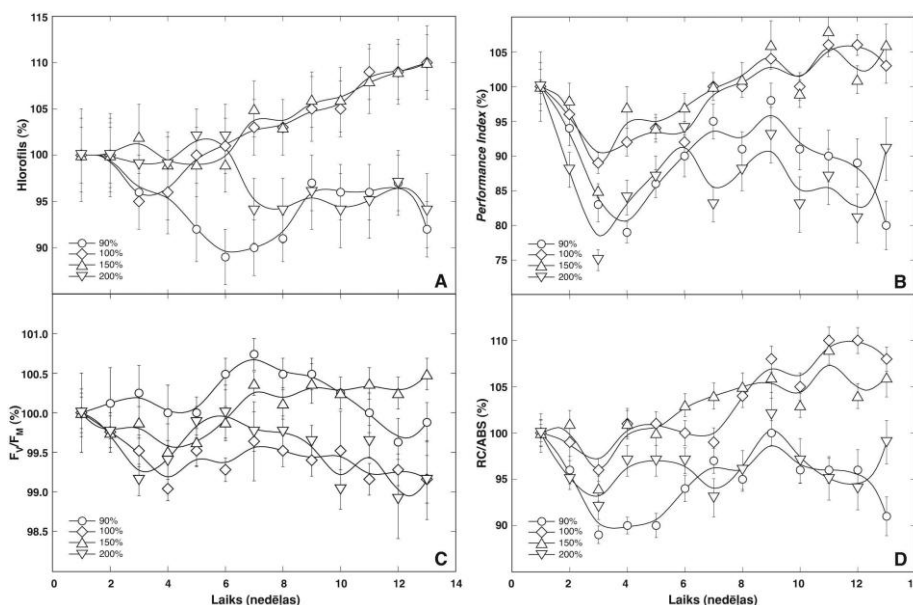
Apšuciema augsnes variantā lapu hlorofila saturs eksperimenta laikā nemainījās, bet uzlabotās Popes augsnes variantā varēja novērot stabilu lapu hlorofila satura pieaugumu visā eksperimenta laikā. Savukārt, viszemākais hlorofila saturs bija raksturīgs kontroles augiem. Pretēji lapu hlorofila saturam, kas parādīja būtiskas atšķirības starp eksperimenta variantu augiem, hlorofila *a* fluorescences rādītāji eksperimenta sākumā mainījās salīdzinoši maz (5. attēls). Vienīgi *Performance Index* (5. attēls B) un RC/ABS (5. attēls D) augiem Popes augsnē parādīja nelielu, bet būtisku samazinājumu līdz 3. eksperimenta nedēļai. Tālākajā periodā (no 4. līdz 6. nedēļai) varēja novērot lielākas atšķirības starp eksperimentālajiem variantiem. Būtiski, ka izmaiņas bija atšķirīgas dažādiem fluorescences parametriem – *Performance Index* un RC/ABS no vienas puses, un F_v/F_m un F_v/F_0 no otras, mainījās līdzīgi.

Tā kā šie rezultāti bija pretrunā novērojumiem, ka tieši Popē ir viszemākie fizioloģiskās vitalitātes rādītāji, iekārtoja eksperimentu mitruma režīma ietekmes pārbaudei un konstatēja, ka vizuāli noteiktais lapu skaits un augu vitalitāte palielinājās palielināta mitruma apstākļos augošiem augiem. Optimālākais bija palielinātā mitruma režīms (150%), pie kura varēja novērot stabilu lapu daudzuma palielināšanos visā eksperimenta gaitā. Lapu skaita būtisks pieaugums bija novērojams arī applūdušā

augsnē (200%) augšajiem *S. esthonica* augiem, bet to daudzums tālāk nemainījās sākot ar sesto nedēļu. Būtisks lapu skaita pieaugums nebija novērojams „optimālā” varianta (100%) augiem, bet sausuma apstākļos sākot ar sesto nedēļu bija vērojama pakāpeniska lapu skaita samazināšanās.

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

Pirmajās sešās nedēļās hlorofila saturs kontroles augiem un augiem ar palielinātu mitrumu nemainījās. Pēc tam augiem, kuriem bija 200% mitrums, hlorofila saturs samazinājās. Augiem, kuri tika laistīti nepietiekami, hlorofila saturs sāka pazemināties jau pēc divām nedēļām. F_v/F_m un F_v/F_0 izmaiņas visos variantos bija ļoti nelielas (6. attēls).



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

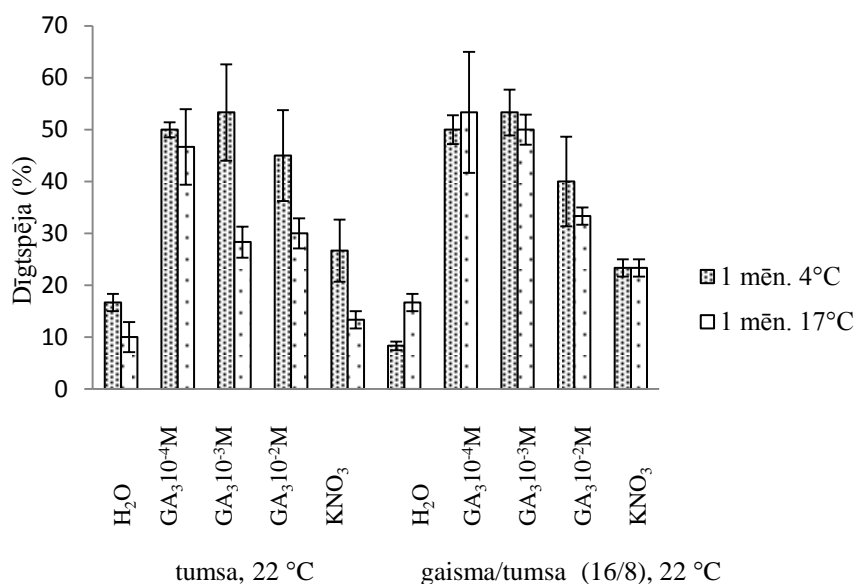
PI un RC/ABS visos variantos strauji samazinājās pirmajās trīs nedēļās. Pēc tam pakāpeniski palielinājās. Eksperimenta beigās RC/ABS līmenis 100 un 150% mitruma nodrošinājuma variantos bija ievērojami augstāks nekā 90% un 200% variantos.

3.3. Reprodukcija

3.3.1. *Saussurea esthonica* sēklu dīgspēja

Savvaļā ievāktu *S. esthonica* sēklu garums variēja no 2 līdz 5 mm. Visvairāk bija 4 mm sēklu (51%), bet 3 mm (21%) un 5 mm (25%) sēklu skaits atšķīrās nedaudz. Mazo sēklu (2 mm) daudzums bija neliels (3%) un tās bija nedīgstošas. Vizuāli novērtējot, 44% no 3 līdz 5 mm garuma sēklām bija tukšas. 22 °C tumsā dīga 46% 5 mm sēklu, 28% 4 mm sēklu un 16% 3 mm sēklu. Sēklu izmērs būtiski ietekmēja dīgspēju ($p < 0.05$).

Apgaismojuma un aukstās stratifikācijas ietekme uz dīgšanu kombinācijā ar aktīvo vielu ietekmi uz 4 mm garuma sēklām redzama 7. attēlā.



7. attēls. *Saussurea esthonica* dīgspēja atkarībā no sēklu priekšapstrādes, apgaismojuma un kultivēšanas apstākļiem.

Būtiskas atšķirības bija starp dažādiem apstrādes veidiem ($p < 0.05$), t.i., KNO₃ un GA₃, bet ne starp apgaismojuma režīmiem. GA₃ 10⁻³ un 10⁻⁴ M labāk veicināja dīgspēju nekā GA₃ 10⁻² M.

Sēklu dīgšanas laiks variēja starp 3 un 21 dienu ar maksimumu 4-7 dienas. Lielākā daļa sēklu uzdīga 14 dienu laikā. Tikai 2% sēklu dīga 14 līdz 21 dienas. Novērojām, ka stratificētās sēklas uzdīga ātrāk. Septiņās dienās uzdīga 86% stratificēto sēklu un 77% sēklu, kas pirms dīgspējas testa bija glabātas 17 °C temperatūrā.

Daļa sēklu (19.5%), kas neuzdīga viena mēneša laikā, tika novērtētas kā nedīgstošas (sēklas iekšpusē novēroja baltu dīgli), pārējās bija nedzīvas (iekšējie audi bija melni). Pēc sekojošas skarifikācijas nedīgstošās sēklas uzdīga 2 līdz 5 dienu laikā.

3.3.2. Veģetatīvās vairošanās potenciāls

Veģetatīvās vairošanās potenciālu noteica analizējot veidoto dzinumu skaitu pēc pārziemošanas otrajā un trešajā veģetācijas sezonā. Pirmajā gadā pēc pārziemošanas viens augs vidēji veidoja 5 dzinumus (1. tabula).

1. tabula. Kopējais dzinumu skaits un ziedošie dzinumi pēc augu pārziemošanas 2011. un 2012. g.

Gads	Kopējais dzinumu skaits	Ziedošie dzinumi no kopējā dzinumu skaita
2011.	5.00±1.30	0.60±0.27
2012.	6.60±1.33	0.50±0.08

Tomēr trīs augi veidoja pa vienam dzinumam. Otrajā gadā kopējais dzinumu skaits bija 66 un no viena auga varēja iegūt 2 līdz 17 dzinumus. Pirmajā gadā pēc

pārziemošanas ziedošos dzinumus novēroja četriem augiem, pie kam diviem no tiem novēroja divas ziedkopas katram. Otrajā gadā atkārtoti ziedēja tikai viens augs, pārējie ziedošie bija tādi, kas iepriekšējā gadā neziedēja.

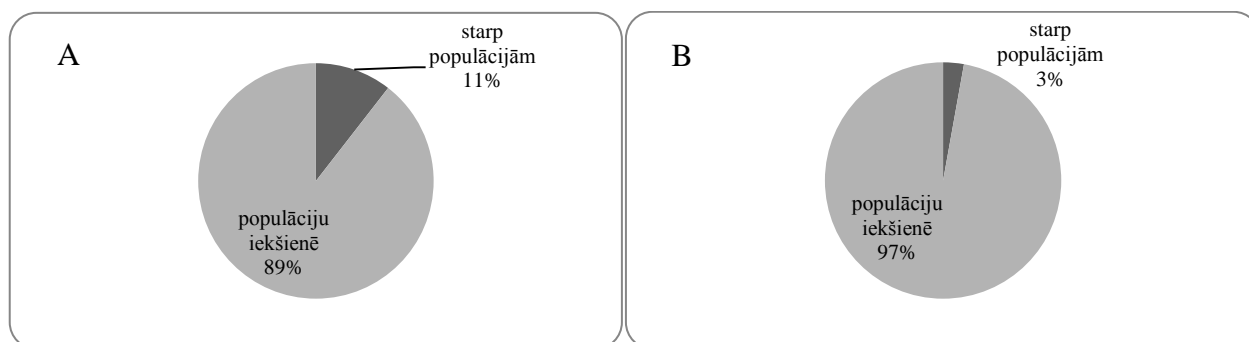
Lai noskaidrotu, ar kādu struktūru palīdzību *S. esthonica* vairojas veģetatīvi un cik lielā mērā, divus augus izņēma no veģetācijas traukiem un vērtēja. Konstatēja, ka veidojas divu veidu dzinumi – vertikāli orientēti adventīvie dzinumi tuvu galvenajam dzinumam un daļēji horizontāli orientēti sakneņi ar dzinumiem attālināti no galvenā dzinuma. Jauno dzinumu atdalīšanos no galvenā dzinuma nenovēroja.

3.4. Molekulāri ģenētiskā izpēte

3.4.1. Daudzveidība Latvijas populācijās

Saussurea esthonica Latvijas populācijās ģenētisko daudzveidību analizēja ar iPBS un AFLP metodēm. iPBS analīzē pieci praimeru kopumā producēja (uzrādīja) 67 fragmentus. Četri unikāli fragmenti konstatēti Apšuciema populācijā. Šajā populācijā bija arī mazliet augstāka sagaidāmā heterozigotāte (0.30) nekā Popes populācijā (0.29).

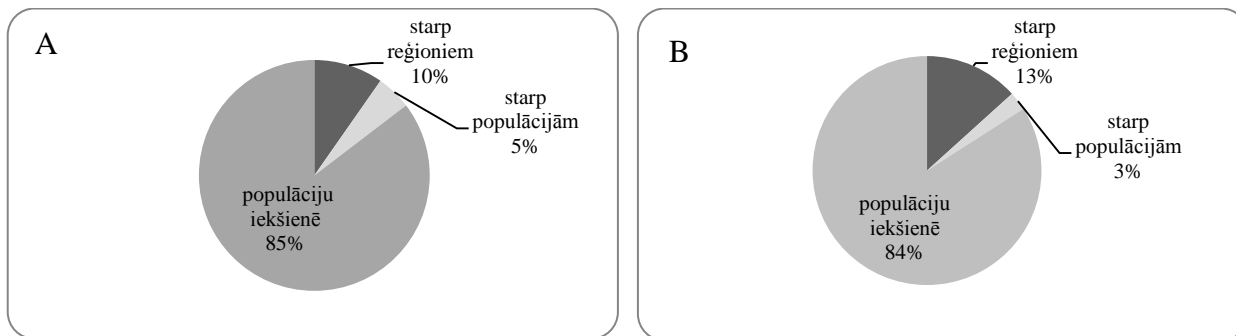
Ar AFLP analīzi ieguva 208 fragmentus. Arī ar šo analīzi augstāka sagaidāmā heterozigotāte bija Apšuciema populācijā (0.32), kā arī atrasti 5 unikāli fragmenti. Popē attiecīgi sagaidāmā heterozigotāte bija 0.3 un 2 unikāli fragmenti. Ar abām metodēm lielāka daudzveidība bija populāciju iekšienē, nevis starp populācijām (8. attēls).



8. attēls. Ģenētiskās daudzveidības sadalījums Latvijas populācijās ar iPBS analīzi (A), ar AFLP metodi (B).

3.4.2. Daudzveidība starp populācijām Latvijā un Igaunijā

Tā kā analizējot ģenētisko daudzveidību starp populācijām Latvijā, iPBS metode uzrādīja lielāku daudzveidību starp populācijām, tad šo metodi izmantoja daudzveidības analīzei starp Latvijas un Igaunijas populācijām. Izmantoja neiezīmētos un iezīmētos PBS marķierus. Analīzē ar neiezīmētajiem PBS marķieriem rezultātus vizualizēja agarozes gēlā un izveidojās 51 fragmenta josla. Ar iezīmētajiem PBS marķieriem analīzes veica ģenētiskajā analizatorā izmantojot *GeneMapper* v4.0 programmu, ieguva 365 fragmentus. Tos tālāk analizējot, noteica daudzveidību starp populācijām, populāciju iekšienē un starp reģioniem. Lielākā daudzveidība bija vērojama populāciju iekšienē (9. attēls). Salīdzinot abas metodes, atšķirības starp tām ir nelielas.

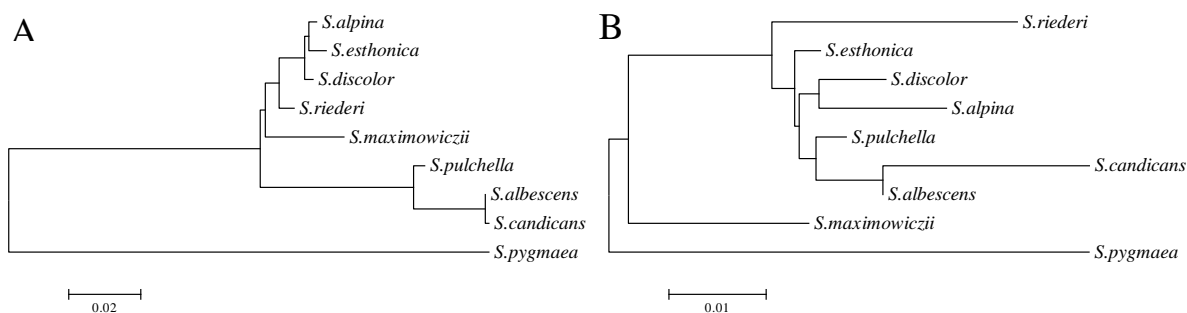


9. attēls. Daudzveidība populāciju iekšienē un starp populācijām ar neiezīmētajiem PBS marķieriem (A), ar iezīmētajiem PBS marķieriem (B).

Nei ģenētiskās distances starp Latvijas populācijām bija 0.062 and 0.003 ar neiezīmētajiem un iezīmētajiem iPBS marķieriem, starp populācijām Igaunijā attiecīgi - 0.041 un 0.002. Atšķirības iegūtajos rezultātos skaidrojamas ar atšķirīgo iegūto fragmentu skaitu ar katru no metodēm. Tomēr starp Igaunijas populācijām *Nei* ģenētiskās distances bija mazākas nekā starp Latvijas populācijām.

3.4.3. Dažādu *Saussurea* sugu salīdzinājums

Saussurea sugu salīdzināšanai izmantoja ITS un iezīmētos PBS marķierus. Kopumā ieguva ITS sekvences no 9 *Saussurea* sugu 45 indivīdiem. Analizētās sekvences bija aptuveni 486 nukleotīdus lielas. Tās atrodamas NCBI sekvenču datubāzē ar numuriem JN808226-JN808270.



10. attēls. *Neighbour-joining* dendrogramma veidota izmantojot ģenētiskās distances, kas iegūtas pēc ITS sekvenču datiem (A), iPBS datiem (B).

Izmantojot katras sugas sekvences, aprēķināja ģenētisko distanci (*p*-distances metode) starp sugām un izmantojot *Neighbour-joining* metodi konstruēja dendrogrammu (10. attēls).

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

Lai labāk izpētītu *S. esthonica* taksonomisko statusu, veica tālāku filoģenētisko analīzi izmantojot trīs sugu – *S. esthonica*, *S. alpina* un *S. discolor* indivīdus. Konstruēja *Neighbour-joining* filoģenētisko koku, izmantojot *p*-distance ģenētisko distanci starp indivīdiem (11. attēls).



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

Lai arī vērojamas dažas atkāpes, piemēram, [*S. esthonica* 2 (EST2) un *S. esthonica* 5 (EST2)], vairums indivīdu veidoja klasterus atbilstoši sugām un populācijām. Interesants rezultāts bija tas, ka *S. alpina* Austrijas populācija veidoja klasteri ar *S. discolor* (sekvences bija identiskas), kas arī ir no Austrijas. Savukārt, *S. alpina* Itālijas un Norvēģijas populācijas veidoja klasteri ar *S. esthonica* indivīdiem (sekvences bija identiskas). Atšķirības starp pētītajām populācijām Latvijā un Igaunijā šajā analīzē nenovēroja.

4. DISKUSIJA

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

Tā kā no ārvalstu botāniskajiem dārziem varēja saņemt sēklas, tad šo paraugu *in vitro* kultūras uzsākšanai kā eksplantus izmantojām sēklas. Ja sēklu kvalitāte ir laba, tās uzdīgst trīs nedēļu laikā. Jāpiebilst, ka vairumā gadījumu nebija zināms sēklu ieguves laiks un uzglabāšanas apstākļi.

In vitro kultūru uzturēšanai plaši izmanto dažādus fitohormonus. Tā kā *S. esthonica* labi apsakņojas bezhormonu barotnē, tad darbā neapskatījām auksīnu ietekmi uz sakņu veidošanos, savukārt, bez citokinīniem nav iespējama šī augs proliferācija. Mūsu rezultāti parādīja, ka labāko proliferāciju iegūst barotnei pievienojot BAP. Joshi, Dhar (2003) secinājuši, ka BAP *S. obvallata* pavairošanai ir labāks par kinetīnu, bet, inducējot dzinumus no kallusa kultūras, proliferācijas barotnei pievieno gan kinetīnu,

gan naftiletiķskābi. 2-iP 0.25 mg L^{-1} veicināja sakņu veidošanos, bet lielākās koncentrācijās samazinājās sakņu garums un laukums. Chuenboonngarm *et al.* (2001) pārbaudījis, ka *Gardenia jasminoides* proliferācijai lietojot $2.5-10 \text{ mg L}^{-1}$ 2-iP iegūst dažus dzinumus (1-5), bet šādas koncentrācijas izsauca somaklonālās izmaiņas. Arī citi autori uzskata, ka reto augu saglabāšanai *in vitro*, svarīgi izmantot optimālas fitohormonu devas, lai izvairītos no somaklonālajām izmaiņām, kaut arī atsevišķos gadījumos tieši somaklonālo izmaiņu inducēšanai varētu būt pozitīvs efekts (Fay 1992, Paunescu 2009).

Pavairošanai optimālākais citokinīns ir BAP. Kinetīns un 2-iP maz ietekmē proliferāciju. Tomēr 2-iP var izmantot augšanas un apsakņošanas veicināšanai. Galvenā uzmanība jāpievērš adekvātām, bet ne pārmērīgām augšanas hormonu koncentrācijām.

4.2. Ekofizioloģiskie pētījumi dabiskajos apstākļos

Lai salīdzinātu augu adaptāciju vidē un noteiktu to „labsajūtu”, izmantoja hlorofila satura un hlorofila *a* fluorescences noteikšanu ar nedestruktīvām metodēm. Kopumā veģetācijas sezonas beigās hlorofila saturam bija tendence samazināties, kas skaidrojams ar lapu novecošanos. Popē un Igaunijā mērītajiem augiem hlorofila saturs ģeneratīvo augu lapās bija lielāks nekā veģetatīvo augu lapās, savukārt, Apšuciema augiem tas variēja. Pētījumā par hlorofila daudzumu lapās dažādās rožu sugās un šķirnēs to ontogēnēzē, konstatēts, ka dažādām sugām, kā arī šķirnēm hlorofila daudzums atšķiras, tomēr vairumā gadījumu hlorofila daudzums ziedēšanas laikā samazinās un augļu nogatavošanās fāzē mazliet paaugstinās (Adumitresei *et al.* 2011). Arī citi autori (Ding *et al.* 2005) pētījumā ar dažādiem kukurūzas hibrīdiem konstatējuši, ka pēc ziedēšanas hlorofila daudzums un F_v/F_m vairumā gadījumu samazinās, to saistot pārsvarā ar lapu novecošanos. Mūsu pētījumā ziedēšanas fāzei atbilst jūlija mērījumi, savukārt, sēklu nogatavošanās fāzei – augusta mērījumi. Pie tam, bija vērojams, ka Popē augi zied nedaudz ilgāk un augustā daļa augu vēl ziedēja. Arī pa gadiem konkrētajos laikos ziedošo vai noziedējušo augu skaits atšķīrās. Kopumā hlorofila daudzums nedaudz palielinājās starp ziedēšanas un sēklu nogatavošanās fāzi, tomēr 2011. gadā Apšuciemā tas samazinājās. Veģetatīvo augu lapās hlorofila saturs sāka samazināties jau jūlijā (izņemot 2011. gadā Apšuciemā) (1. attēls). Lapām novecojot, hlorofila saturs tajās samazinās, jo metabolīti atplūst uz atraģējošajiem centriem, bet hlorofila sintēzes intensitāte krītas. Iegūtie rezultāti parāda, ka hlorofila daudzums lielā mērā atkarīgs gan no vides faktoriem, gan ontogēnēzes periodiem.

Hlorofila fluorescences rādītājs F_v/F_m Popē bija zem 0.8, kas, iespējams, ir saistīts ar lielāku nokrišņu daudzumu Popē, jo nokrišņu daudzumam pieaugot, samazinās ar PS II aktivitāti saistītie rādītāji. Arī krasais F_v/F_m samazinājums Popē 2011. gada augustā varētu būt saistīts ar palielinātu nokrišņu daudzumu. Literatūrā atrodami dati par appludināšanas ietekmi uz rīsu stādiem, tiem F_v/F_m samazinājumu novēroja jau pēc divām dienām (Panda *et al.* 2006). Novēroja, ka ar PS II fotosintētisko aktivitāti saistītie rādītāji kopumā augstāki bija veģetatīvajos, nevis ģeneratīvajos augos (2.-4. attēls), tomēr šīs atšķirības nebija izteiktas. Krasākas atšķirības dažādos gados starp ar PSII saistītajiem rādītājiem parādījās augusta mērījumos. Tas varētu būt saistīts ar augu attīstību ontogēnēzē, jo augusta sākumā, kad veica mērījumus, daļa augu ziedēja, daļai jau bija gatavas sēklas. Zināms, ka F_v/F_m sāk samazināties kukurūzas augiem četras

nedēļas pēc ziedu atvēršanās (Ding *et al.* 2005). Līdz ar to mūsu novērotās atšķirības augusta mērījumos pa gadiem varētu būt saistītas ar izmaiņām augu ontogēnēzē.

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

4.3. Augsnes minerālelementu sastāva un mitruma ietekme uz fotosintēzi raksturojošajiem parametriem kontrolētos apstākļos

Hlorofila saturs palielinājās Popes + varianta augiem, samazinājās kontroles un Popes varianta augiem, savukārt, Apšuciema varianta augiem visu eksperimenta laiku tas saglabājās nemainīgs (5. attēls). Tas varētu būt saistīts ar palielināto mangāna un dzelzs saturu Apšuciema varianta substrātā. Kā zināms, līdz 80% šūnās esošās dzelzs atrodas tieši hloroplastos un piedalās hlorofila sintēzes sākuma posmos. Mangāns piedalās ūdens sašķelšanā fotosistēmā II. Šo elementu pārmērīgās koncentrācijas, iespējams, neitralizē substrātā esošais kalcijs.

Fluorescences rādītāji F_v/F_m un F_v/F_0 nedaudz palielinājās kontroles, Popes un Popes + varianta augiem, savukārt, Apšuciema varianta augiem tie bija zem 0.8, tādējādi norādot uz fotosintēzes fotoinhibēšanu. RC/ABS samazinājums liecina par to, ka palielinās antenu hlorofila saturs katrā reakcijas centrā (Thach *et al.* 2007). Līdz ar to, kontroles un Apšuciema varianta augiem vērojama fotosintēzes fotoinhibēšana reakcijas centru pārslodzes dēļ.

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

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

Dažiem mitru vietu augiem novērota hlorofila satura samazināšanās plūdu ietekmē (Clua *et al.* 2009). Arī ūdens deficīta apstākļos vērojams hlorofila satura samazinājums lapās (Schlemmer *et al.* 2005; Sakalauskiene *et al.* 2008). Novērotais hlorofila satura samazinājumu sausā varianta (90%) un applūdušajā augsnē (200%) augošajiem augiem sakrīt ar literatūrā minētajiem datiem. Tā kā F_v/F_m un F_v/F_0 gandrīz nemaz neatšķīrās starp variantiem (6. attēls), tad varam secināt, ka palielināts mitrums šiem augiem nav stresa faktors un tie labi adaptējušies mainīgam ūdens režīmam. Ir pētījumi, ka jau divas dienas pēc augu appludināšanas F_v/F_m samazinās, kas liecina par PS II spējas reducēt

primāro akceptoru plastohinonu samazināšanos (Panda *et al.* 2006). Acīmredzot, kultivējot *S. esthonica* augus pārmitros apstākļos, bet neappludinot, fotosintēzes fotoinhibēšana neiestājas. Novērots, ka pret applūšanu tolerantām rīsu šķirnēm fotoinhibēšanu nenovēro (F_v/F_m nemainās), tomēr PI izmaiņas ilgākā laika periodā parādās (Sarkar *et al.* 2004). Arī pētot sausuma ietekmi uz ābeļu lapām konstatēts, ka sausuma ietekme uz maksimālo kvantu izmantošanas efektivitāti, ja PSII reakcijas centri ir atvērti, ir nenozīmīga un fotoinhibēšanu nenovēro (Massacci, Jones 1990). Pētījumā noskaidrojās, ka sausuma un pārmērīga mitruma apstākļos izmainās ar PSII efektivitāti saistītie rādītāji PI un RC/ABS. Tātad pārmērīga sausuma un mitruma ietekmē mainās nevis fotoķīmijas primārais iznākums (F_v/F_m), bet gan aktīvo/neaktīvo reakcijas centru attiecība pret antenu hlorofilu (RC/ABS), reakcijas centru blīvums, nulles līmeņa fluorescence (F_0).

4.4. Vairošanās potenciāls

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

S. esthonica sēklu dīgtspēja lielā mērā atkarīga no sēklu izmēra un lielākām sēklām ir labāka dīgtspēja. Izvēloties 4 un 5 mm lielas sēklas ir lielāka varbūtība, ka sēklas dīgs. Literatūrā ir dati par dīgtspējas atkarību no sēklu masas. Tomēr bieži dati ir pretrunīgi. Konstatēts, ka pastāv negatīva korelācija starp sēklu masu un dīgtspēju (Bu *et al.* 2007). Pretējs uzskats ir, ka *Sarracenia purpurea* lielākās sēklas sāk dīgt ātrāk un tām ir labāka dīgtspēja (Ellison 2001). Uzskata, ka sēklu izmērs ietekmē dīgtspēju, tomēr tas neietekmē turpmāko dīgstu augšanu (Mölken *et al.* 2005). Savvaļas augu sēklām bieži raksturīgs miera periods un tā pārtraukšanai lieto dažādas metodes un dažādām augu sugām tās var atšķirties. Piemēram, dažas *Lonicera* ģints sugas dīgst pēc aukstās, dažas pēc aukstās-karstās, dažas pēc karstās stratifikācijas, arī GA_3 uzlabo dīgtspēju (Hidayati *et al.* 2000). Konstatēts, ka *Primula modesta* dīgtspēja bez mitrās aukstumapstrādes ir 20-60%, bet 1 mēnesi turot 4 °C tumsā dīgtspēja palielinājās līdz 90-100% (Shimono *et al.* 2004).

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

Dzīvo nesadīgušo sēklu skarifikācija arī pozitīvi ietekmēja dīgtspēju. Zināms, ka skarifikācija veicina necaurlaidīga sēklapvalka izraisīto dīgšanas inhibēšanas un/vai augšanas inhibitoru izraisītā miera perioda apiešanu. Salīdzinot iegūtos rezultātus ar

literatūrā minētajiem miera perioda tipiem konstatēts, ka *S. esthonica* raksturīgs seklaais fizioloģiskais miera periods.

Veģetatīvā vairošanās savvaļas augiem ir bieži sastopama. Uzskata, ka to biežāk novēro vēsos, mitros, noēnotos apstākļos un nabadzīgā augsnē augošiem augiem un tai var būt filoģenētiski, dzīves cikla noteikti iemesli vai vienkārši tā ir augu adaptācijas konkrētiem apstākļiem sekas (Sosnová *et al.* 2010). Ap 21% no klonālo augu sugām ir vairāk kā viens klonālās augšanas veids (Klimeš, Klimešová 1999). *S. esthonica* vairojas veģetatīvi vai nu ar sakneņiem, vai arī hipokotilā veidojas adventīvie pumpuri, kas tālāk veido lapu rozetes. Tipiskākais veģetatīvās vairošanās veids *S. esthonica* augiem ir ar sakneņiem. Pēc mūsu datiem dzinumu skaits no mātesauga ir >1. Atšķirībā no *Saussurea alpina*, *S. esthonica* aug mitrās vietās, līdz ar to veģetatīvā vairošanās varētu būt labāk izteikta, nekā kalnos augošajām sugām.

4.5. Molekulāri ģenētiskā izpēte

Ģenētiskās daudzveidības izpētē arvien plašāk tiek lietoti molekulārie marķieri. Vairumā gadījumu sugas specifiski marķieri izstrādāti kultūraugiem un tie arī pārsvarā tiek pētīti. Savvaļas augu izpētē parasti izmanto metodes, kurās izmanto sugas nespecifiskos marķierus, piemēram, AFLP, kas ir universāla un neprasa konkrētu sekvenču datus. Arvien plašāk pētījumos lieto retrotranspozonu marķierus. Viena no metodēm, kas uzrāda polimorfismus bez iepriekš zināmiem sekvenču datiem un līdz ar to izmantojama tām sugām, kam nav izveidotu marķieru, ir iPBS metode (Kalendar *et al.* 2010). Tā kā *S. esthonica* nav sugas specifisku marķieru, bija svarīgi, lai lietotie marķieri uzrādītu atšķirības. Tāpēc salīdzinot populācijas lietotas divas metodes. Pētot populācijas Latvijā ar AFLP metodi lielāka daudzveidība parādījās populāciju iekšienē, iPBS marķieri uzrādīja lielāku polimorfismu starp populācijām. Kopumā abas šīs metodes ir lietojamas daudzveidības noteikšanai un iegūtie rezultāti ir līdzīgi. Abas populācijas ir atšķiramas. Ir tādi indivīdi, kas raksturīgi tikai konkrētajai populācijai un ir tādi, kas sastopami abās populācijās. Tā kā iPBS marķieri uzrādīja lielāku dažādību starppopulāciju līmenī, tad Latvijas populāciju salīdzināšanai ar Igaunijas populācijām izmantojām tos. Izmantojām iezīmētos un neiezīmētos iPBS marķierus. Iezīmētie marķieri ir jutīgāki, līdz ar to ar šo metodi atrada lielāku fragmentu skaitu, tomēr abas metodes uzrādīja līdzīgu rezultātu. Lielāka atšķirība bija vērojama starp reģioniem (10-13%), t.i., Latviju un Igauniju, nevis starp populācijām (3-5%). Lielākais iegūto fragmentu skaits bija Apšuciema populācijā, mazākais – Kalevi. Unikālo fragmentu skaits un sagaidāmā heterozigotāte lielāka bija Latvijas populācijās. Tā kā daudzveidība ir cieši saistīta ar populācijas izmēriem un augu reprodukciju, 2009. gadā uzskaitīja ziedošos augus, lai noteiktu populācijas lielumu. Izrādījās, ka vismazākā ir Pärnu-Jaagupi populācija, tai seko, Kalevi, Pope, bet Apšuciema populācija ir lielākā. Līdz ar to var teikt, ka populācijas Latvijā ir pietiekoši stabilas un ģenētiskās daudzveidības zudums tās neapdraud. Tajā pat laikā *S. esthonica* vairāk izplatīta Igaunijā (ap 60 populāciju) (Narits *et al.* 2000). Tas, iespējams, ir skaidrojums, kādēļ ģenētiskās distances Igaunijas populācijās ir mazākas, nekā Latvijas populācijās. Līdzīgs novērojums ir arī par izolētās populācijās augošā retā auga *Campanula thyrsoides* ģenētisko daudzveidību, kas, izrādās, nebija atkarīga no populācijas izmēra (*Ægisdóttir et al.* 2009).

Lai iegūtu priekšstatu par *S. esthonica* radniecību ar citām *Saussurea* sugām, tā salīdzināta izmantojot ITS un iPBS metodes. Atšķirības starp abām metodēm parādās rezultātos: daudzveidība sugu iekšienē 84% ar iPBS un 26% ar ITS sekvenēšanu. Neatkarīgi no šīm atšķirībām, filoģenētiskā radniecība ar abām marķieru metodēm atklāj līdzīgus rezultātus: *S. esthonica* veido klasteri ar *S. alpina* un *S. discolor*, savukārt *S. pygmaea* ir ļoti atšķirīga no pārējām analizētajām Eiropas sugām. Tomēr, tā kā mums bija tikai viens analizējams indivīds, tad, lai precizētu rezultātu, būtu nepieciešama vairāku indivīdu analīze. Kopumā iegūtie filoģenēzes rezultāti saskan ar Lipschitz (1979) doto klasifikāciju (2. tabula).

2. tabula. Analizējamo sugu klasifikācija pēc Lipschitz (1979)

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

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

Saussurea ģints filoģenēze nav pilnībā izpētīta (Raab-Straube 2003, Wang, Liu 2004) un ir daudz neskaidrību. Iepriekš *S. esthonica* taksonomiskais statuss ir pētīts, balstoties uz morfoloģisko īpašību izpēti (Narits *et al.* 2000), secinot, ka *S. esthonica* varētu būt *S. alpina* eko-ģeogrāfiska pasuga. *S. esthonica*, *S. alpina* un *S. discolor* filoģenētiskā analīze, izmantojot ITS sekvenču datus, neparādīja skaidru šo sugu radniecību, Norvēģijas un Itālijas *S. alpina* populācijas veidoja klasteri ar *S. esthonica*, bet Austrijas *S. alpina* populācija bija tuvāka Austrijas *S. discolor* populācijai. Jau 19. gs. beigās Franšē (*Franchet*), pētot *Saussurea* ģints sugas Japānā, izvirzīja hipotēzi, ka ģints izcelsmes centros sugas ir morfoloģiski atšķirīgākas, savukārt areāla malās sugas ir grūti atšķiramas (Lipschitz 1979). Līdzīgu secinājumu izdarījis arī Martins (2006) pētot *Klasea* ģinti, un norādot, ka sugas, kas atrodas izcelsmes centrā, ir homogēnākas, morfoloģiski labāk atšķiramas un, iespējams, vairāk reproduktīvi izolētas, savukārt ģints izplatības areāla malās notiek hibridizācija un jaunu sugu

veidošanās. Tā kā Rietumeiropa ir *Saussurea* ģints izplatības areāla rietumu mala, tas izskaidro Alpu rūglapes daudzveidību un iespējamību, ka šī suga nav monofilētiska. Rezultāti parāda, ka Igaunijas rūglape ir tuva Norvēģijas un Itālijas Alpu rūglapēm (kas, iespējams, ir *S. alpina* ssp. *alpina*), savukārt *S. alpina* no Austrijas, kas, analizējot ar ITS praimeriem, bija radniecīgāka *S. discolor*, varētu būt cita *S. alpina* pasuga. Lai precīzi varētu pateikt, vai Igaunijas rūglape ir Alpu rūglapes pasuga, nepieciešams lielāks paraugu skaits un precīzāka informācija par *S. alpina* citzemju paraugiem.

4.6. Sugas ilgtermiņa saglabāšana un citu aizsargājamo sugu stratēģijas izstrāde

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

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

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

Ļoti nopietns drauds sugas pastāvēšanai ir zemā sēkļu kvalitāte, kas samazina *S. esthonica* iespējas vairoties ģeneratīvi. Daļēji to kompensē auga spēja vairoties veģetatīvi, tomēr nav īsti skaidrs, kādi apstākļi uzlabotu auga spēju veidot ģeneratīvos dzinumus, jo ziedu skaits ir mazs. Arī citu augu saglabāšanas stratēģijas izstrādē sugas vairošanās īpatnību un potenciāla noteikšana varētu būt nozīmīga.

SECINĀJUMI

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

PATEICĪBAS

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

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

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

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

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

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

Izsaku pateicību LU Bioloģijas fakultātes Augu fizioloģijas katedras darbiniekiem Dr. biol. Inetai Samsonai, Dr. biol. Unai Andersonai, Dr. biol. Jevgenijai Nečajevai, Dr. biol. Dacei Megrei par sniegto palīdzību darba tapšanā un Dr. biol. Mārai Vikmanai, Dr. biol. Uldim Kondratovičam un Dr. biol. Nilam Rostokam par ieteikumiem darba uzlabošanai.

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

University of Latvia
Department of Biology

Agnese Gailīte

PHYSIOLOGICAL AND GENETIC ASPECTS OF ESTONIAN
SAW-WORT (*SAUSSUREA ESTHONICA*) CONSERVATION

Summary of Doctoral Thesis

In Partial Fulfillment of the Requirements
of the Doctor Degree in Biology
Subdiscipline of Plant Physiology

Riga, 2012



The doctoral thesis was carried out at the Latvian State Forest Research Institute „Silava” from 2008 to 2011.



IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ

This work has been supported by the European Social Fund within the project «Support for Doctoral Studies at University of Latvia» Nr.2009/01381/ IDP/1.1.2.1.2./ 09/IPIA/ VIAA/004.

The thesis contains the introduction, 4 chapters, list of references.
Form of the thesis: dissertation in biology, plant physiology

Supervisor: Dr. habil.biol., prof. Gederts Ievinsh.

Scientific consultants: Dr.biol. Dace Kļaviņa, Dr.biol. Dainis Ruņģis.

Reviewers:

- 1) Anita Osvalde, Dr. biol., leading researcher, Institute of Biology, University of Latvia,
- 2) Nils Rostoks, Dr. biol., leading researcher, University of Latvia,
- 3) Inga Straupe, Dr. silv., asoc. prof., Latvia University of Agriculture.

The thesis will be defended at the public session of the Doctoral Committee of Biology, University of Latvia, at 14.30 on December 19, 2012 at the Faculty of Biology, Kronvalda bulv. 4, auditorium No. 2.

The thesis is available at the Library of the University of Latvia, Riga, Raiņa bulv. 19-203.

This thesis is accepted for the commencement of the degree of Doctor of biology on December 19, 2012 by the Doctoral Committee of Biology, University of Latvia.

Chairman of the Doctoral Committee _____/ Dr. biol., prof. Guntis Brūmelis /

Secretary of the Doctoral Committee _____/Daina Eze/

ANOTATION

The research described in the doctoral thesis has been carried out at the Latvian State Forest Research Institute „Silava”. The aim of the research was to undertake a comprehensive study on the biology of Estonian saw-wort (*Saussurea esthonica* Baer ex Rupr.) in order to obtain biological information and to elucidate approaches for conservation of this endangered species. It is important to use nondestructive methods of analysis for investigation of rare plant species in natural conditions. The research examined *in vitro* culture, physiology, reproduction and genetic analyses. Parallel to *in situ* protection, development and application of *ex situ* conservation strategies should be undertaken. It is possible to propagate plants *in vitro* for use in experimental research to avoid damaging natural populations. *In vitro* culture experimental results showed that BAP is the optimal cytokinin for proliferation *in vitro*, however 2-iP promotes root formation. For determining the main factors which affect species survival in natural populations, research about the influence of environmental factors on photosynthesis related parameters was performed with non-destructive methods. Estonian saw-wort is a species found in calcareous wet meadows and fens, therefore changes in growth and photochemistry of photosynthesis with respect to mineral nutrition and soil moisture in controlled conditions were investigated. Reproductive success is one of the factors which affects species and population viability. Estonian saw-wort can propagate both generatively and vegetatively and may produce several new shoots per plant promoting vegetative propagation. This is important for species survival because seed quality is low. Treatments with GA₃ or KNO₃ promoted germination. To estimate the ability of this species to adapt to changing environmental conditions and to maintain long term viability, genetic diversity among and within populations in Latvia and Estonia was estimated. Latvian populations have a relatively high level of genetic diversity and most of genetic variation was found within populations. Investigation of the phylogenetic relationship of *S. esthonica* with eight other *Saussurea* species, including three European species: *S. alpina*, *S. pygmaea* and *S. discolor*, utilising two different molecular marker techniques showed that *S. discolor* and *S. alpina* formed one cluster with *S. esthonica*. The results from this investigation support a close relationship between these species.

TABLE OF CONTENTS

General description.....	37
1. Summary of the existing scientific information in the research area.....	40
2. Materials and methods.....	44
3. Main results	47
4. Discussion	56
Conclusions	63
Acknowledgements	64
References	65

GENERAL DESCRIPTION

Importance of the subject, aim and tasks of this study

It is argued that 20 to 30% of the currently known species may be lost due to global climate change and a decrease of the habitats of native species is possible. Research, which helps to understand the approaches and the necessary measures for conservation of biodiversity, at the ecosystem level, between species and populations is necessary. Therefore the main tasks emphasized in documents for planning biodiversity conservation are conservation, research and sustainable use of global biological diversity.

To comprehend the genetic and ecological factors which affect the existence and survival of endangered plant species, estimation of population genetic diversity, reproduction potential and the influence of environmental factors on population long-term survival is essential. Wild vascular plants often reproduce both generatively and vegetatively.

There are two main methods to protect wild species – conservation in natural habitats (*in situ*) and conservation outside natural habitats (*ex situ*). The main method utilised for species conservation is *in situ*, nevertheless parallel to *in situ* protection, in particular cases, *ex situ* conservation strategies such as development of threatened plant collections and seed banks are also necessary for species protection. To ensure maintenance of biological and genetical diversity *ex situ*, species are kept in tissue culture collections (*in vitro*), seed banks or field collections (mainly in botanical gardens). *In vitro* methods can be used for creating plant gene banks, especially for species with low reproduction potential. Therefore it is important to create optimal methods for micropropagation.

In numerous situations, knowledge about plant biology could play an essential role in developing plans for species protection. Therefore research on endangered plant biology is required, because this information is currently very scarce in Latvia. Estonian saw-wort (*S. esthonica* Baer ex Rupr.), was taken as a research object, because it is an endangered species, without a species protection plan, and information about this species is scarce. Therefore the obtained results could be utilised as a basis not only for development of a protection plan for this species, but also to help to understand the amount of information and research required and threats for protection of other species.

The **aim of the study** was to undertake a comprehensive study on the biology (including *in vitro* culture, physiology, genetics and reproduction) of Estonian saw-wort (*Saussurea esthonica* Baer ex Rupr.) in order to obtain biological information about this species and to elucidate approaches for conservation of this endangered species.

To achieve this aim the following **scientific tasks** were formulated:

- 1) to perform *in vitro* research with particular attention to the influence of cytokinin on proliferation and rhizogenesis.
- 2) to perform *in situ* physiological research with non-destructive physiological analysis methods in successive three years.
- 3) according to obtained results, perform physiological experiments in controlled conditions.

- 4) to analyse species reproduction with seed germination studies to determine seed quality and treatments for germination and to determine the extent of vegetative reproduction.
- 5) to analyse population genetic diversity of *S. esthonica* and to perform phylogenetic analysis of several *Saussurea* species.

Main thesis for defence

1. Comprehensive research of species biology including genetics and physiology in natural and controlled conditions is essential for development of species conservation strategies.

2. Conservation of protected species *in vitro* provides long-term preservation of genetic material and acts as source material for study of species without damaging natural populations.

3. If unfavourable changes in environmental conditions are small, changes in plant vitality are best indicated by chlorophyll *a* fluorescence parameters PI and RC/ABS.

Methods utilized in the research

Plant micropropagation methods were used – *in vitro* culture establishment, proliferation, rhizogenesis and transfer to *ex vitro* conditions. *In vitro* obtained plants for several *Saussurea* species were used for DNA extraction. For analysis of the influence of cytokinin on root formation *in vitro*, methods were used. Micropropagated plants were also used for physiological experiments in controlled conditions.

Chlorophyll content and chlorophyll *a* fluorescence measurements in natural and controlled conditions were used, to obtain photosynthesis related parameters with non-destructive methods.

For germination tests with different treatments, classical germination tests in Petri dishes were performed.

AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), iPBS (*Inter-Primer Binding Sites*) and ITS (*Internal Transcribed Spacer*) molecular marker techniques were utilised for genetic research. The AFLP and iPBS methods were used for genetic diversity studies, and the iPBS and ITS marker methods - for phylogeny analyses.

List of original papers

Gailite A., Rungis D. 2012. An initial investigation of the taxonomic status of *Saussurea esthonica* Baer ex Rupr. utilising DNA markers and sequencing. *Plant Systematics and Evolution* 298 (5): 913-919.

Gailīte A., Ievinsh G., Ruņģis D. 2011. Genetic diversity analysis of Latvian and Estonian *Saussurea esthonica* populations. *Environmental and Experimental Biology* 9: 115–119.

Gailīte A., Kļaviņa D., Ievinsh G. 2010. *In vitro* propagation of an endangered plant *Saussurea esthonica*. *Environmental and Experimental Biology* 8: 43–48.

Gailīte A., Ruņģis D., Ieviņš Ģ. 2010. Preliminary studies on the genetic diversity of an endemic and endangered species *Saussurea esthonica* Baer ex Rupr. in Latvia. *Acta Biol. Univ. Daugavp.* 10 (1): 37-42.

Gailīte A., Ievinsh G. Understanding reproductive potential for species conservation: *Saussurea esthonica* in Latvia. *Annales Botanici Fennici* (manuscript prepared for submission).

Approbation of the research, published thesis

Results of the research included in the doctoral thesis have been presented at 5 international and 3 national level scientific conferences.

Gailite A., Rungis D. 2012. Genetic diversity of Latvian and Estonian *Saussurea esthonica* populations and phylogenetic comparison with *S. alpina* and *S. discolor*. 5th Baltic Congress of Genetics. Kaunas, Lithuania. Book of Abstracts 33-34.

Gailite A., Karlsons A., Ievinsh G. 2012. Ecophysiology of *Saussurea esthonica*: changes of growth and photochemistry of photosynthesis in respect to mineral nutrition and soil moisture. Plant Biology Congress, Freiburg, Germany. Book of Abstracts 505-506.

Gailīte A., Ieviņš Ģ. 2012. Estonian saw-wort (*Saussurea esthonica*) ecophysiology: effect of mineral nutrition and watering regime. 70th conference of the University of Latvia, Rīga, Latvia.

Gailīte A., Kļaviņa D. 2011. *In vitro* seed germination capacity of *Saussurea* species. International scientific conference „Advances in Plant Biotechnology in Baltic Sea Region“ Kaunas, Lithuania. Abstract Book 51-52.

Gailīte A. 2011. Factors influencing seed germination of *Saussurea esthonica* Baer ex Rupr. 6th international conference “Research and Conservation of Biological Diversity in Baltic Region” Daugavpils, Latvia. Book of Abstracts P. 49.

Gailīte A., Ruņģis D. 2011. Igaunijas rūgtlapes ģenētiskās daudzveidības izpēte. LU 69. konference Rīga, Latvija.

Gailīte A., Andersone U., Samsone I., Ruņģis D., Ieviņš Ģ. 2010. Dynamics of parameters related to photosynthesis in the leaves of Estonian saw-wort in natural conditions. 68th conference of the University of Latvia, Rīga, Latvia.

Gailīte A., Ruņģis D., Ieviņš Ģ. 2009. Preliminary studies on the genetic diversity of an endemic and endangered species *Saussurea esthonica* Baer ex Rupr. in Latvia. 5th international conference “Research and Conservation of Biological Diversity in Baltic Region” Daugavpils, Latvia. Book of Abstracts P. 42.

Structure of the doctoral thesis

This doctoral thesis contains 93 pages, including 19 tables and 35 figures. The doctoral thesis consists of introduction, four chapters and 11 conclusions. 205 references are included.

1. SUMMARY OF THE EXISTING SCIENTIFIC INFORMATION IN THE RESEARCH AREA

1.1. General description of the species and its position in Latvia

Estonian saw-wort [*S. esthonica* Baer ex Rupr., *S. alpina* (L.) DC. subsp. *esthonica* (Baer ex Rupr.) Kupffer, *S. alpina* auct.] is a perennial species of the family *Compositae*, with bisexual disk flowers set in capitula (Andrušaitis 2003). The genus *Saussurea* comprises of about 400 species and the centre of origin is in Central and Eastern Asia. The distribution area of this genus is from West Europe to North America (Lipschitz 1979). Estonian saw-wort is widespread in the Baltic region – Latvia, Estonia and the Leningrad region in Russia (Ingelög *et al.* 1993). *S. esthonica* is an endangered species in Latvia, and is included in the Red Data Book of Latvia, in the European Union Directive on Conservation of Species and Habitats and in the National Biological Diversity Monitoring Programme (Kļaviņa *et al.* 2004). Between 1930 and 1991, this species was considered to be extinct in Latvia. However, in 1991, a Latvian population first described in 1884 was rediscovered, along with another new population (Andrušaitis 2003). There are two known populations of *S. esthonica* in Latvia – in the protected wetlands in the vicinity of Apšuciems and Pope (Andrušaitis 2003). This species is included in the collection of threatened plant species in the National Botanic Garden (*in vitro* and field collection) (Kļaviņa, Šmite 2009). In the European Red List of Vascular Plants *S. esthonica* is named as a data deficient taxon (Bilz *et al.* 2011).

Estonian saw-wort has been classified both as a separate species, as well as a subspecies of Alpine saw-wort (*S. alpina* ssp. *esthonica* (Baer ex Rupr.) Kupff.) (Narits *et al.* 2000; Kell *et al.* 2005). Alpine saw-wort is an arcto-alpine plant (Stevanović *et al.* 2009) with wide distribution area from China to Central and North Europe, growing in alpine steppes and rocky and scree slopes (Lipschitz 1979; Shi *et al.* 2011). In the Crop Wild Relative Information System four subspecies of Alpine saw-wort are reported - *S. alpina* subsp. *alpina*, *S. alpina* subsp. *depressa* and *S. alpina* subsp. *macrophylla*, *S. alpina* subsp. *esthonica* (Kell *et al.* 2005). In Europe, this genus is represented by three to nine or more species depending on the species definition (Dickore 2001, Narits *et al.* 2000).

1.2. *In vitro* culture for preservation of threatened species

In vitro methods are useful for creating *in vitro* collections, for species with low reproductive potential (Paunescu 2009). These methods allow a large number of species to be kept in a relatively small area, as well as renewal of natural populations (Edson *et al.* 1997).

The main steps for creating an *in vitro* collection are: disinfection of explants and culture initiation, cultivation (maintenance) and propagation, long-term storage (Paunescu 2009). If plants are to be used for reintroduction or as expositions in botanical gardens, the final steps are plant rooting and transfer to *ex vitro* conditions. There are some important preconditions for every step for successful *in vitro* culture maintenance. Usually seeds are used as explants for establishment of endangered plant

cultures. Nevertheless, in some cases seeds are not accessible and other parts of plants are used for *in vitro* culture establishment (Fay 1992).

There are some published studies about propagation of species of the genus *Saussurea* by tissue culture (Arora, Bhojwani 1989; Guo *et al.* 2007; Dhar, Joshi 2005), but this method is based on creating cultures via callus, which is not suggested for preservation of rare plant species (Fay 1992).

MS (Murashige & Skoog 1962) medium with various modifications is mainly used (Fay 1992; Holobiuc, Blindu 2007; Kļaviņa *et al.* 2004; Paunescu 2009; Sarasan *et al.* 2006), and auxins and cytokinins are added as plant growth regulators. Cytokinins are widely used for stimulating cell division, adventitious bud and shoot formation and root morphogenesis (Gaspar *et al.* 1996; Subotić *et al.* 2009). They reduce primary root growth and lateral root density (Laplaze *et al.* 2007). The role of cytokinins is not completely known, but root architecture is altered in their presence (Kuroha, Satoh 2007). Root length and diameter are the main measurements for comparison and description of root systems (Bouma *et al.* 2000), therefore they are useful for analysing the effect of different plant growth regulators. The optimal concentration of each plant growth regulator in medium is dependent on species, cultivation conditions and the particular plant growth regulator. At high concentrations, cytokinins can promote somaclonal variation (Chuenboonngarm *et al.* 2001), therefore for conservation of rare species the use of optimal cytokinin concentrations is necessary.

1.3. Photosynthesis related parameters as indicators of plant response to environmental factors

Use of non-destructive methods is important for threatened plant research, to obtain information about plant physiological parameters without damaging natural populations. Two of these methods are chlorophyll content and chlorophyll fluorescence measurement using optical methods. These methods are important for ecophysiological studies of wild plants in natural habitats (Mohammed *et al.* 2003; Samsone *et al.* 2007). Both methods allow repeated measurement of the same plant material over a prolonged period.

Photochemical processes determine the effectiveness of photosynthesis and are closely related to leaf chlorophyll content, which is affected by light intensity, mineral nutrition, leaf senescence (Richardson *et al.* 2002), leaf moisture content and diurnal rhythm (Samsone *et al.* 2007). Decrease of chlorophyll content in leaves indicates plant stress (Netto *et al.* 2005).

Chlorophyll fluorescence is a sensitive reaction and is dependent on the leaf physiological state and allows for the rapid estimation of the individual condition of each plant. Changes in fluorescence appear in response to heat, cold, drought, submergence, mineral nutrition and soil quality (Sayed 2003; Baker, Rosenqvist 2004).

1.4. Influence of mineral elements on wild plant growth

Environmental and soil properties affect soil mineral availability, nutrient uptake, as well as accumulation within the plant (Osvalde 2011). Nutrient acquisition from the soil is dependent on root morphological parameters (number, length, thickness, density), physiological (root / shoot ratio, root microorganisms, water uptake), biochemical

parameters and diffusion and mass flow (Baligar *et al.* 2001). Mineral elements act as synergists or antagonists and excess or deficiency of one element can inhibit or stimulate the uptake of other nutrients (Osvalde 2011), e.g. if soil has an excess of iron, then uptake of other elements, especially micronutrients from the soil decreases (Rinçis, Ramane 1989).

Plants growing in calcareous soils are well adapted to high calcium content in soil and avoid calcium excess in leaves by maintaining calcium in soluble forms. These plants have higher phosphorus concentration in leaves in comparison with calcifuge plants or those which are growing in acidic soils (Zohlen, Tyler 2004). In limestone soils with low moisture content, calcicole plants have better uptake of iron, zinc and calcium, but in elevated moisture content – potassium, manganese, magnesium and phosphorus, nevertheless, element uptake is strongly dependent on plant species (Misra, Tyler 1999).

Many elements available in soil are toxic for plants even at quite low concentrations. Mechanisms of toxicity may act by altering the permeability of cell membranes, by reacting with essential metabolites, or by replacing one another in enzymatic pathways and receptor proteins. The result is root growth inhibition as well as reduction of photosynthetic pigments (Fargašová 1998).

1.5. Influence of moisture and drought

Plants growing in natural habitats are well adapted to changing water levels. The effect of excess water on poorly adapted species is the threat of oxygen deficiency in tissues below water level, as well as accumulation of products of anaerobic metabolism by soil micro-organisms (e.g. Mn^{2+} , Fe^{2+} , S^{2-} , H_2S and carboxylic acids) (Jackson, Colmer 2005). Cytokinin synthesis in roots decreases as well as supply to above ground tissues. The chlorophyll content in leaves decreases (Clua *et al.* 2009; Panda *et al.* 2006) and photosynthesis changes (Kozłowski 2002) during submergence. Nevertheless, in submergence tolerant plants, leaf chlorophyll content is high (Das *et al.* 2009; Macek 2006). Submergence induces an increase of ethylene and GA_1 , promoting shoot elongation and decline of endogenous abscisic acid (Voesenek *et al.* 2003). Absorbtion of mineral elements in excess water conditions decreases (Kozłowski 2002).

Photoinhibition is observed during drought conditions. Plants can avoid photoinhibition by reducing light absorbance or increasing use of alternative sinks for the absorbed light. One method is reduction of chlorophyll content, which reduces light absorption, without reduction of photochemical activity. To avoid photoinhibition, the main responses are an increase of respiration and thermal dissipation together with decrease of leaf light absorbance (Galmés *et al.* 2007).

1.6. Factors influencing seed germination in wild species

Seed germination is an important part of the life cycle of plants and depends on seed quality, environmental conditions and in several cases is related to seed dormancy.

Abscisic acid (inhibitor) and giberellins (promoter) generally act as antagonists to control breaking of dormancy and germination. Abscisic acid controls seed development and initiation of dormancy, in contrast, giberellins function to promote and maintain germination (Kermonde 2005). These phytohormones regulate initiation,

maintenance and breaking of dormancy. Ethylene is involved in these processes as well by reducing seed sensitivity to endogenous abscisic acid. In natural environments germination is affected by seed quantity, successful semination and accessibility of suitable sites for germination, i.e., sites where germination can be successful (Shimono, Washitani 2004). Suitability of sites for germination is affected by temperature fluctuations, light regime or canopy shading as well as season.

The number of seeds without dormancy and type of dormancy can vary between years and among species, dependent on location within flowers or fruits, and can be influenced by environmental factors at the time when seeds were harvested (Baskin, Baskin 2004).

1.7. Vegetative reproduction

Wild plants often have both vegetative and generative modes of reproduction. Vegetative growth forms are varied and have arisen during species evolution and as adaptations to particular environmental conditions (Klimeš, Klimešová 1999; Klimeš 2008). Over the past decades, considerable progress has been made in research on the influence of environment and plant community on clonal growth (Tamm *et al.* 2002; Sammul *et al.* 2004; Klimeš 2008). The main descriptive factors of vegetatively propagating plants are distribution in time and space and ramet longevity (Groenendael *et al.* 1996; Tamm *et al.* 2002). There is a lack of published data about vegetative growth types of *Saussurea esthonica*, nevertheless, vegetative reproduction is one of the essential factors for long-term survival of species. There is data about *Saussurea obvallata* generative and vegetative (with rhizomes) reproduction (Dhar, Joshi 2005) and *Saussurea alpina* vegetative propagation by stolons (Hill *et al.* 2004).

1.8. Molecular marker techniques and their application to plant biology research

Genetic factors play an essential role for long-term preservation of species, therefore genetic diversity studies among and within populations using morphological, biochemical and DNA markers are widely used. The most recent methods utilise DNA markers, e.g. nucleotide sequences that are representative of the differences at the genome level (Agarwal *et al.* 2008). Different DNA marker techniques, e.g. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Vos *et al.* 1995) are used to analyse genetic diversity within and among populations. One recently developed DNA marker method is the iPBS (Inter Primer Binding Site) technique based on retrotransposon sequences (Kalendar *et al.* 2010). For phylogeny studies ITS (Internal Transcribed Spacers) are often used (Poczai, Hyvönen 2010). There are few reports about molecular marker studies of the genus *Saussurea* (Raab-Straube 2003; Wang, Liu 2004), due to the large size of this genus and high intra-specific genetic diversity. Species-specific molecular markers have not been developed for this genus, therefore for molecular research, utilisation of anonymous DNA marker techniques is necessary.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Study sites and conditions

In situ ecophysiological studies were undertaken and leaf material for genetic analyses were collected from both populations in Latvia (referred to in the text by the name of the closest settlement – Apšuciems and Pope) and two populations in Estonia (Pärnu-Jaagupi and Kalevi). The populations in Latvia are located in Natura 2000 protected areas Micro-reserve Dubļukrogs and Nature reserve Popes zāļu purvs. In Latvia *S. esthonica* inhabits fens with calcareous soils. In Estonia according to Narits *et al.* (2000) Pärnu-Jaagupi is a *Molinia* site type and Kalevi – rich paludified grassland. *S. esthonica* can form either leaf rosettes without flowering (vegetative plants) or flowers with leaves on flowering stems (generative (flowering) plants).

2.2. *In vitro* studies

Twenty five seed accessions from Europe and Asia representing 11 species were obtained from 14 botanical gardens through the *Index Seminum* and were germinated in aseptic conditions using *in vitro* methods. Two media were used: hormone-free medium consisting of half-strength MS (Murashige & Skoog 1962) macronutrients and a medium with $\frac{1}{4}$ MS macronutrients supplemented with 0.2 mg L^{-1} kinetin. Contamination, germination percentage and speed of germination were measured.

To determine the role of cytokinins on shoot proliferation and root formation, microshoots were cultivated on hormone free medium for 2 weeks and then transferred to media supplemented with $\frac{1}{2}$ and 1MS macronutrients, 3% sucrose, 0.6% agar, kinetin at concentrations $0.5\text{-}2 \text{ mg L}^{-1}$, 6- (γ , γ -dimethylallylamino) purine (2-iP) – $0.25\text{-}1 \text{ mg L}^{-1}$ or 6-benzylaminopurine (BAP) – $0.25\text{-}1 \text{ mg L}^{-1}$. Media supplemented with $\frac{1}{2}$ and 1MS macronutrients and without plant growth regulators were used as controls. Shoots were cultured in jars (300 ml) containing 50 ml of medium. Each treatment consisted of 30 microshoots in three replicates. After four weeks of cultivation, percentage of explants producing shoots, number of shoots and roots were counted. Roots produced in media supplemented with kinetin and 2-iP were captured with a scanner PERFECTION V750 PRO (Epson) and analysed using the image analysis system WinRHIZO 2008 to evaluate root morphology. Total root length per plant, surface area, average diameter and number of tips were measured. All *in vitro* cultures were incubated in a growth chamber at $24 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ under a 16 h photoperiod regime.

2.3. Ecophysiological research

2.3.1. Studies in natural conditions

Data were collected *in situ* over three years (2009-2011) three times per growing season (from June to September) in both Latvian *Saussurea esthonica* populations and in July from 2009 to 2011 in both populations in Estonia. Chlorophyll content was measured by chlorophyll meter SPAD 502 (Konica-Minolta, Japan) in SPAD units. Chlorophyll fluorescence parameters were measured using chlorophyll a fluorometer Handy PEA (Hansatech Instruments, UK) and F_v/F_m , F_v/F_0 , PI and RC/ABS were estimated.

2.3.2. Studies in controlled conditions

Four substrates were used with different concentrations of mineral nutrients. Substrate containing mineral elements at concentrations optimal for crop plants with added dolomite dust was used as a control. The second substrate was similar to soil from the Apšuciems site, with increased iron and manganese concentrations. The third substrate was similar to soil from the Pope site, and the fourth substrate (Pope +) was the third substrate improved with nitrogen and sulphur. Substrates were developed by Dr. biol. Andis Karlsons at the Institute of Biology, University of Latvia, Plant Mineral Nutrition Laboratory. *In vitro* propagated plants were replanted into pots (9×9×10 cm) with the respective substrate. During the experiment, plant vitality (in grades), percentage of growing plants and number of leaves was counted. Once in a week leaf chlorophyll content and chlorophyll *a* fluorescence was measured.

A study of the effect of differing moisture regimes was done using the Pope + substrate. *In vitro* propagated plants were replanted into pots (9×9×10 cm) and after 3 weeks divided into four groups with different moisture regimes - 100% (optimal), 90% (dry), 150% (damp) and 200% (flooded) (these regimes were maintained by weighing the pots). The wet regime was maintained by placing pots in 3 cm of water. During the experiment, plant vitality (in grades), percentage of growing plants and number of leaves was counted. Once a week leaf chlorophyll content and chlorophyll *a* fluorescence was measured.

2.4. Reproduction

2.4.1. Germination studies

S. esthonica seeds for germination studies were collected in 2009 and 2010 from natural populations and in 2011 from the National Botanic Garden. Seeds from 33 capitula were collected from 5 plants from the natural populations. Seeds were measured using graph paper and the proportion of each seed size class was determined. Empty seeds were identified visually and also counted.

Seeds were dried, inspected visually and empty seeds were discarded. To determine the correlation between germination and seed size, seeds of different classes (3, 4 and 5 mm) were soaked in GA₃ (at three concentrations - 10⁻² M, 10⁻³ M, 10⁻⁴ M), 0.2% KNO₃ solutions and distilled water overnight, then transferred to Petri dishes lined with a double layer of filter paper moistened with each respective solution and transferred to an incubator KB 53 (BINDER) and incubated at 22 °C in darkness.

To perform germination tests in different treatments, 4 mm length seeds in three replications were used. Seeds were divided into two portions – one stored at 4 °C for one month and the other stored at 17 °C before the germination experiment. Seeds were soaked in H₂O, GA₃ (at three concentrations - 10⁻² M, 10⁻³ M, 10⁻⁴ M) and 0.2 % KNO₃ solutions overnight, then transferred to Petri dishes lined with a double layer of filter paper moistened with each respective solution. The seeds were germinated under two light regimes - dark and a 16 h daily photoperiod provided by cool white light in a climate chamber (SELECTA). The temperature was held constant at 22 °C. The number

of germinated seeds was counted at periodic intervals for 4 weeks and the germination rate was calculated.

2.4.2. Vegetative reproduction

Ten seedlings from the germination test were planted in pots in the spring of 2010, and overwintered in open air conditions. At the end of April in 2011 and 2012, when shoots start to grow, the number of shoots per pot was counted, and in June flowering shoots were counted. In 2011, two plants with vegetative shoots were removed from pots to observe the type of vegetative growth.

2.5. Genetic diversity of *Saussurea esthonica* and phylogenetic analysis of the genus *Saussurea*

2.5.1. Genetic diversity analysis of *Saussurea esthonica* populations in Latvia

Leaves of 29 randomly chosen plants from the Apšuciems population and 24 randomly chosen plants from the Pope population were used for DNA extraction using a protocol based on the Fermentas Genomic DNA purification kit. The DNA concentration of each sample was measured using a UV/VIS spectrometer Lambda 25. For genetic diversity studies, two DNS molecular marker methods were used: iPBS (*Inter Primer Binding Site*) and AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*).

2.5.2. Genetic diversity analysis of Latvian and Estonian *Saussurea esthonica* populations

Four PBS primers were used for genetic analysis: 2001, 2076, 2081, 2083 (Kalendar *et al.* 2010). The iPBS marker analysis was performed using two methods – one utilising ethidium bromide staining and the other utilising fluorescently labelled PBS primers. For both methods a binary data matrix was constructed. Results were analysed using GenAlEx 6 (Peakall, Smouse 2006).

2.5.3. Investigation of the taxonomic status of *Saussurea esthonica*

For phylogenetic analysis iPBS and ITS methods were used. Amplified products obtained with iPBS method were separated using an ABI PRISM 3130xl Genetic Analyser and amplification fragments were genotyped using GeneMapper v4.0, and a binary data matrix was constructed. Results were analysed using GenAlEx 6 (Peakall and Smouse 2006). Phylogenetic trees were constructed using the Neighbour-Joining cluster analysis in the MEGA version 4 software (Tamura *et al.* 2007). ITS sequencing analysis was performed on an ABI PRISM 3130xl Genetic Analyser and data analysed by using the programme MEGA version 4 (Tamura *et al.* 2007).

3. MAIN RESULTS

3.1. *In vitro* studies

3.1.1. *In vitro* germination of *Saussurea* sp.

The germination rate on hormone-free medium with $\frac{1}{2}$ MS macronutrients was 14.3% and in $\frac{1}{4}$ MS medium supplemented with kinetin 16.6%. Germination rate varied from 13% of one accession of *S. alpina* to 100 % of *S. maximowiczii*. In total, 92% of seeds germinated within 3 weeks, 6% – in the following two weeks and the remaining 2 % of seeds germinated within 3 months.

3.1.2. *Effect of cytokinins on proliferation and rooting of in vitro cultures of Saussurea esthonica*

The microshoots on medium without cytokinins failed to multiply. The percentage of explants producing shoots and number of shoots per explant were higher in cultures supplemented with BAP. The number of shoots per explant cultivated on media with full strength MS macronutrients supplemented with BAP ($p < 0.05$) was significantly higher. There was no significant difference between treatments with $\frac{1}{2}$ and 1 MS macronutrients except for media supplemented with 1 mg L^{-1} BAP ($p < 0.05$). Shoot length fluctuated between 0.8 and 3.3 cm, but the difference was not significant. However, the shoot length decreased with increasing BAP concentrations.

The best results with respect to root formation were obtained in hormone-free medium and media with 2-iP. Less than 30% of explants cultivated on media with BAP produced roots. Obtained roots were short and thick without lateral roots. Higher concentrations of BAP decreased root formation and number of roots. Kinetin reduced total root length, but treatment with 2-iP showed no difference from the control.

All root parameters for explants grown on $\frac{1}{2}$ MS were significantly different between kinetin and 2-iP, however, neither cytokinin treatment was significantly different from the control. With 1 MS media, no significant differences were found between growth substance treatments or the control. Treatments with kinetin tended to have thinner roots than treatments with 2-iP. Root length and surface area tended to decrease with increasing cytokinin concentrations. Treatment with 2-iP at a concentration of 0.25 mg L^{-1} resulted in an increase in root length in comparison with the control. This relationship was independent of MS macronutrient concentration. The number of root tips indicated the degree of root branching. Treatments with $\frac{1}{2}$ MS macronutrients promoted branching and treatments with 2-iP increased the number of roots in comparison with the control.

3.2. Ecophysiological studies

3.2.1. *Studies in natural conditions*

Leaf chlorophyll content changed slightly during the growing season. There was a tendency for chlorophyll content to decrease in September (Fig.1). A significant difference was observed between Apšuciems generative plants in 2009 and vegetative and generative plants in Apšuciems in 2010 and 2011.

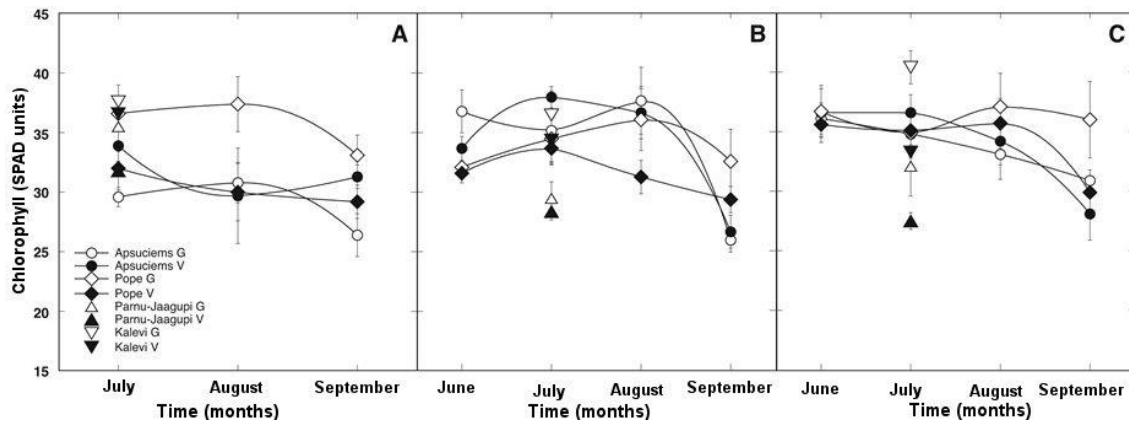


Fig. 1. Seasonal changes in chlorophyll content in 2009 (A), 2010 (B), 2011 (C) in the leaves of generative (G) and vegetative (V) *Saussurea esthonica* plant growing in natural conditions in different habitats.

Comparing vegetative and generative plants, the parameter F_v/F_m was slightly higher in vegetative plants (Fig. 2). A significant difference was found in F_v/F_m in vegetative plants in August 2010 in Pope and September 2010 in Apšuciems, and in August 2011 in the Apšuciems population. Plants from both populations in Estonia had the same or slightly higher F_v/F_m than in Apšuciems (except in July 2011).

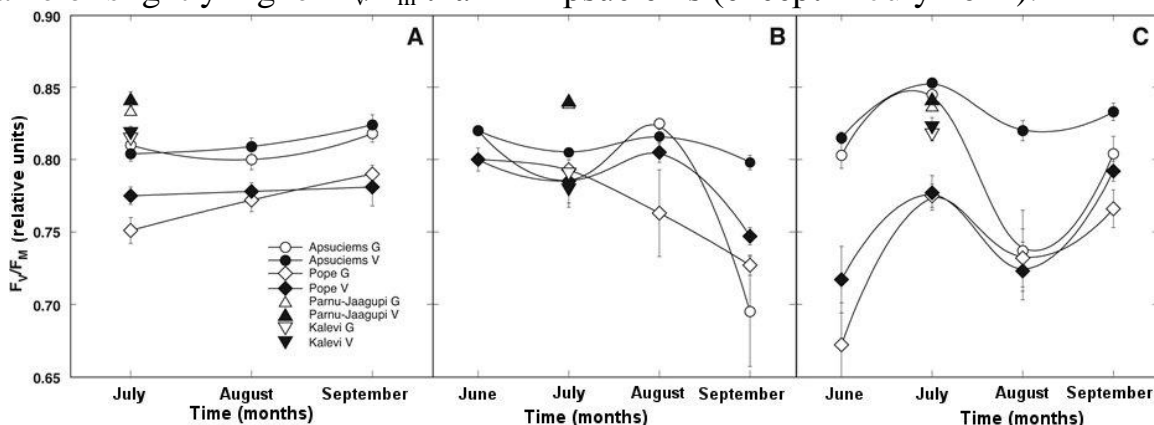


Fig. 2. Seasonal changes of the chlorophyll fluorescence parameter F_v/F_m in 2009 (A), 2010 (B), 2011 (C) in the leaves of generative (G) and vegetative (V) *Saussurea esthonica* plants growing in natural conditions in different habitats.

Changes in the complex fluorescence parameter Performance Index (PI), which characterizes plant physiological vitality, showed similar trends as F_v/F_m , but with less variation at lower values and greater variation at higher values (Fig. 3). During the 2009 growing season, no drastic fluctuations in PI were observed, however in August 2010 and June to August 2011, PI in the plants from the Apšuciems population increased significantly. All measurements of PI in plants from the Pope population were significantly lower than the Apšuciems plants. Differences in PI between generative and vegetative specimens were not statistically significant, except in August 2010 in Apšuciems, September 2010 in Apšuciems and Pope, as well as throughout the 2011 growing season in Apšuciems.

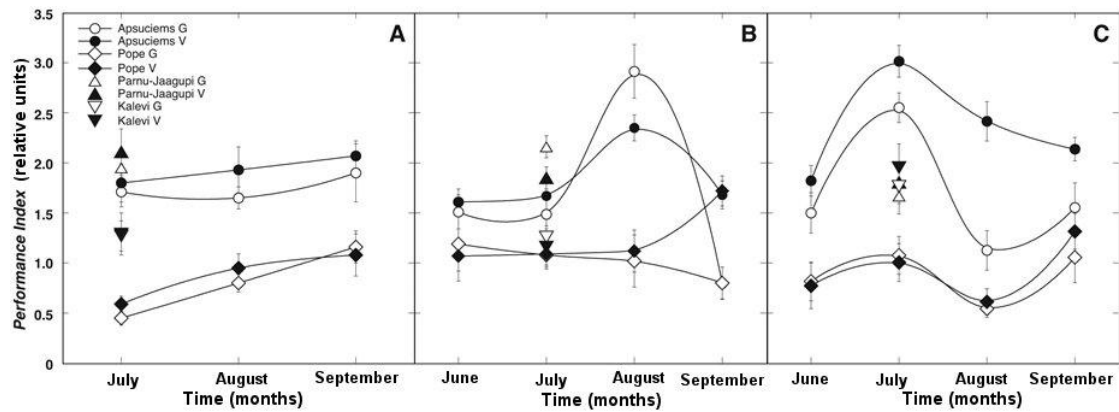


Fig. 3. Seasonal changes of the chlorophyll fluorescence parameter PI in 2009 (A), 2010 (B), 2011 (C) in the leaves of generative (G) and vegetative (V) *Saussurea esthonica* plants growing in natural conditions in different habitats.

Changes in F_v/F_0 in *S. esthonica* plant leaves were similar to changes in PI, but with significantly smaller amplitude. Significantly higher levels of F_v/F_0 were measured in the leaves of the Apšuciems plants throughout the 2009 growing season. In 2010 it was similar to the Pope population F_v/F_0 measurements, while in 2011, differences between the populations were observed in June and July, while in August and September, it was measured at high levels only in vegetative plants. Also, changes in the parameter characterizing the proportion of active reaction centers (RC/ABS) (Fig. 4) were similar to changes in PI and F_v/F_0 . The observed changes of RC/ABS were greater in amplitude than F_v/F_0 , but smaller than changes in PI. Typically, RC/ABS was higher in plants from the Apšuciems population than Pope plants.

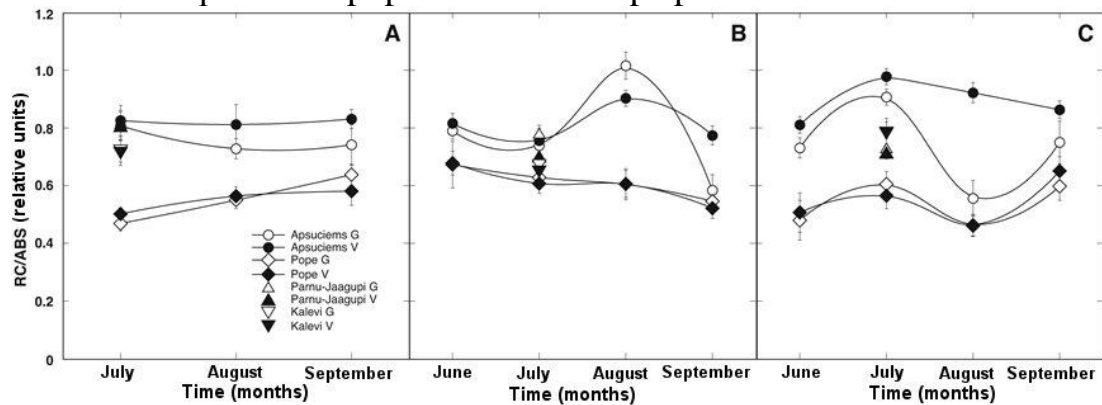


Fig. 4. Seasonal changes of the chlorophyll fluorescence parameter RC/ABS in 2009 (A), 2010 (B), 2011 (C) in the leaves of generative (G) and vegetative (V) *Saussurea esthonica* plants growing in natural conditions in different habitats.

Relatively small differences were observed in the fluorescence parameter measuring dark reaction effects on PS II activity - $(1-V_j)/V_j$. It was observed that the indicators related to the photosynthetic activity of PS II were generally higher in vegetative than generative plants, however, these differences were not very pronounced. Larger differences between the PS II-related indicators appeared in August, which could be related to faster senescence of generative plant leaves.

All decreases in PS II activity-related parameters in plants from the Pope population are associated with precipitation levels, and also possibly to the effects of the interaction of soil moisture and mineral composition. Therefore, subsequent experiments under controlled conditions studied the effects of these two parameters.

3.2.2. Changes in growth and photochemistry of photosynthesis with respect to mineral nutrition and soil moisture content in controlled conditions

To understand plant physiological vitality and growth with respect to mineral nutrition, plants were grown in four substrates in controlled conditions. Plants grown in Pope+ substrate had more leaves per plant, during the experiment, the number of leaves increased in plants grown in control, Pope and Pope+ substrates, but in the Apšuciems substrate plant leaf number decreased. Visually estimated plant vitality decreased in control and Apšuciems substrates, while increased slightly in the Pope and Pope+ substrates.

At the beginning of the experiment, an adverse effect on the chlorophyll content of the leaves was observed in plants grown in the Pope substrate, but later it stabilised at an average level (Fig. 5A). In plants grown on Apšuciems substrate, leaf chlorophyll content did not change during the experiment, but in plants grown in the Pope+ substrate a stable increase in leaf chlorophyll content was observed during the experiment. The lowest leaf chlorophyll content was observed in control plants.

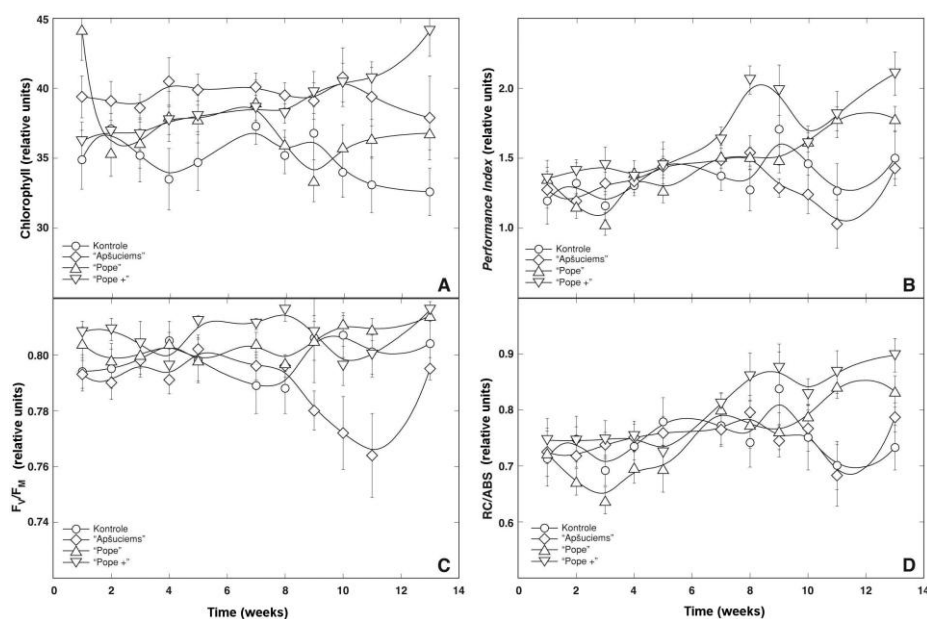


Fig. 5. Changes in the chlorophyll content (A) and chlorophyll fluorescence parameters *Performance index* (B), F_v/F_m (C), RC/ABS (D) in controlled conditions in different substrates

In contrast to the leaf chlorophyll content, which showed significant differences between the experimental variations, relatively minor changes in chlorophyll a fluorescence parameters were observed at the beginning of the experiment (Fig. 5). Only Performance Index (Fig. 5B) and RC/ABS (Fig. 5D) in plants grown in Pope

substrate showed a slight but significant reduction up to the 3rd week of the experiment. At a later period (from the 4th to the 6th week), greater differences between experimental variations were observed. Importantly, the changes were varying for Performance Index and RC/ABS on the one hand, while changes in F_v/F_m and F_v/F_0 were similar.

Since these results were contrary to the observation that the lowest physiological indicators of vitality were in the Pope population, an experiment examining the impact of moisture regime was undertaken. Visually evaluated vitality indicators changed during the experiment similarly to changes in leaf number - stable growth in plant vitality was observed in damp regime (150%) up to the 6th week and then remained at a high level. Also, in the flooded regime (200%), plant vitality increased slightly at the beginning of the experiment and then remained stable, but in the control and dry regimes, it was significantly reduced until the 9th week. Importantly, after 4 weeks of cultivation in the flooded regime, the formation of purple spots between leaf veins could be observed, as well as chlorosis at a later period, indicating possible metabolic disruptions.

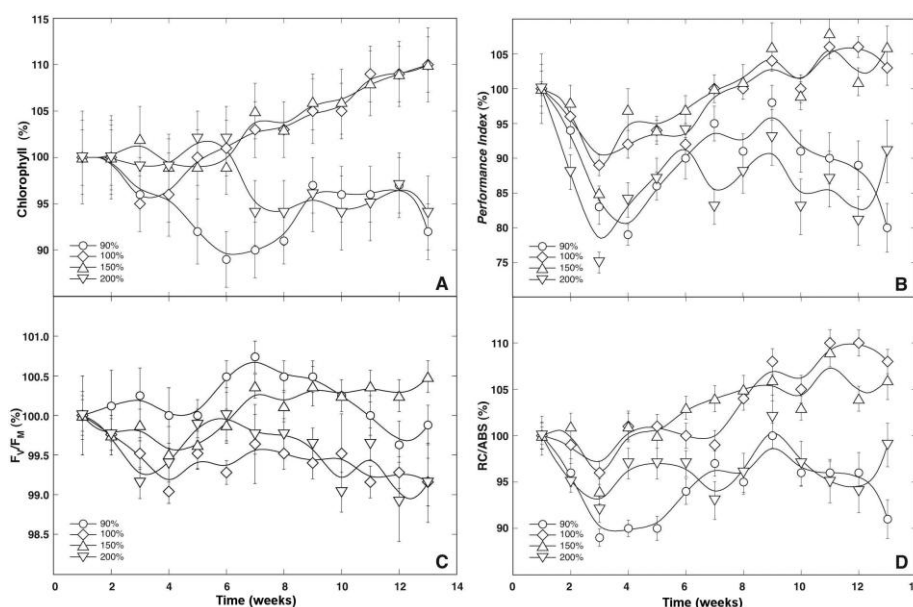


Fig. 6. Changes in the chlorophyll content (A) and chlorophyll fluorescence parameters *Performance index* (B), F_v/F_m (C), RC/ABS (D) in controlled conditions with different watering regimes

During the first six weeks, chlorophyll content of plants grown in optimal, damp and flooded regimes remained invariable (fig. 6). After this the chlorophyll content decreased in flooded plants. In comparison, chlorophyll content started to decrease already after 2 weeks in plant leaves cultivated in the dry regime. Changes in F_v/F_m in all variants were insignificant. PI and RC/ABS rapidly decreased in all regimes in the first two weeks due to plant adaptation to different soil moisture regimes. At the end of the experiment, all fluorescence related parameters were higher in plants cultivated in 100 and 150% moisture, while plants cultivated in dry soil or in flooded soil did not reach optimum levels.

3.3. Reproduction

3.3.1. *Saussurea esthonica* seed germination

Seed size varied from 2 to 5 mm. Two mm length seeds were undeveloped and did not germinate. 44% of all 3 to 5 mm long *S. esthonica* seeds were visually empty.

In total, 46% of 5 mm length seeds, 28% of 4 mm length seeds and 16% of 3 mm length seeds germinated. A significant difference in germination was found between seed size classes ($p < 0.05$).

A significant difference in germination rate was found between the different treatments ($p < 0.05$) e.g. KNO_3 and GA_3 , but not between lighting regimes. GA_3 at concentrations 10^{-3} and 10^{-4} M was more appropriate for germination than 10^{-2} M GA_3 (fig. 7).

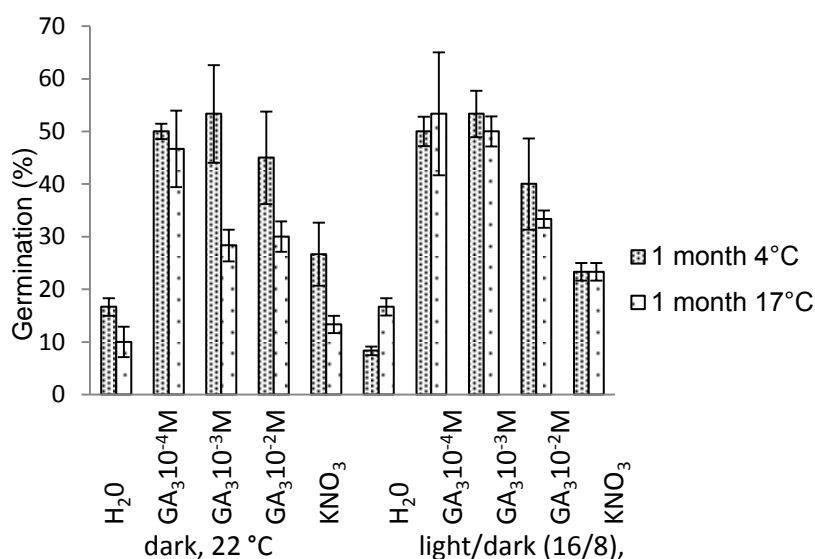


Fig. 7. Effect of pre-treatment, treatment and light conditions on *Saussurea esthonica* germination

Germination time varied from 3 to 21 days with the largest number of seeds germinating in four to seven days. The majority of seeds germinated within 14 days, with only 2% of seeds germinating from 14 to 21 days. 86% of seeds with cold pre-treatment germinated in the first seven days compared to 77% of seeds without cold pre-treatment.

Seeds which failed to germinate were divided into two groups: dead seeds (mouldy, dark inside) and non-germinated seeds. The majority of these seeds were dead, with only 19.5% of seeds which did not germinate during the germination test were estimated as hard seeds. After scarification all viable seeds (with white embryos) germinated within two to five days.

3.3.2. Vegetative reproduction

From ten plants, 50 shoots were obtained in 2011 (Table 1). Three individuals did not produce new shoots, and remained with only one shoot during the vegetation season. The other plants developed from 2 to 11 shoots per plant, and four plants flowered. There were two inflorescences in each of two pots and one inflorescence in each of the other two pots. In 2012, the number of obtained shoots increased and these ten plants produced 66 shoots (two to 17 shoots per plant). The number of flowering plants in 2012 was similar as in 2011, but only one inflorescence was observed per pot.

Table 1. Vegetative and generative shoots obtained from overwintered plants in 2011 and 2012

Year	Vegetative shoots per plant	Flowering stems per plant
2011	5.00±1.30	0.60±0.27
2012	6.60±1.33	0.50±0.08

To examine underground structures, two plants displaying differing placement of shoots in relation to the mother plant stem were removed from pots. In some cases new shoots developed close to the main shoot and in some cases the plant produced below-ground rhizomatic branches not splitting from the mother plant.

3.4. Molecular genetic research

3.4.1. Diversity in Latvian populations

Genetic diversity was studied by using iPBS and AFLP methods. The five iPBS primers produced a total of 67 fragments. Four unique fragments were detected in the Apšuciems population. The Apšuciems population has slightly higher expected heterozygosity (0.30), than the Pope population (0.29).

The total number of fragments genotyped in the AFLP analysis was 208. Higher expected heterozygosity was found in the Apšuciems population (0.32) in comparison to the Pope population (0.30). There are five unique fragments detected in the Apšuciems population and two in the Pope population. With both marker methods most of the genetic diversity was found within populations (Fig. 8).

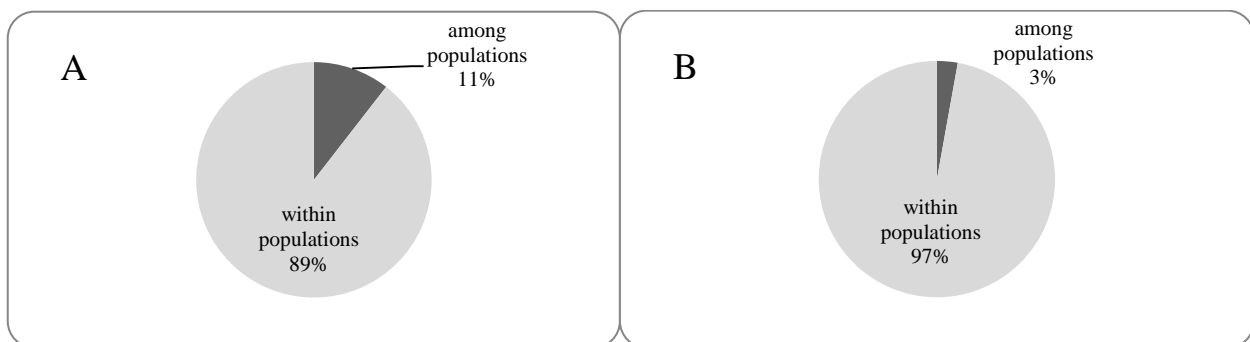


Fig. 8. Genetic diversity within and among populations based on iPBS (A) and AFLP (B) analysis.

3.4.2. Genetic diversity analysis of Latvian and Estonian *Saussurea esthonica* populations

Our previous results show that iPBS markers are able to detect genetic diversity within *S. esthonica* and more sensitive to genetic variations among populations. The iPBS genotyping using the four unlabelled primers produced in a total of 51 fragments. Utilising the same four fluorescently labelled iPBS primers, a total of 365 fragments were visualised on an ABI PRISM 3130xl Genetic Analyser. Most of the genetic variation was found within populations (Fig. 9). While the genetic differentiation between populations was low (3-5%), the differentiation between regions (Latvia and Estonia) was relatively higher (10-13%).

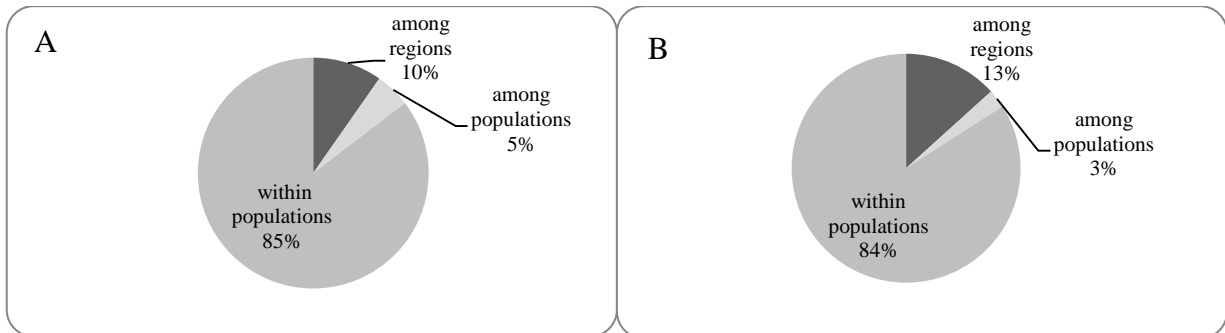


Fig. 9. Genetic diversity within and among populations based on unlabelled iPBS (A) and labelled iPBS (B) primers.

The Nei's genetic distance between the Latvian populations was 0.062 and 0.003 with the unlabelled and labelled iPBS primers respectively, while between the Estonian populations the genetic distances were 0.041 and 0.002 respectively. The difference in genetic distance using the two visualisation techniques is a consequence of the different numbers of fragments detected, however, the Nei genetic distance between the Estonian populations was lower than between the Latvian populations.

3.4.3. Comparison of different *Saussurea* species

ITS sequences were obtained from 45 individuals from 9 *Saussurea* species. The analysed sequences were approximately 486 nucleotides in length (GenBank accessions JN808226-JN808270). The aligned sequences were used to calculate the genetic distance (p-distance method) between species, utilizing all sequences from each species,

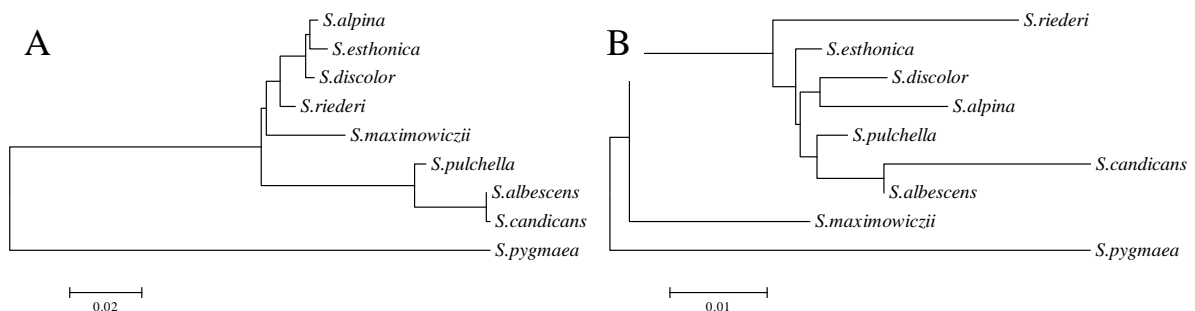


Fig. 10. Neighbour-Joining dendrogram utilizing genetic distance based on the ITS sequence data (A) and iPBS data (B).

and an unrooted dendrogram was produced using the Neighbour-Joining method (Fig. 10).

Taxonomic relationship of *S. esthonica* with *S. alpina* and *S. discolor*

In order to more fully investigate the taxonomic status of *S. esthonica*, a further phylogenetic analysis was done using individuals from the three species: *S. esthonica*, *S. alpina* and *S. discolor*. An unrooted Neighbour-Joining phylogeny was generated using the p-distance genetic distance between the individuals (Fig. 11).

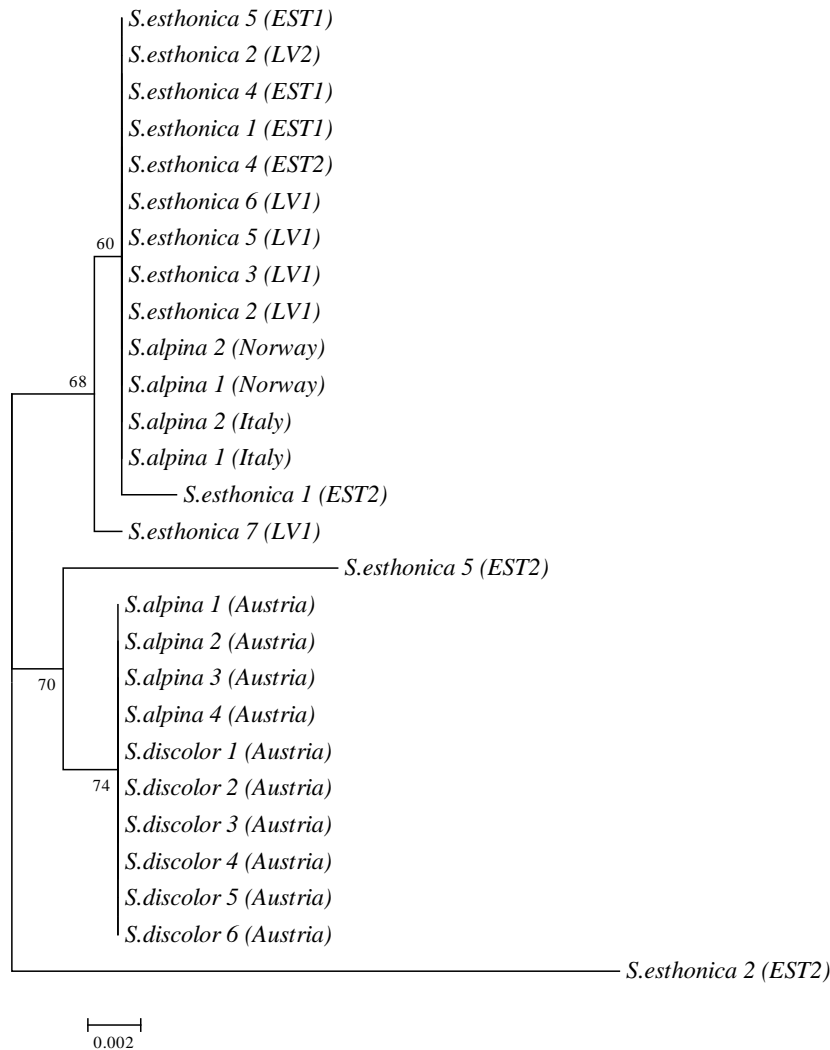


Fig. 11. Unrooted Neighbour-Joining dendrogram of *S. esthonica*, *S. alpina* and *S. discolor* individuals utilising genetic distances based on the ITS sequencing data. Numbers on the branches are percentage bootstrap values (1000 bootstraps).

While there are a few outliers (*S. esthonica* 2 (EST2) and *S. esthonica* 5 (EST2)), the majority of the individuals clustered according to species and/or population. It is interesting to note that the Austrian population of *S. alpina* clusters together with the *S. discolor* population, which is also of Austrian origin. The Italian and Norwegian populations of *S. alpina* cluster together with the *S. esthonica* individuals. There was no differentiation between the four populations of *S. esthonica*.

4. DISCUSSION

4.1. Use of *in vitro* cultures for conservation of species

Tissue culture techniques are useful for obtaining *Saussurea* seedlings which could be used for future research. If seed quality is sufficient, germination time of various *Saussurea* species is up to three weeks, depending on the species.

Different plant growth regulators are widely used for maintenance of *in vitro* cultures. *Saussurea esthonica* is capable of rooting in hormone-free media, therefore the influence of auxin on rooting was not examined in this study. Nevertheless, cytokinins are required for proliferation. Treatment with kinetin was less effective on shoot formation than BAP, and the applied concentrations did not correlate with the number of obtained shoots. Joshi and Dhar (2003) concluded that kinetin alone was less favourable for shoot multiplication of *S. obvallata* than BAP. There was a steady decrease in shoot length with a progressive increase in kinetin concentration, a gradual increase in BAP concentration significantly increased shoot number.

Our results showed that 2-iP at a concentration of 2.5 mg L⁻¹ promoted root formation but higher concentrations decreased root length and surface area. Chuenboonngarm *et al.* (2001) concluded that treatment with 2-iP at concentrations of 2.5 to 10 mg L⁻¹ gave multiple shoots (1 to 4) for *Gardenia jasminoides*, but resulted in somaclonal variation. Also, other authors report that for *in vitro* preservation of endangered plants, it is important to use the optimal dose of phytohormone to avoid somaclonal changes, although in some cases direct induction of somaclonal changes could have a positive effect (Fay 1992, Paunescu 2009)

BAP promoted propagation, and at concentrations of 0.5 to 1 mg L⁻¹ it is useful for achieving fast propagation rates. At lower concentrations it is appropriate for culture maintenance without frequent sub-culturing. Kinetin and 2-iP were not useful for proliferation, but better suited for conservation purposes. 2-iP is suited for growing and rooting purposes.

4.2. Ecophysiological studies in natural conditions

To compare adaptation of *S. esthonica* to environmental conditions and to assess vitality, determination of chlorophyll content and chlorophyll a fluorescence via non-destructive methods was done. Over the growing season, chlorophyll content tended to decrease, which can be explained by the aging of leaves. In the Pope and Estonian populations chlorophyll content of generative plant leaves was greater than of the vegetative leaves, however in the Apšuciems population this varied. A study of the amount of chlorophyll in leaves of various rose species and varieties, found that the amount of chlorophyll is variable, but in most cases the amount of chlorophyll decreases during flowering and increases during the fruit ripening stage (Adumitresei *et al.* 2011). A study (Ding *et al.* 2005) of corn hybrids found that after flowering, chlorophyll content and F_v/F_m was reduced in most cases, mostly as a result of aging. In this study, measurements from July correspond to the flowering phase, while the August measurements correspond with the seed maturation phase. In addition, it was observed that the Pope plants flower a little longer and some plants were still flowering in August. Variation was also observed between years in the flowering dynamic. In general, chlorophyll content increased slightly between flowering and fruit ripening,

however, in 2011 it was reduced in the Apšuciems population. Vegetative plant leaf chlorophyll content began to decrease as early as July (except in 2011 in the Apšuciems population) (Fig. 1). In senescing leaves chlorophyll content decreases, since metabolites diffuse to reaction centers, and the chlorophyll synthesis rate decreases. Consequently, our measurements show that the amount of chlorophyll depends on both environmental and ontogenesis factors.

The chlorophyll fluorescence ratio F_v/F_m in Pope was below 0.8. This is probably due to increased precipitation in Pope, because as rainfall increases, PS II activity-related indicators decrease. Also, the sharp decrease of F_v/F_m in Pope in August 2011 could be due to increased precipitation. In studies on the impact of flooding on rice plants, a decrease of F_v/F_m was observed already after two days (Panda *et al.* 2006). The plant vitality indicator PI was higher in Apšuciems plants as well as Estonian populations over all three years than in the Pope plants. This indicates that plants in the Pope population had reduced plant vigor.

It was observed that the photosynthetic activity of PS II-related indicators were generally higher in vegetative than generative plants (Figures 2-4), although these differences were not pronounced. Sharper differences in PSII-related performance measurements between the different years appeared in August. This could be due to plant development, as in early August, when the measurements were made, some plants were still flowering, while some had already set seed. It is known that F_v/F_m in maize begins to decline 4 weeks after flowering (Ding *et al.* 2005). Consequently, the observed differences in the measurements in August each year could be related to differences in plant development.

As the chlorophyll content of plants from the two populations was relatively similar, then photoinhibition is due to reduction of PS II-related activity, without reduction of pigment content. The reduction of all PS II activity-related parameters in Pope may be associated with the time of measurement, precipitation levels, as well as influence of soil moisture and mineral composition.

4.3. Influence of mineral nutrition and watering regime in controlled conditions on growth and photochemistry of photosynthesis

Chlorophyll content increased in plants grown in the Pope + substrate, decreased in plant grown in control and Pope substrates, and remained unchanged in plants grown on the Apšuciems substrate (Fig. 5). This could be due to the increased manganese and iron content in the Apšuciems substrate. Up to 80% of the iron in cells is located in chloroplasts and participates in the early stages of chlorophyll synthesis. Manganese participates in water splitting in PS II. Excessive concentrations of these elements are possibly neutralized by calcium in soil.

The fluorescence parameters F_v/F_m and F_v/F_0 slightly increased in the plants grown in the control, Pope and Pope + substrates, in turn, plants grown in the Apšuciems substrate were below 0.8, indicating photoinhibition of photosynthesis. A decrease in RC/ABS indicates an increase in the antenna chlorophyll content per reaction center (Thach *et al.* 2007). Consequently, photoinhibition due to overloading of reaction centers was observed in plants grown in the control and Apšuciems substrates.

Since PI and RC/ABS improved over the course of the experiment in the plant grown in the Pope and Pope + substrates, it can be concluded that these parameters are only partly dependent on the nitrogen and sulfur content in the soil, but the impact of mineral elements is likely to be complex. It is possible that the increased phosphorus, potassium and magnesium in the control substrate reduced the effects of nitrogen and sulfur, as various mineral elements can act synergistically or antagonistically, and therefore could result in the small PI improvements observed.

Overall, the PS II photochemistry related indicators suggest that the Pope and + Pope substrates are most appropriate for *S. esthonica*. The discrepancy between the results obtained in natural populations and under controlled conditions suggest that it may be related to other elements in the soil, such as zinc, that can replace manganese atoms in the manganese cluster thereby inhibiting the activity of PS II. This discrepancy could also be linked to the watering scheme, lighting or temperature, as in the controlled experiment, plants were watered moderately and the temperature was stable.

In some plants growing in moist conditions, a reduction of chlorophyll content has been observed in response to flooding (Clua *et al.* 2009). Also, water shortage induces a decrease in leaf chlorophyll content (Schlemmer *et al.* 2005; Sakalauskienė *et al.* 2008). In this study, a reduction in chlorophyll content was observed in plants growing in the dry regime (90%) and flooded soil (200%), while chlorophyll content during the experiment even increased slightly in plants growing in the optimal (100%) and damp (150%) regimes.

There was almost no difference in F_v/F_m and F_v/F_0 between the watering regimes (Fig. 6). Apparently, the increased moisture stress on these plants is not a factor and they are well adapted to a changing water regime. Previous studies have found that F_v/F_m decreases already two days after flooding, reflecting the reduced reduction capacity of the PS II primary acceptor plastoquinone (Panda *et al.* 2006). Obviously, photoinhibition of photosynthesis does not occur during the cultivation of *S. esthonica* plants in waterlogged, but not flooded conditions. It has been reported that photoinhibition is not observed (F_v/F_m does not change) in flooding tolerant rice varieties, but that changes in PI appear over time (Sarkar *et al.* 2004). Also studies on the effects of drought on apple tree leaves found that effects on the maximum quantum efficiency if the PSII reaction centers are open, is insignificant and photoinhibition is not observed (Massacci, Jones 1990).

In this study, we found that drought and excessive moisture conditions change the PSII efficiency related indicators PI and RC/ABS. Thus, excessive dryness and moisture does not change the primary outcome of photochemistry (F_v/F_m), but rather the active/inactive reaction center to antenna chlorophyll ratio (RC/ABS), reaction center density and zero fluorescence level (F_0).

4.4. Reproduction

One of the factors determining population viability is reproductive success. Wild species often have the ability for both generative and vegetative propagation. If sexual reproduction is delayed, the plant begins to reproduce vegetatively. At the same time, sexual reproduction ensures that the genetic diversity of populations is maintained and thus the species can adapt better to environmental changes.

Germination is strongly affected by seed size. There is a higher probability that 4 and 5 mm seeds will germinate. Previous studies have reported on the dependence of germination on seed weight, however, data are often contradictory. It has been reported that there is a negative correlation between seed weight and germination (Bu *et al.* 2007). The opposite has been reported in *Sarracenia purpurea*, where larger seeds begin to germinate faster and have better germination (Ellison 2001). It is considered that seed size affects germination, but does not affect the subsequent growth of seedlings (Mölken *et al.* 2005). Wild seeds are often characterized by dormancy and the breaking of which is induced by the use of various methods, which may differ between plant species. For example, some species of the genus *Lonicera* germinate after cold stratification, some after hot-cold stratification, and some after hot-stratification, and also GA₃ improves germination (Hidayati *et al.* 2000). It was found that germination of *Primula modesta* without cold moist temperature treatment is 20-60%, but after 1 month treatment at 4 °C in the dark, germination increased to 90-100% (Shimono *et al.* 2004).

Treatments with GA₃ and KNO₃ had a significant influence on germination and cold stratification positively influenced germination. Similar results were obtained with *S. costus* (Sharma *et al.* 2006) where the prechilling for one month was the most effective treatment, and treatment with GA₃ in concentrations 10⁻³ M and 10⁻⁴ M was better than treatment with KNO₃. Photoperiod could have a significant influence on germination. Some species require light for germination, some – dark. Positive effect of cold pre-treatment was observed on germination in the dark, which was not observed during germination in a light/dark regime.

Scarification of live ungerminated seed had a positive effect on germination. It is known that sacrification overcomes impermeable seed coat induced dormancy and/or growth inhibitor induced dormancy. Our results showed that *S. esthonica* could have non-deep physiological dormancy.

Vegetative reproduction of wild species is common. It is considered that it is found at an increased frequency in cool, moist, shaded and poor soil conditions and can be due to the life cycle of certain species, or as a plant adaptation to particular conditions (Sosnová *et al.* 2010). Approximately 21% of clonal plant species have more than one type of clonal reproduction (Klimeš, Klimešová 1999). *S. esthonica* reproduces vegetatively either by rhizomes or by formation of adventive buds in the hypocotyl that form leaf rosettes. The most typical type of vegetative reproduction of *S. esthonica* plants is by rhizomes. According to our data, the number of shoots from the maternal plant is >1. Unlike *Saussurea alpina*, *S. esthonica* grows in damp areas, therefore vegetative reproduction could be more common than in the mountain species.

4.5. Molecular genetic studies

For diversity analysis DNA marker methods have been widely used. There are no species specific markers for the genus *Saussurea*. One of the methods not requiring prior knowledge of DNA sequence is the AFLP technique. A number of DNA marker techniques based on retrotransposon sequences, both species specific and non-specific, have been developed and utilised for genetic diversity studies. One recently described retrotransposon-based molecular marker technique is the inter-primer binding site (iPBS) method, which is based on conserved retrotransposon primer binding site

sequences (Kalendar *et al.* 2010). This method detects polymorphism for all plant species without the need for prior sequence data, so it is useful for species with underdeveloped marker systems. Therefore for analysis of population genetic diversity, these two methods were used. The AFLP method appears to be more sensitive to detecting variation between individuals, while the retrotransposon markers detect higher differentiation among populations. Obtained results indicated that the iPBS method is useful for genetic diversity studies in *S. esthonica* and detects higher differentiation between populations than the AFLP method. Therefore for comparison of Latvian and Estonian populations, the iPBS method was used. Two iPBS techniques were used: ethidium bromide staining and fluorescently labelled primers. The number of fragments detected using these iPBS techniques were different, with the fluorescently labelled primers detecting a much larger number of fragments. Correspondingly, the proportion of lower frequency and unique alleles was higher, and the expected heterozygosity estimates were lower. However, the tendencies were similar, with lower genetic polymorphism detected in the Estonian populations in comparison with the Latvian populations. Most of the genetic variation was found within populations. While the genetic differentiation between populations was low (3-5%), the differentiation between regions (Latvia and Estonia) was relatively higher (10-13%). The comparisons among the populations using both techniques revealed similar tendencies, with a lower number of fragments and lower expected heterozygosity detected in the Estonian populations. This difference is also reflected in the number of flowering plants in our studied populations, with a lower number detected in the Estonian populations in comparison to the Latvian populations. However, based on these results it seems that the Latvian populations have a relatively high level of genetic diversity, and they are not genetically differentiated, indicating that they have common provenance. The Latvian populations are isolated, and are separated by ~95 km, so it seems unlikely that there is gene flow between these populations. The genetic distances between the Estonian populations were lower than between the Latvian populations, even though the geographic distance between the Estonia populations is larger. This could be due to higher gene flow between the Estonian populations via intermediate populations, given that *S. esthonica* populations are found throughout Estonia (Narits *et al.* 2000). A similar observation has also been made in isolated populations of the endangered species *Campanula thyrsoides*, where genetic diversity was not related to population size (Ægisdóttir *et al.* 2009).

For investigation of the taxonomic status of *S. esthonica* and its relationship with other *Saussurea* species the ITS and iPBS methods were used. From a total of 25 seed accessions from 11 *Saussurea* species, it was only possible to obtain germinated seedlings from 11 accessions of 8 species. This meant that three species were not able to be investigated (*S. neopulchella*, *S. nipponica* and *S. parviflora*), as well as one subspecies (*S. alpina* subsp. *depressa*), along with additional accessions/populations of the analysed species. The differences between two used DNA marker techniques is highlighted by the amount of intra-species genetic variation revealed by each technique – 84% for iPBS; 26% for ITS sequencing. In general obtained results are similar to the classification proposed by Lipschitz (1979) classification (Table 2).

Table 2. Species classification according to Lipschitz (1979)

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

All the analysed species were previously described as belonging to the subgenus *Saussurea*, with the exception of *S. pulchella*, which was placed into the subgenus *Theodorea*. *S. alpina*, *S. discolor*, *S. esthonica* and *S. riederi* were all placed in the section *Saussurea*, and clustered together. *S. maximowiczii*, which has been classified into a separate section (*Laguranthera*), clustered separately from the other species. *S. pygmaea* has been previously classified into a separate section (*Pycnocephala*) *S. albescens* and *S. candicans* were placed into the section *Elatae*, and both these species are clustered together in the obtained phylogenies. The one anomaly was *S. pulchella*, which was placed in a separate subgenus, however in the obtained phylogenies, it clustered together with *S. albescens* and *S. candicans*.

The phylogeny of the genus *Saussurea* is not fully resolved (Raab-Straube 2003; Wang and Liu 2004), and many uncertainties remain. The relationship and species status of *S. esthonica* with regard to the other *Saussurea* species is equally unclear. The further phylogenetic analysis of the individuals from *S. esthonica*, *S. alpina* and *S. discolor* using the ITS sequencing data did not unambiguously reveal the taxonomic relationships between these species, with Norwegian and Italian *S. alpina* populations clustering with *S. esthonica*, while the Austrian *S. alpina* population was more genetically similar to the Austrian *S. discolor* population. Populations found at the fringes of species' distributions are often more subject to speciation, radiation and hybridisation than populations found in the ancestral areas (Lipschitz 1979). The clustering of the Norwegian and Italian populations of *S. alpina* with the *S. esthonica* populations could indicate the sub-species status of *S. esthonica*, however it may also imply that *S. alpina* is not a monophyletic species. As mentioned previously, *S. alpina* exhibits a high degree of polymorphism, both morphological and cytological, and the European populations, located on the edge of the distribution area, could be expected to show a high degree of polymorphism and to be prone to radiation, speciation and hybridisation (Martins 2006). Analysis of the results from this study, indicate that it is possible that the Norwegian and Italian *S. alpina* accessions are from the sub-species *alpina*, while the Austrian accession is from another sub-species. Given the undetermined sub-species designation of the *S. alpina* accessions analysed in this study, it is not possible to draw firm conclusions about the intra-specific relationships within *S. alpina*.

4.6. Long term conservation of *S. esthonica* and development of conservation strategies for other species

The results from this investigation of *S. esthonica* show that this species can be conserved *ex situ*, in *in vitro* conditions, but there are several factors that must be taken into account. One of the major limiting factors is that the seeds have poor germination, so that the initiation of *in vitro* cultures is difficult. For the same reason, seed conservation in seed banks could be a problem. Secondly, *in vitro* culture might not be suitable for species conservation, as in order to ensure genetic diversity, a large number of genotypes must be maintained. Consequently, the *in vitro* collection is an important parallel to *in situ* conservation and can be optimally used for preparation of exhibits in botanical gardens or for propagation of plants for scientific research. However, possibilities to evaluate the quality of seeds and to store them in seed banks must be explored in order to ensure conservation of genetic diversity.

To ensure the *in situ* conservation of endangered plants, monitoring of genetic diversity within and between populations is necessary to reduce the threats to the population that could cause loss of genetic diversity in order to ensure long-term survival of the populations. The results of this study indicate that currently there does not seem to be a loss of genetic diversity in Latvian *S. esthonica* populations, however, genetic diversity monitoring should be periodically carried out in order to maintain long-term population viability. This is particularly important for small and isolated populations, because they are most at risk of accidental or random environmental or genetic variation.

The impact of environmental factors on plant vitality and viability must also be taken into account, and PSII efficiency related indicators give insight into overall plant vitality and photoinhibition and a reduction in leaf chlorophyll content and PI occur during adverse conditions. *S. esthonica* is generally well adapted to changing environmental conditions. Excessive concentrations of minerals in soil are neutralized by the biological properties of the plant, as well as mineral synergistic or antagonistic effects. Vascular plant species growing in wet calcareous sites are tolerant to water level changes of up to 25 cm. *S. esthonica* is well adapted to different moisture regimes and, apparently, periodic water level fluctuations as are most of the calcicoles plant species that grow in damp areas. However, excessive dryness or humidity reduces plant vitality.

The low seed quality is a very serious threat to species survival, as it reduces the ability of *S. esthonica* to reproduce generatively. This was partly offset by the ability to reproduce vegetatively, but it is not clear what factors can enhance the plant's ability to create generative shoots, as the flower number is small. Research on reproductive features and potential could be significant for development of conservation strategies for other plant species.

CONCLUSIONS

1. Tissue culture techniques are useful for obtaining *Saussurea* seedlings which could be used for future research. Depending on species germination, time of various *Saussurea* species is usually five to 35 days.
2. Different cytokinins have various effects on *in vitro* culture: BAP promotes proliferation, 2-iP in small concentrations promotes rooting, increasing kinetin concentration does not influence proliferation and number of roots.
3. Differences were observed between plants growing in Apšuciems and Pope in natural conditions, which are associated with complex long-term and permanent effects of environmental conditions.
4. A balanced substrate without excessive iron and manganese levels has a positive effect on *Saussurea esthonica* plant growth and vitality under controlled conditions.
5. *Saussurea esthonica* is well adapted to variable soil moisture regimes. The optimal moisture regimes are moderate to moist soils.
6. Adverse conditions of a relatively small effect reduce Performance Index and RC/ABS, which are related to the active/inactive reaction center ratio to the chlorophyll antenna and reaction center density, but changes in the maximum quantum efficiency (F_v/F_m) and in the primary outcome of photochemistry (F_v/F_0) do not appear.
7. *Saussurea esthonica* can reproduce both generatively and vegetatively. One plant produced in average six new shoots.
8. *Saussurea esthonica* displays non-deep physiological dormancy. Germination time varied from 3 to 21 days with the largest number of seeds germinating in five to seven days. Germination is dependent on seed size and germination treatments.
9. Genetic diversity studies of Latvian populations indicate that they are genetically robust, and do not show signs of loss of genetic diversity.
10. Similar phylogenies of the analysed *Saussurea* species were obtained with the ITS sequence analysis as well as the iPBS markers. *Saussurea discolor* and *Saussurea alpina* clustered together with *Saussurea esthonica*. *Saussurea albescens* and *Saussurea candicans* clustered together, however *Saussurea pulchella*, classified into a different subgenus also clustered with these two species. The one analysed *Saussurea pygmaea* individual was very distant from the other analysed species.
11. *Saussurea esthonica* is closely related to the analysed Italian and Norwegian *S. alpina* populations, but differ from Austrian *S. alpina* populations. Possibly, this could be attributed to a different sub-species of *S. alpina* found in Austria.

ACKNOWLEDGEMENTS

I thank my supervisor Dr. habil. biol., prof. Gederts Ievinsh and scientific consultants: Dr. biol. Dace Kļaviņa, Dr. biol. Dainis Ruņģis.

I thank my colleagues from LSFRI “Silava” Genetic Resource Centre Dr. chem. Ilze Veinberga, Anita Gaile, Angelika Voronova-Petrova, Anna Korica, Krista Kānberga-Siliņa, Ilze Gaile, Linards Ļubinskis.

I thank my colleagues from LSFRI “Silava” Dace Auzenbaha, Dr. silv. Tālis Gaitnieks, Dārta Kļaviņa, Dr. sc. ing. Mudrīte Daugaviete, Dr. silv. Imants Baumanis, Dr. biol. Austra Āboliņa, Ausma Korica and Ojārs Polis for support and assistance.

I thank Dr. biol. Ģertrūde Gavrilova un Dr. biol., Dr. habil. ģeogr. Māris Laiviņš for assistance at the beginning of this study.

I thank Dr. Malle Leht from Estonian University of Life Sciences for assistance in collecting leaf material in Estonia.

I thank Anita Roze – National Botanic Garden seed exchange curator for help in seed ordering, and Bundesgarden (Austria), Reykjavik HB (Iceland), Bonn HBU (Germany), Graz HBU (Austria), Šiauliai HBU (Lithuania), Okamoto Ofuna HB (Japan), HB Alpino Paradisia (Italy), Göteborg HB (Sweden), Vladivostok HBA (Russia), Torino HBU direction de „Chanousia” (Italy), HB Tallinnensis (Estonia), Botanical Garden P. J. Šafárik University (Slovakia), St-Petersburg HBIB (Russia), University of Oslo, the BG (Norway), HB Akureyri (Iceland) for supplying seeds.

I thank Dr. biol. Ineta Samsone, Dr. biol. Una Andersone, Dr. biol. Jevgenija Nečajeva, Dr. biol. Dace Megre, Dr. biol. Māra Vikmane, Dr. biol. Uldis Kondratovičs un Dr. biol. Nils Rostoks from University of Latvia.

I thank the staff of the Plant Mineral Nutrition Laboratory, Institute of Biology, University of Latvia for substrate analysis, and Andis Karlsons for development of substrate composition.

REFERENCES

IZMANTOTĀS LITERATŪRAS SARAKSTS

- Adumitresei L., Zamfirache M.M., Olteanu Z., Boz I. 2011. Observations on the foliar assimilating pigments content for wild and garden roses. *Journal of Plant Development* 18: 47-54.
- Ægisdóttir H.H., Kuss P., Stöcklin J. 2009. Isolated populations of a rare alpine plant show high genetic diversity and considerable population differentiation. *Annals of Botany* 104: 1313-1322.
- Agarwal M., Shrivastava N., Padh H. 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports* 27: 617-631.
- Andrušaitis G. (redaktors) 2003. *Latvijas Sarkanā Grāmata*. 3. sējums. Vaskulārie augi. Rīga. 691 lpp.
- Arora R., Bhojwani S. S. 1989. *In vitro* propagation and low temperature storage of *Saussurea lappa* C.B. Clarke – an endangered medicinal plant. *Plant Cell Reports* 8: 44 – 47.
- Baker N.R., Rosenqvist E. 2004. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany* 55: 1607-1621.
- Baligar V.C., Fageria N.K., He Z.L. 2001. Nutrient use efficiency in plants. *Communication in Soil Science and Plant Analysis* 32: 921-950.
- Baskin J.M., Baskin C.C. 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research* 14: 1-16.
- Bilz M., Kell S.P., Maxted N., Lansdown R.V. 2011. *European Red List of Vascular Plants*. Luxembourg: Publications Office of the European Union. 130 p.
- Bouma T. J., Nielsen K. L., Koutstaal B. 2000. Sample preparation and scanning protocol for computerised analysis of root length and diameter. *Plant and Soil* 218: 185–196.
- Bu H., Chen X., Xu X., Liu K., Jia P., Du G. 2007. Seed mass and germination in an alpine meadow on the eastern Tsinghai-Tibet plateau. *Plant Ecology* 191: 127-149.
- Chuenboonngarm N., Charoonsote S., Bhamarapravati S. 2001. Effect on BA and 2-iP on shoot proliferation and somaclonal variation of *Gardenia jasminoides* Ellis *in vitro* culture. *Science Asia* 27: 137-141.
- Clua A., Orsini H., Beltrano J. 2009. Incidence of variable flooding period on *Lotus tenuis* biomass production and leaf senescence. *Lotus Newsletter* 39: 13-20.
- Das K.K., Panda D., Sarkar R.K., Reddy J.N., Ismail A.M. 2009. Submergence tolerance in relation to variable floodwater conditions in rice. *Environmental and Experimental Botany* 66: 425-434.
- Dhar U., Joshi M. 2005. Efficient plant regeneration protocol through callus for *Saussurea obvallata* (DC.) Edgew. (Asteraceae): effect of explant type, age and plant growth regulators. *Plant Cell Reports* 24: 195 – 200.
- Dickore W.B. 2001. Observations of some *Saussurea* (Compositae-Cardueae) of W Kunlun, Karakorum and W Himalaya. *Edinburgh Journal of Botany* 58: 15-29.

- Ding L., Wang K.J., Jiang G.M., Biswas D.K., Xu H., Li L.F., Li Y.H. 2005. Effects of nitrogen deficiency on photosynthetic traits of maize hybrids released in different years. *Annals of Botany* 96: 925-930.
- Edson J.L., Wenny D.L., Leege-Brusven A.D., Everett R.L. 1997. Using Micropropagation to Conserve Threatened Rare Species in Sustainable Forests. *Journal of Sustainable Forestry* 5: 279 -291.
- Ellison A.M. (2001). Interspecific and intraspecific variation in seed size and germination requirements of *Sarracenia* (Sarraceniaceae). *American Journal of Botany* 88: 429 - 437.
- Fargašová A. 1998. Root growth inhibition, photosynthetic pigments, and metal accumulation in *Sinapis alba* as the parameters for trace metals effect determination. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 61: 762-769.
- Fay M.F. 1992. Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. In *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 28:1-4.
- Galmés J., Abadía A., Medrano H., Flexas J. 2007. Photosynthesis and photoprotection responses to water stress in the wild-extinct plant *Lysimachia minoricensis*. *Environmental and Experimental Botany* 60: 308-317.
- Gaspar T., Kevers C., Penel C., Greppin H., Reid D.M., Thorpe T.A. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. In *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 32: 272-289.
- Groenendael J. M. van, Klimeš L., Klimešová J., Hendriks R.J.J. 1996. Comparative ecology of clonal plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Biological Sciences* 351: 1331-1339.
- Guo M., Gao M., Liu C.-Z. 2007. *In vitro* propagation of an endangered medicinal plant *Saussurea involucrata* Kar. et Kir. *Plant Cell Reports* 26: 261–265.
- Hidayati S.N., Baskin J.M., Baskin C.C. 2000. Dormancy-breaking and germination requirements of seeds of four *Lonicera* species (Caprifoliaceae) with underdeveloped spatulate embryos. *Seed Science Research* 10: 459 – 469.
- Hill M.O., Preston C.D., Roy D.B. 2004. PLANTATT - attributes of British and Irish plants: status, size, life history, geography and habitats. Online Atlas of the British and Irish Flora <http://www.brc.ac.uk/plantatlas/index.php?q =plant/saussurea-alpina>). Accessed on 25 June 2012
- Holobiuc I., Blindu R. 2007. *In vitro* culture introduction for *ex situ* conservation of some rare plant species. *Romanian Journal of Biology – Plant Biology* 51-52: 13-23.
- Ingelög T., Andersson R., Tjernberg M. 1993. Red Data Book of the Baltic Region. Part 1. – Swedish Threatened Species Unit, Uppsala. 95 pp.
- Jackson M. B., Colmer T. D. 2005. Response and adaptation by plants to flooding stress. *Annals of Botany* 96: 501-505.
- Kalendar R., Antonius K., Smýkal P., Schulman A.H. 2010. iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. *Theoretical and Applied Genetics* 121:1419-1430.
- Kell S.P., Knüpffer H., Jury S.L., Maxted N. and Ford-Lloyd B.V. 2005. Catalogue of Crop Wild Relatives for Europe and the Mediterranean. University of

- Birmingham, Birmingham, UK. Available online via the Crop Wild Relative Information System (CWRIS – <http://www.pgrforum.org/cwriscwrisc.asp>)
- Kermonde A.R. 2005. Role of abscisic acid in seed dormancy. *Journal of Plant Growth Regulation* 24: 319-344.
- Klimeš L. 2008. Clonal splitters and integrators in harsh environments of the Trans-Himalaya. *Evolutionary Ecology* 22: 351-367.
- Klimeš L., Klimešová J. 1999. CLO-PLA2 – a database of clonal plants in central Europe. *Plant Ecology* 141: 9-19.
- Kļaviņa D., Gailīte A., Jakobsons G., Nečajeva J., Gavrilova Ģ. 2004. Tissue culture technology in conservation of threatened plant species in Latvia. *Acta Universitatis Latviensis, Biology* 676: 183–188.
- Kļaviņa D., Šmite D. 2009. Collection of threatened plants of Latvia in National Botanic Garden. *Baltic Botanic Gardens in 2007-2008. Rīga, Latvija* 61-65.
- Kozłowski T.T. 2002. Physiological-ecological impacts of flooding on riparian forest ecosystems. *Wetlands* 22: 550-561.
- Kuroha T., Satoh S. 2007. Involvement of cytokinins in adventitious and lateral root formation. *Plant Root* 1: 27-33.
- Laplaze L., Benkova E., Casimiro I., Maes L., Vanneste S., Swarup R., Weijers D., Calvo V., Parizot B, Herrera-Rodriguez M. B., Offringa R., Graham N, Dumas P., Friml J., Bogusz D., Beeckman T., Bennett M. 2007. Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. *Plant Cell*. 19: 3889–3900.
- Lipschitz S. (Липшиц С.) 1979. Род *Saussurea* DC. Nauka, Leningrad. P 283 (in russian).
- Macek P., Rejmánková E., Houdková K. 2006. The effect of long-term submergence on functional properties of *Eleocharis cellulosa* Torr. *Aquatic Botany* 84: 251-258.
- Massacci A., Jones H.G. 1990. Use of simultaneous analysis of gas-exchange and chlorophyll fluorescence quencing for analysing the effects of water stress on photosynthesis in apple leaves. *Trees* 4: 1-8.
- Misra A., Tyler G. 1999. Influence of soil moisture on soil solution chemistry and concentrations of minerals in the calcicoles *Phleum phleoides* and *Veronica spicata* grown on a limestone soil. *Annals of Botany* 84: 401-410.
- Mohammed G.H., Zarco-Tejada P., Miller J. R. 2003. Applications of chlorophyll fluorescence in forestry and ecophysiology. Chapter 3 in *Practical Application of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology*. Ed. De Ell I.R., Toivonen P.M.A. Kluwer academic publishers. Boston / Dordrecht/ London. 80-124.
- Mölken T. van, Jorritsma-Wienk L.D., Hoek P.H.W. van, Kroon H. 2005. Only seed size matters for germination in different populations of the dimorphic *Tragopodon pratensis* subsp. *pratensis* (Asteraceae). *American Journal of Botany* 92: 432-437.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497.
- Narits A., Leht M., Paal J. 2000. Taxonomic status of *Saussurea alpina* subsp. *esthonica* (Asteraceae): phenetical analysis. *Annales Botanici Fennici* 37: 197-206.

- Netto A.T., Campostrini E., de Oliveira J.G., Bressan-Smith R.E. 2005. Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll a fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves. *Scientia Horticulturae* 104: 199-209.
- Osvalde A. 2011. Optimization of plant mineral nutrition revisited: the roles of plant requirements, nutrient interactions, and soil properties in fertilization management. *Environmental and Experimental Biology* 9: 1-8.
- Panda D., Rao D.N., Sharma S.G., Strasser R.J., Sarkar R.K. 2006. Submergence effects on rice genotypes during seedling stage: probing of submergence driven changes of photosystem II by chlorophyll a fluorescence induction O-J-I-P transients. *Photosynthetica* 44: 69-75.
- Paunescu A. 2009. Biotechnology for endangered plant conservation: a critical overview. *Romanian Biotechnological Letters* 14: 4095-4103.
- Peakall, R. and Smouse P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- Poczai P., Hyvönen J. 2010. Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetics: problems and prospects. *Molecular Biology Reports* 37: 1897-1912.
- Raab-Straube E. 2003. Phylogenetic relationships in *Saussurea* (Compositae, Cardueae) sensu lato, inferred from morphological, ITS and trnL-trnF sequence data, with a synopsis of *Himalaiella* gen. nov., *Lipschitziella* and *Frolovia*. *Willdenowia* 33: 379-393.
- Richardson A.D., Duigan S.P., Berlyn G.P. 2002. An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. *New Phytologist* 153: 185-194.
- Sakalauskienė S., Šabajevienė G., Lazauskas S., Brazaitytė A., Samuolienė G., Urbonavičiūtė A., Sakalauskaitė J., Ulinskaitė R., Duchovskis P. 2008. Complex influence of different humidity and temperature regime on pea photosynthetic indices in VI-VII organogenesis stages. *Scientific Works of the Lithuanian Institute of Horticulture and Lithuanian University of Agriculture. Sodininkystė ir Daržininkystė* 27: 199-207.
- Sarkar R.K., Panda D., Rao D.N., Sharma S.G. 2004. Chlorophyll fluorescence parameters as indicators of submergence tolerance in rice. *International Rice Research Notes* 29: 66-68.
- Sammul M., Kull K., Niitla T., Möls T. 2004. A comparison of plant communities on the basis of their clonal growth patterns. *Evolutionary Ecology* 18: 443- 467.
- Samsone I., Andersone U., Vikmane M., Ieviņa B., Pakarna G., Ievinsh G. 2007. Nondestructive methods in plant biology: an accurate measurement of chlorophyll content by a chlorophyll meter. *Acta Universitatis Latviensis* 723: 145-154.
- Sarasan V., Cripps R., Ramsay M.M., Atherton C., McMichen M., Prendergast G., Rowntree J.K. 2006. Conservation *in vitro* of threatened plants – progress in the past decade. *In vitro Cell. Dev. Biol. – Plant* 42: 206-214.
- Schlemmer M.R., Francis D.D., Shanahan J.F., Schepers J.S. 2005. Remotely measuring chlorophyll content in corn leaves with differing nitrogen levels and relative water content. *Agronomy Journal* 97:106-112.

- Sharma R.K., Sharma S., Sharma S.S. 2006. Seed germination behaviour of some medicinal plants of Lahaul and Spiti cold desert (Himachal Pradesh): implications for conservation and cultivation. *Current Science* 90: 1113-1118.
- Shi Z., Raab-Straube E. von, Greuter W., Martins L. 2011. Cardueae. In: Wu Z. Y., Raven P. H., Hong D. Y., eds., *Flora of China* vol. 20-21 (Asteraceae). Science Press (Beijing) & Missouri Botanical Garden Press (St Louis), 42-194. http://flora.huh.harvard.edu/china/mss/volume20/Flora_of_China_Volume_20_21_Cardueae.pdf. 28.06.2012.
- Shimono A., Washitani I. 2004. Seedling emergence patterns and dormancy / germination physiology of *Primula modesta* in a subalpine region. *Ecological Research* 19: 541 – 551.
- Sosnová M., Diggelen R. van, Klimešová J. 2010. Distribution of clonal growth forms in wetlands. *Aquatic Botany* 92: 33-39.
- Stevanović V., Vukojičić S., Šinžar-Sekulić J., Lazarević M., Tomović G., Tan K. 2009. Distribution and diversity of Arctic-Alpine species in the Balkans. *Plant Systematics and Evolution* 283: 219–235.
- Subotić A., Jevremović S., Grubišić D. 2009. Influence of cytokinins on in vitro morphogenesis in root cultures of *Centaureum erythraea* – valuable medicinal plant. *Scientia Horticulturae* 120: 386-390.
- Tamm A., Kull K., Sammul M. 2002. Classifying clonal growth forms based on vegetative mobility and ramet longevity: a whole community analysis. *Evolutionary Ecology* 15: 383-401.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Thach L.B., Shapcott A., Schmidt S., Critchley C. 2007. The OJIP fast fluorescence rise characterizes Graptophyllum species and their stress responses. *Photosynthesis Research* 94: 423-436.
- Varshney R.K., Graner A., Sorrells M.E. 2005. Genomics-assisted breeding for crop improvement. *Trends in Plant Science* 10: 621-630.
- Voesenek L.A.C.J., Benschop J.J., Bou J., Cox M.C.H., Groeneveld H.W., Millenaar F.F., Vreeburg R.A.M., Peeters A.J.M. 2003. Interactions between plant hormones regulate submergence-induced shoot elongation in the flooding-tolerant dicot *Rumex palustris*. *Annals of Botany* 91: 205-211.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. and Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.
- Wang Yu-Jin, Liu Jian-Quan 2004. Phylogenetic analyses of *Saussurea* sect. Pseudoeriocoryne (Asteraceae: Cardueae) based on chloroplast DNA *trnL-F* sequences. *Biochemical Systematics and Ecology* 32: 1009-1023.
- Zohlen A., Tyler G. 2004. Soluble inorganic tissue phosphorus and calcicole-calcifuge behaviour of plants. *Annals of Botany* 94: 427-432.