

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Radvilė

RIMGAILĖ-VOICIK

PATAISO (*LYCOPodium* L.) IR PADRAIKOS (*DIPHASIASTRUM* Holub)
GAMETOFITŲ IR JUVENILINIŲ SPOROFITŲ POPULIACIJŲ STRUKTŪRA
BEI FUNKCIONAVIMAS SAUSUOSE PUŠYNUOSE

Daktaro disertacijos santrauka

Biomedicinos mokslai, biologija (01 B)

Vilnius, 2017

Tyrimai atlikti ir disertacija parengta Vilniaus universitete 2012–2016 metais.

Mokslinis vadovas:

Lietuvos mokslų akademijos tikrasis narys **prof. habil. dr. Jonas Remigijus Naujalis** (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, botanika – 04 B).

Mokslinis konsultantas:

prof. dr. Donatas Žvingila (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B).

Disertacija ginama Vilniaus universiteto Biologijos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkas:

prof. habil. dr. Juozas Rimantas Lazutka (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B).

Nariai:

prof. habil. dr. Eugenija Kupčinskienė (Vytauto Didžiojo universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B),

prof. habil. dr. Izolda Pašakinskienė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B),

dr. Jolita Radušienė (Gamtos tyrimų centro Botanikos institutas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B),

prof. dr. Martin Schnittler (Greifsvaldo universiteto Botanikos ir kraštovaizdžio ekologijos institutas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B).

Disertacija bus ginama viešame Biologijos mokslo krypties tarybos posėdyje 2017 m. gegužės 11 d. 12 val. Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro R102 auditorijoje. Adresas: Saulėtekio al. 7, Vilnius, Lietuva, LT-10224.

Disertacijos santrauka išsiųsta 2017 m. balandžio 11 d.

Su disertacija galima susipažinti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu: www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

VILNIUS UNIVERSITY

Radvilė

RIMGAILĖ-VOICIK

ORGANIZATION AND FUNCTIONING PATTERNS OF *LYCOPODIUM* L.
AND *DIPHASIASTRUM* Holub POPULATIONS WITH AN EMPHASIS ON
GAMETOPHYTES AND JUVENILE SPOROPHYTES IN DRY PINE
FORESTS

Summary of doctoral dissertation

Biomedical sciences, biology (01 B)

Vilnius, 2017

Dissertation was prepared and research was carried out at Vilnius University, in 2012-2016.

Scientific Supervisor:

True member of Lithuanian Academy of Sciences **Prof. habil. Dr. Jonas Remigijus Naujalis** (Vilnius University, biomedical sciences, botany – 04 B).

Scientific Consultant:

Prof. Dr. Donatas Žvingila (Vilnius University, biomedical sciences, biology – 01 B).

The defence of doctoral dissertation will be held at Vilnius University Scientific Council on Biology:

Chairman:

Prof. habil. Dr. Juozas Rimantas Lazutka (Vilnius University, biomedical sciences, biology – 01 B).

Members:

Prof. habil. Dr. Eugenija Kupčinskienė (Vytautas Magnus University, biomedical sciences, biology – 01 B),

Prof. habil. Dr. Izolda Pašakinskienė (Vilnius University, biomedical sciences, biology – 01 B),

Dr. Jolita Radušienė (Nature Research Center, Institute of Botany, biomedical sciences, biology – 01 B),

Prof. Dr. Martin Schnittler (University of Greifswald, Institute of Botany and Landscape Ecology, biomedical sciences, biology – 01 B).

Doctoral dissertation will be defended at the public session of the Council of Biological Science on 11th of May, 2017 at 12:00 in the R102 Auditorium of the Life Sciences Center, Vilnius University. Address: Saulėtekio ave. 7, Vilnius, Lithuania, LT–10224

The summary of the doctoral dissertation was distributed on 11th of April, 2017.

The dissertation is available at the library of the Vilnius University and on VU website: www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius.

IVADAS

Archajiškai monofiletinei pataisinių (*Lycopodiaceae* P. Beauv. ex Mirb.) šeimai priklauso apie 400 dabarties sporinių induočių rūšių (Øllgaard and Windisch, 2014; Christenhusz and Byng, 2016). Homosporiniai žoliniai pataisiniai pasižymi oportunistine, partizanine gyvenimo strategija (Harper, 1985). Vidutinių platumų miškuose jų visžaliai daugiamečiai sporofitai sudaro įvairaus dydžio klonus. Iš viso Lietuvoje pataisinių šeimai priklauso septynios rūšys.

Pataisinių sporofitai atsiranda iš požeminių bechlorofilų saprotrofinių gametofitų, savo audiniuose turinčių endofitinių grybų (Read et al., 2000). Gametofitai susidaro iš haploidinių (n) sporų, kurios, subrendusios sporofitų sporangėse, yra vėjo išplatintos ir, patekusios į tinkamas dirvožemio sąlygas, sudygsta. Nustatyta, kad pataisų sporos dygsta tik tamsoje (Whittier, 1977), o patys gametofitai dirvožemyje sėkmingai vystosi tik esant *Glomeromycota* ir *Mucoromycotina* grybams (Rimington et al., 2014). Gamtoje pataisinių gametofitų raida nuo sporos sudygimo iki anteridžių ir archegonijų subrendimo bei kiaušialąsčių apvaisinimo, po kurio susidaro naujas sporofitas, gali užtrukti šešerius ir daugiau metų (Bruchmann, 1910; Horn et al., 2013). Gametofitai (lytinė karta) ir sporofitai (nelytinė karta) yra savarankiški organizmai: paprastai juvenilinės pataisinių populiacijos yra erdviškai izoliuotos nuo senų klonų. Juvenilinės pataisinių populiacijos dažniau susidaro ten, kur aplinka yra šiek tiek sutrikdyta (Bruchmann, 1898; Degener, 1924; Naujalis, 1995). Dažnai jos yra aptinkamos buvusiose miškų gaisravietėse (Eames, 1942; Oinonen, 1968).

Pastaraisiais metais mokslininkų dėmesys pataisinių gametofitų sandarai ir raidai gerokai išaugo (Whittier et al., 2005; Renzaglia and Whittier, 2013), bet duomenų apie pataisinių juvenilinius sporofitus ir gametofitus gamtoje labai trūksta. Iki šių dienų aprašant gametofitų sandarą vis dar remiamasi klasikiniiais Bruchmann (1898) ir Treub (1884) darbais. Pataisinių embriogenezė nėra nei pakankamai iširta, nei tinkamai mokslškai dokumentuota (Bierhorst, 1971).

Požeminiai pataisinių gametofitai susidaro dirvožemyje, humuso horizonte, 1–9 cm gylyje (Bruchmann, 1898; Degener, 1924; Eames, 1942; Naujalis, 1995). Tipiški *Lycopodium* L. genties rūšių gametofitai yra netaisyklingo dubenėlio pavidalo, o daug retesni *Diphasiastrum* Holub genties rūšių gametofitai yra morkos ar runkelio šakniavaisio pavidalo (Bruchmann, 1898; Thomas, 1975). Juvenilinių sporofitų raidai labai svarbus kelerių metų laikotarpis, kai per placentą jie gauna maistmedžiages iš gametofito (Renzaglia and Whittier, 2013).

Šiuolaikinių pataisinių požeminius gametofitus vidutinio klimato platumose pirmą kartą rado ir aprašė Fankhauser (1873). Vėliau Bruchmann (1898) apibendrino savo ir kitų pteridologų darbus ir išskyrė penkis struktūrinius pataisinių gametofitų tipus: *Lycopodium clavatum* L. – I tipas, *L. complanatum* L. (= *Diphasiastrum complanatum* (L.) Holub) – II tipas, *L. selago* L. (= *Huperzia selago* (L.) Bernh. ex Schrank et Mart.) – III tipas, *L. inundatum* L. (= *Lycopodiella inundata* (L.) Holub) – IV tipas ir *L. phlegmaria* L. (= *Huperzia*

phlegmaria (L.) Rothm. arba *Phlegmariurus phlegmaria* (L.) Holub – V tipas). Ši klasifikacija vis dar naudojama aprašant pataisinių gametofitus (Bruce, 1979a,b; Naujalis, 1995; Renzaglia and Whittier, 2013). Pataisinių sporofitai, palyginti su gametofitais, pasižymi pastovesniais požymiais (Bower, 1894). Taksonominę gametofitų formų vertę pirmasis įvertino Rothmaler (1944). Po ilgos pertraukos Šiaurės Amerikos pataisinių klasifikacijai Wagner ir Beitel (1992) pritaikė ir gametofitų formos požymį. Vėliau šią klasifikaciją įtvirtino chloroplasto *rbcL* geno sekoskaitos rezultatai (Wikström and Kenrick, 1997, 2000), toks požiūris taikomas ir kituose naujausiuose pataisinių ir šertvainių taksonomijos darbuose (Øllgaard, 2012; Øllgaard and Windisch, 2014; PPG I, 2016).

Lycopodium ir *Diphasiastrum* gentims priskiriami augalai yra gana plačiai paplitę sausuose Lietuvos pušynuose. Lietuvoje pirmieji pataisinių požeminių gametofitų populiacijų struktūros tyrimai buvo atlikti XX a. pabaigoje (Naujalis, 1995). Tačiau vėliau tokie tyrimai nebuvo tęsiami.

DARBO TIKSLAS. Tirti *Lycopodium* ir *Diphasiastrum* genčių gametofitų bei juvenilinių sporofitų populiacijų struktūrą ir funkcionavimo dėsningumus sausuose Pietryčių Lietuvos pušynuose.

TYRIMŲ UŽDAVINIAI

- Ištirti erdvinę pataisinių požeminių gametofitų ir juvenilinių sporofitų populiacijų struktūrą.
- Nustatyti pataisinių gametofitų raidos stadijas ir rūšinę sudėtį, įvertinti požeminių gametofitų populiacijų kompoziciją.
- Ištirti bendrijų su juveniline pataisinių sporofitų populiacija augalinės dangos specifiškumą.
- Ištirti augalinės dangos pokyčius bendrijoje su juveniline pataisinių populiacija.
- Įvertinti dirvožemio cheminių savybių įtaką pataisinių juvenilinių sporofitų ir požeminių gametofitų populiacijų gausai ir įvairovei.
- Ištirti pataisinių populiacijų genetinę struktūrą.

Darbo mokslinė ir praktinė reikšmė. Moksliniai duomenys apie juvenilinių pataisinių populiacijų struktūrą ir funkcionavimą kaupiasi itin lėtai. Ir XXI a. juvenilinių pataisinių populiacijų tyrimai gamtoje yra itin reti, o šių augalų gametofitai yra vieni rečiausiai tiriamų botaninių objektų pasaulyje. Mūsų tyrimų rezultatai suteikia žinių apie gausias ir gyvybingas juvenilinių pataisinių populiacijas Pietryčių Lietuvos pušynuose, o sukaupti duomenys leidžia aktyviai dalyvauti mokslinėje diskusijoje apie pataisinių lytinį dauginimąsi, naujų populiacijų susidarymą.

Įvairūs miško paklotės trikdymai yra svarbus veiksnys juvenilinėms pataisinių populiacijoms susidaryti, bet nėra žinomi juvenilinių pataisinių populiacijų

sąryšiai su augalija. Mūsų tyrimų rezultatai gali reikšmingai prisidėti išaiškinant lokalius veiksnius, turinčius įtakos pataisinių populiacijų susidarymui. Juvenilinių pataisinių populiacijų susidarymo, struktūros ir funkcionavimo dėsningumą nustatymas suteikia svarbių duomenų rengiant gamtotvarkos planus šiems evoliuciškai archajiškiems augalams išsaugoti. Gautus tyrimų duomenis būtų galima kur kas plačiau nei iki šiol taikyti botanikos studijoms universitetuose.

Darbo naujumas. Pataisinių gyvenimo ciklą sudaro dviejų kartų – lytinės (gametofito) ir nelytinės (sporofito) – kaita. Mokslinės žinios apie požeminių gametofitų populiacijų gausumą ir įvairovę išlieka paviršutiniškos, nes nėra metodikos lokalioms gametofitų populiacijoms miškuose arba kitose augavietėse aptikti. Ypač stinga duomenų apie pataisinių požeminių gametofitų populiacijų struktūrą ir dinamiką gamtoje. Pataisinių gametofitų tyrimai gamtoje iki šiol yra tik aprašomieji ir pateikia informaciją apie retus gametofitų radimo gamtoje faktus (Horn et al., 2013). Kur kas dažniau pataisinių gametofitų tyrimai atliekami laboratorijose daiginant sporas (Whittier, 1998), analizuojant gamtoje surinktų gametofitų anatomiją (Renzaglia and Whittier, 2013) arba molekuliniais metodais tiriant jų endofitinius grybus (Rimington et al., 2014).

Mūsų atliktų tyrimų metu pirmą kartą pasaulyje gamtoje buvo įvertinta erdvinė požeminių pataisų ir padraikų gametofitų santalkų ir juvenilinių pataisinių sporofitų populiacijų struktūra, analizuoti juvenilinių pataisinių populiacijų sąryšiai su augaliniu rūbu ir dirvožemio cheminėmis savybėmis. Taip pat pirmą kartą dirvožemio bestuburiams išrankioti skirtas metodas (Ghilarov and Striganova, 1987) buvo adaptuotas ir pritaikytas gauti tikslias pataisinių gametofitų koordinates dirvožemio mėginyje. Gauti tyrimų rezultatai leidžia įvertinti, koks kiaušialąsčių apvaisinimo būdas gali būti vyraujantis gamtinėse pataisinių gametofitų populiacijose. Taip pat pirmą kartą Lietuvoje maršrutinis taškinis metodas (Korchagin, 1964) pritaikytas lokalių pataisinių populiacijų gausumui ir įvairovei įvertinti miškuose. Pirmą kartą Lietuvoje buvo rasti *Diphasiastrum* genties pataisinių požeminiai runkelio šakniavaisio pavidalo gametofitai. Pirmą kartą Lietuvoje tirta pataisų populiacijų genetinė struktūra.

GINAMIEJI TEIGINIAI

1. Pietryčių Lietuvos sausuose pušynuose juvenilinėse pataisinių populiacijose vyrauja *Lycopodium* genties gametofitai.
2. Juvenilinėms pataisinių požeminių gametofitų populiacijoms būdinga heterogeniška struktūra ir jas sudarančių komponentų asinchroninė branda.
3. Požeminiai pataisinių gametofitai dirvožemio humuso horizonte nėra išsidėstę visiškai atsitiktinai.
4. Juvenilinių pataisinių populiacijų susidarymas yra susijęs su padidėjusiu *Deschampsia flexuosa* (L.) Trin. projekciniu padengimu.
5. *Lycopodium clavatum* ir *L. annotinum* populiacijoms būdinga nedidelė DNR lokusų genetinė įvairovė.

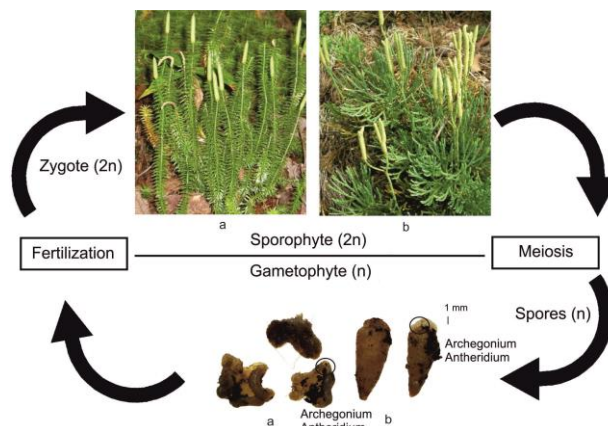
Darbo aprobavimas. Atliktų tyrimų pagrindu paskelbti keturi moksliniai straipsniai: du iš jų žurnaluose, indeksuojamuose *ISI Web of Science* duomenų bazėje, vienas žurnale, indeksuojamame *ISI Master Journal List* duomenų bazėje ir vienas recenzuojamame tarptautinės mokslinės konferencijos straipsnių rinkinyje. Tyrimų rezultatai taip pat pristatyti vienoje nacionalinėje ir penkiose tarptautinėse mokslinėse konferencijose.

Darbo apimtis. Darbą sudaro šios dalys: Įvadas, Literatūros apžvalga, Tyrimo medžiaga ir metodika, Rezultatai, Diskusija, Išvados, Mokslinių darbų sąrašas, Padėkos, Literatūros sąrašas. Disertacija parengta anglų kalba, jos apimtis – 110 puslapių (su priedais). Darbe pateikta 15 lentelių, 19 paveikslų ir 5 priedai. Naudotas 182 literatūros šaltiniai.

TYRIMŲ MEDŽIAGA IR METODAI

Tyrimo objektas – pataisinių juvenilinių populiacijų komponentai: požeminiai gametofitai, pataisų daigai ir juveniliniai sporofitai. Fotosintetinantys jauni sporofitai su gametofitu arba jo liekanomis ir turintys plagiotropinį ūglį vadinami juveniliniais sporofitais. Sporofitai su gyvu gametofitu vadinami pataisų daigais neatsižvelgiant į jų dydį ar gebėjimą fotosintetinti.

Lietuvoje pataisinių šeimai priklauso septynios rūšys: pataisas varinčius (*Lycopodium annotinum* L.), šarkakojis pataisas (*Lycopodium clavatum* L.), dvišakė padraika (*Diphasiastrum complanatum* (L.) Holub), trivarpė padraika (*Diphasiastrum tristachyum* (Pursh) Holub; Gudžinskas, 1999), tarpinė padraika (*Diphasiastrum* × *zeilleri* (Rouy) Holub; Tupčiauskaitė ir Žemgulytė, 2012), patvankinis pataisiukas (*Lycopodiella inundata* (L.) Holub) ir statusis atgiris (*Huperzia selago* (L.) Bernh. ex Schrank et Mart.). Pastarosios dvi pataisinių rūšys įrašytos į Lietuvos raudonąją knygą (Tupčiauskaitė, 2007a, b). Šiame darbe buvo tiriamos *L. annotinum*, *L. clavatum*, *D. complanatum sensu lato* požeminių gametofitų ir juvenilinių sporofitų populiacijos (1 pav.).



1 pav. Modelinis pataisinio gyvenimo ciklas: a – *Lycopodium annotinum* sporofitas ir gametofitas, b – *Diphasiastrum* sp. sporofitas ir gametofitas (Rimgailė-Voicik et al., 2015)

Tyrimų vietos. Tyrimai atlikti Pietryčių Lietuvoje, Varėnos r., sausuose miškuose, kuriose dominuoja *Pinus sylvestris* L. Tyrimų vietos: Maskauka I (N54.28547, E024.60547, WGS), Maskauka II (N54.28029, E024.59781), Varėnė I (N54.26412, E024.53109), Varėnė II (N54.26451, E024.53276), Puvočiai (N54.11251, E024.31869), Bingeliai (N54.17616, E024.26510), Beržupis (N54.23603, E024.59468), Žilinėliai (N54.32018, E024.64004), Glėbas (N54.24304, E024.46539). Maskaukos tyrimo vietoje (N54.28202, E024.59892) su didžiausia juvenilinių pataisinių populiacija buvo įrengtas 100 m² pastovus tyrimų laukelis.

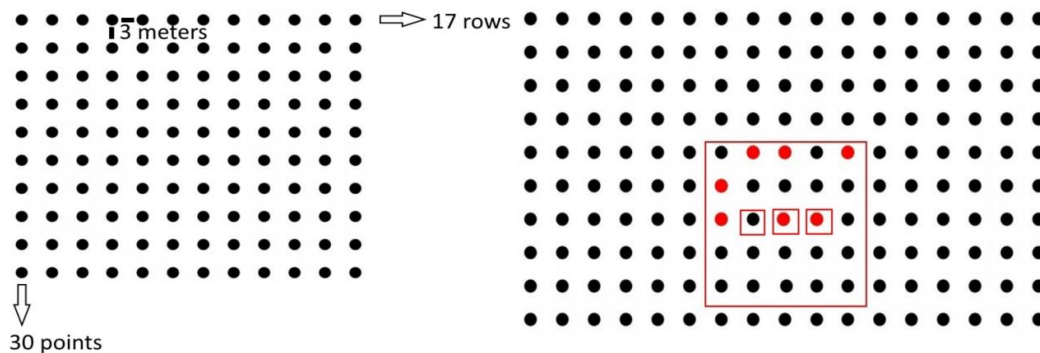
Miškai užima apie 68,9 % Varėnos r. ploto. Tirtos miškų bendrijos su pataisinais gali būti priskirtos ass. *Peucedano-Pinetum* W. Mat. (1962) 1973 (Matuszkiewicz, 2001). Varėnos r. daugiau nei 53 % miško nuokritų sudaro pušų spygliai (Balevičienė ir Vaičys, 2001), todėl vyrauja rūgščios reakcijos smėlio dirvožemiai, kuriuose bakterijų nėra gausu (6,8–10 mln. ląst./1 g sauso dirv.); tarp mikroorganizmų vyrauja mikromicetai (Raguotis, 2001). Dauguma Varėnos r. miškų yra pradėti sodinti apie 1950 m.

Tirtos teritorijos vidutinė absoliuti temperatūra sausio mėnesį yra –4,2 °C ir +17 °C liepą. Vidutinis metinis kritulių kiekis yra 670 mm, sniego danga išsilaiko iki 90 dienų. Kalvoto moreninio reljefo dirvožemiai daugiausia jauriniai, lengvi (smėlis arba priesmėlis; Anonimas, 2015).

Tyrimų eiga. 2012 m. vasarą miškuose prie Senosios Varėnos kaimo buvo atlikta juvenilinių pataisinių populiacijų paieška. Tolesniems tyrimams pasirinktos devynios vietos. Kiekvienoje tyrimų vietoje juvenilinės pataisinių sporofitų populiacijos buvo nustatytos naudojant standartinį apžvalginį metodą. Vėliau visose tyrimų vietose, naudojant adaptuotą taškinį maršrutinį metodą, buvo nustatomas juvenilinių, subrendusių ir sporifikuojančių *L. annotinum*, *L. clavatum* ir *D. complanatum sensu lato* pasitaikymas. Bendrijų geobotaniniai aprašymai atlikti tipiškosse juvenilinių pataisinių augimo vietose, 10 × 10 m² laukeliuose, dalyvavimo dydžiui įvertinti naudota procentinė skalė. Geobotaninio aprašymo laukelio ribose požeminių gametofitų paieškai buvo imami trys 0,25 m² dydžio dirvožemio mėginiai su paklote. Šiuose mažuose laukeliuose augalų rūšių dalyvavimas taip pat vizualiai vertintas naudojant projekcinio padengimo procentinę skalę. Gametofitų paieškai pasirinktose teritorijose buvo renkami nesiribojančių suaugusių *L. annotinum* ir *L. clavatum* augalų pavyzdžiai DNR išskyrimui.

Pataisinių pasitaikomumo sausuose pušynuose vertinimas. Pataisinių sporofitų pasitaikomumas vertintas devyniose tyrimų vietose 2013 ir 2014 m. rugpjūtį. Naudotas pataisinių tyrimui mūsų adaptuotas taškinis maršrutinis metodas (2 pav.; Korchagin, 1964; Rimgailė-Voicik et al., 2015). Kiekvienoje vietoje vertinimas atliktas stačiakampiame barelyje, kurio plotas buvo 4 590 m². Kiekviename barelyje maršrutinių eilių skaičius buvo 17, atstumas tarp eilių ir tarp taškų eilėse – po tris metrus. Kiekvienoje eilėje pataisinių pasitaikomumas vertintas 30 kartų. Iš viso viename tyrimo barelyje pasitaikomumas įvertintas 510

taškų. Pasitaikomumo vertinimo metu pataisiniai skirstyti į tris grupes: 1) brandūs sporofitai su strobilais, 2) brandūs sporofitai be strobilų ir 3) juveniliniai sporofitai.



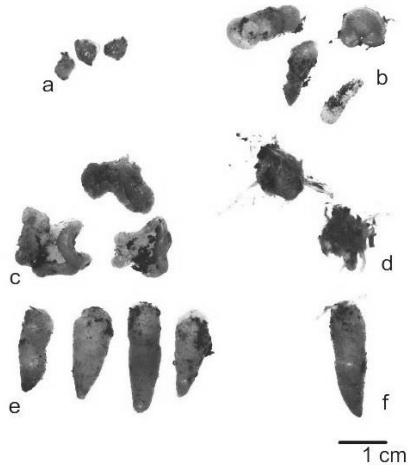
2 pav. Adaptuoto maršrutinio metodo pataisinių pasitaikomumui tirti ir dirvožemio mėginių paėmimo vietų gametofitų paieškai pasirinkimo schema. Raudoni taškai žymi juvenilinių sporofitų išsidėstymą

Požeminių gametofitų ir juvenilinių sporofitų populiacijų struktūros nustatymas. Maskaukos tyrimų vietoje 2012 m. metodikai išbandyti paimti du $50 \times 50 \times 10$ cm dydžio dirvožemio mėginiai su miško paklote. Laboratorijoje mėginiai peržiūrėti mechaniškai ardant dirvožemį. Pataisinių gametofitų paieškai taikytas mūsų adaptuotas metodas, skirtas dirvožemio bestuburių apskaitai (Ghilarov and Striganova, 1987; Rimgailė-Voicik and Naujalis, 2015). Nustatyti juvenilinių sporofitų ir gametofitų skaičius, taip pat jų raidos stadijos.

2013–2014 m. devyniose tyrimo vietose su juvenilinėmis pataisinių populiacijomis paimti dvidešimt aštuoni $50 \times 50 \times 10$ cm dydžio dirvožemio su miško paklote mėginiai. Laboratorijoje, pašalinus samanų sluoksnį, kiekvienas mėginys smeigtukais buvo padalintas į mažesnius 10×10 cm dydžio plotelius. Gametofitų koordinatės (x, y, z) fiksuotos nuosekliai ardant plotelius, vėliau gauti duomenys perskaičiuoti į koordinates visame $0,25 \text{ m}^2$ dydžio dirvožemio mėginyje. Gametofito lokalizacijos gylis vertintas lyginant su artimiausia nenuardyta mėginio dalimi. Nustatytas kiekvieno gametofito skersmuo, pagal išorinius požymius rasti gametofitai suskirstyti į šešias grupes: rutuliški, disko pavidalo, netaisyklingo dubenėlio pavidalo, netaisyklingo dubenėlio pavidalo su ūgliu, runkelio šakniavaisio pavidalo, runkelio šakniavaisio pavidalo su ūgliu (3 pav.).

Pakartotinis augalinės dangos vertinimas sauso pušyno bendrijoje su juvenile *Lycopodium* populiacija. Pastoviam Maskaukos tyrimo laukelyje kasmet (nuo 2012 iki 2015 m.) rugpjūčio mėnesį buvo atliekamas pakartotinis augalų rūšių dalyvavimo dydžio vertinimas ir renkama informacija apie juvenilinius pataisinių sporofitus. Kad vertinimas būtų tikslesnis, 100 m^2 ploto laukelis mediniais kuoliukais buvo padalintas į šimtą 1 m^2 laukelių. 2013–2014 m. pataisinių juvenilinių sporofitų raida buvo papildomai įvertinta nustatant šių

augalų ūglių viršūnių skaičių virš samanų dangos. 2015 m. rugpjūtį buvo atliktas medžių lapų suglaustumo kartografinis vertinimas ir išmatuotas į laukelį patenkančių medžių kamienų skersmuo 130 cm aukštyje. *P. sylvestris* kamienai pateko į septynis tiriamuosius plotelius iš 100, jie buvo išimti iš tolesnės analizės.



3 pav. Dirvožemio mėginiuose rastų pataisinių gametofitų įvairovė: I tipo (*Lycopodium* sp.) keturios grupės: a – rutuliški, b – disko pavidalo, c – netaisyklingo dubenėlio pavidalo, d – netaisyklingo dubenėlio pavidalo su ūgliu; II tipo (*Diphasiastrum* sp.) dvi grupės: e – šakniavaisių morkos ar runkelio pavidalo, f – šakniavaisių morkos ar runkelio pavidalo su ūgliu (Rimgailė-Voicik et al., 2015)

2015 m. rudenį visi pataisinių juveniliniai sporofitai, buvę Maskaukos pastoviam laukelyje, buvo iškasti imant $10 \times 10 \times 10$ cm dydžio dirvožemio mėginius. Iš mėginių pincetu buvo išrinkti gametofitai ir juveniliniai sporofitai. Analizės metu nustatytas juvenilinių sporofitų dydis, augimo pobūdis (ortotropinis arba plagiotropinis) ir amžius pagal metinių lapų sutankėjimų skaičių (Primack, 1973; Naujalis, 1986, 1995; Rimgailė-Voicik and Naujalis, 2016).

Cheminė dirvožemio analizė. 2015 m. Vilniuje, Nacionalinėje visuomenės sveikatos priežiūros laboratorijoje, nustatytas dirvožemio pH vandeninėje suspensijoje, bendras azoto kiekis, spektrofotometriškai nustatytas bendras fosforo kiekis mėginyje iš pastovaus Maskaukos tyrimo laukelio. 2013–2014 m., analizuojant gametofitų paieškai devyniose tyrimų vietose paimtus dirvožemio mėginius, taip pat suformuoti mėginiai cheminei dirvožemio analizei. 2016 m. Kaune, Lietuvos agrarinių ir miškų mokslo centro Agrocheminių tyrimų laboratorijoje, devyniuose mėginiuose nustatytas organinės anglies kiekis, suminis azotas, NO_3 , NH_4 , pH, judriųjų P_2O_5 , K_2O , Ca^{2+} ir Mg^{2+} koncentracijos.

DNR išskyrimas ir PGR reakcijos vykdymas. DNR buvo skiriama iš jaunų, ką tik nuskintų *L. annotinum* ir *L. clavatum* ūglių viršūnių, juvenilinių sporofitų ir gametofitų. Naudotas adaptuotas CTAB metodas (Doyle and Doyle, 1990). ISSR-PGR reakcijos ir jų analizė atlikta kaip aprašė Patamsytė et al. (2010). ISSR-PGR

buvo naudojama 10 μ l reakcijos mišinio (1 μ l 10 \times Taq MgCl₂ buferio, 1.2 μ l 25 mM MgCl₂, 1 μ l 2 mM dNTP, 0.4 μ l pradmens, 4.32 μ l dejonizuoto H₂O, 0.08 μ l Taq DNR polimerazės ir 2 μ l pataisų DNR). Amplifikacija termocikleryje Eppendorf vydyta tokiomis sąlygomis: 7 min pradinė denatūracija 94 °C temperatūroje, 32 ciklai, kuriuos sudaro 30 s 94 °C, 5 min 55/39/46 °C ir 2 min 72 °C temperatūroje, galutinė stadija – 7 min 72 °C temperatūroje. Panaudoti keturi pradmenys.

PGR produktai analizuoti atliekant elektroforezę 1.5 % TBE agarozės gelyje. Rezultatai registruoti naudojant gelių dokumentavimo sistemą BioDocAnalyse (Biometra, Vokietija). DNR fragmentų ilgiui nustatyti naudoti GeneRuler™ DNA Ladder Mix (10000-100 bp) ir MassRuler™ DNA Ladder Mix (10000-250 bp) DNR fragmentų dydžių standartai.

Duomenų analizė. Statistinė duomenų analizė atlikta naudojant programos R paketą ‘BiodiversityR’ Vegan (Oksanen et al., 2016). Nemetrinis daugiamačių skalių metodas su Bray-Curtis indeksu (angl. *Nonmetric multidimensional scaling*, NMDS) naudotas siekiant nustatyti augalijos ir dirvožemio savybių skirtumus devyniose tyrimo vietose ir analizuoti galimus požeminių gametofitų formavimosi dėsningumus, susijusius su augalijos struktūra. Analizei naudota permutacinė daugiamatė dispersinė analizė (angl. *permutational multivariate analysis of variance*, *permutational MANOVA*) su Bray-Curtis indeksu, taip pat funkcija ‘adonis’ (Oksanen et al., 2016) pakete ‘vegan’. Pastovaus laukelio augalijos Shannon ir Simpson indeksai lyginti naudojant pakartotinių matavimų ANOVA (angl. *repeated measures ANOVA*), skaičiavimai atlikti su funkcija ‘ezANOVA’ pakete ‘ez’ (Lawrence, 2011).

Naudojant Vegan programinį paketą, sugeneruotos rūšių gausumo akumuliacinės kreivės (angl. *species richness accumulation curves*) ir Chao rūšių gausumo statistinis įvertinimas. Įvairovei palyginti ir įvertinti taikyti Renyi įvairovės profiliai, kurie sujungia kelis įvairovės indeksus ir atvaizduoja juos kartu. Yra žinoma, kad daugelis įvairovės indeksų yra Hill skaičiaus atvejai (Hill, 1973). Renyi indeksas nustato bendrą rūšių skaičių gausumą, kai $\alpha = 0$, Shannon-Weiner indeksą, kai $\alpha = 1$, Simpson-Yule indeksą, kai $\alpha = 2$ ir 1/Berger-Parker, arba dominavimo, indeksą, kai $\alpha = \text{Inf}$.

Koreliacijos matricos buvo sugeneruotos ieškant statistiškai reikšmingų ryšių tarp skirtingų rūšių dalyvavimo dydžių tyrimo vietose, rastų gametofitų ir sporofitų skaičiaus.

Erdvinė gametofitų ir sporofitų pasiskirstymo analizė atlikta naudojant CrimeStatsIII (Levine, 2010). Ši programa ir anksčiau naudota vertinant erdvinis ryšius tarp individų bendrijose (Bosiacka et al., 2008; Webster and Jenkins, 2008). Kiekvienam gametofitui ir sporofitui buvo nustatytos koordinatės mėginyje. Iš jų apskaičiuotas tikėtinas atstumas tarp gametofitų mėginyje, jei jie išsidėsto atsitiktinai. Tuomet Artimiausio kaimyno indeksas (NNI, angl. *Nearest Neighbor index*) buvo suskaičiuotas dalinant nustatytą vidutinį atstumą iš tikėtino atstumo mėginyje. Indekso vertės interpretuojamos: jei $\text{NNI} = 1$, individai išsidėsto

atsitiktinai; jei $NNI < 1$, individai grupuojasi; jei $NNI > 1$, individai išsidėsto tolygiai.

DNR juostų pasiskirstymu paremta analizė buvo atlikta sudarius aiškių, atsikartojančių DNR fragmentų pasiskirstymą atspindinčią binarinę duomenų matricą. Naudojant programą POPGENE, v. 1.31 apskaičiuotas polimorfizmas, polimorfinių lokusų skaičius, Nei genų įvairovė, Shannon indeksas. PCoA (angl. *Principal Coordinate Analysis*) analizė, molekulinės genetinės įvairovės analizė AMOVA (angl. *Analysis of Molecular Variance*; Excoffier et al., 1992) atliktos naudojant GenAlEx v. 6.5 (Peakall and Smouse, 2006).

Genetinės diferenciacijos koeficientas (G_{ST}) apskaičiuotas pagal formulę:

$$G_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$$

kur H_S ir H_T yra atitinkamai tikėtinas heterozigotiškumo laipsnis subpopuliacijose ir populacijoje bendrai. $H_T \geq H_S$, todėl G_{ST} negali viršyti $1 - H_S$ (Ryman and Leymar, 2009).

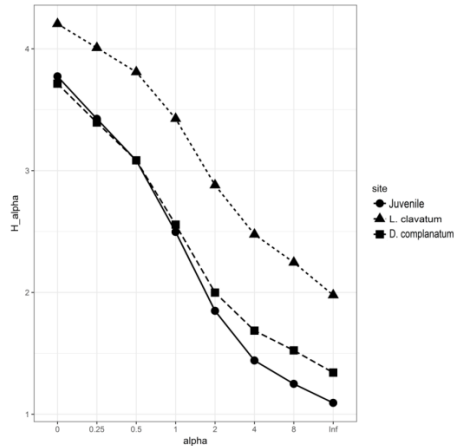
Genetiniai atstumai buvo suskaičiuoti pagal Nei ir Li (1979) formulę:

$$GD_{xy} = \frac{1 - 2N_{xy}}{N_x + N_y}$$

kur N_{xy} – x ir y augalams bendrų DNR juostų skaičius, N_x – DNR juostų skaičius, būdingas augalui x ir N_y – DNR juostų skaičius, būdingas augalui y.

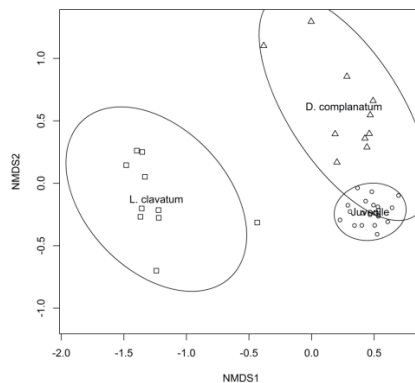
REZULTATAI

Augavietės su *Lycopodium* ir *Diphasiastrum* genčių požeminių gametofitų ir juvenilinių sporofitų populiacijomis. Per ketverius tyrimo metus lokalis juvenilinių pataisinių populiacijos buvo nustatytos 21 kartą. Šiose vietose atlikti geobotaniniai aprašymai vėliau palyginti su geobotaniniais aprašymais, atliktais sausuose Varėnos r. pušynuose su brandžiais *L. clavatum* (10) ir brandžiais *D. complanatum* (10). Bendras nustatytas rūšių skaičius laukeliuose su suaugusiais pataisiniais buvo 82 (Chao indekso tikėtina maksimali įvairovė – 92), o juvenilinių pataisinių laukeliuose iš viso nustatytos 55 rūšys (Chao indekso tikėtina maksimali įvairovė – 68). Renyi įvairovės profiliai (Renyi, 1961) parodė, kad bendra laukelių įvairovė (Shannon-Weiner indeksas, atitinkantis $\alpha = 1$) ir bendras rūšių gausumas buvo didžiausias laukeliuose su brandžiais *L. clavatum* (4 pav.). O laukeliai su brandžiais *D. complanatum* ir juvenilinėmis pataisinių populiacijomis buvo panašūs savo įvairove ir rūšių gausumu, tačiau, atsižvelgiant į Simpson panašumo indeksą ($\alpha = 2$), laukeliai su jaunais pataisiniais buvo įvairesni.



4 pav. Trijų pataisinių grupių Renyi įvairovės profiliai: su brandžiais *L. clavatum*, brandžiais *D. complanatum* ir juvenilniais pataisinais. $\alpha = 0$ atitinka rūšių gausumo indekso logaritmą; $\alpha = 1$ – Shannon įvairovės indekso, $\alpha = 2$ – Simpsono įvairovės indekso algoritmus. x ir y ašys atitinka Renyi formulės α vertę ir asocijuotą Renyi įvairovės profilio vertę

Naudojant nemetrinės daugiamačių skalių analizės metodą (NMDS, angl. *Non-metric Multidimensional Scaling*) ir Bray-Curtis indeksą, tirtų sausų pušynų bendrijose įvertintas vietovių su brandžiais *L. clavatum*, *D. complanatum* ir juvenilinėmis pataisinių populiacijomis pasiskirstymas pagal augalijos pobūdį (5 pav.). Nustatyta, kad juvenilinės pataisinių populiacijos prierašios labai panašioms bendrijoms, o vietovės su brandžiais *L. clavatum* ir *D. complanatum* pasižymi didesne rūšine įvairove ir nėra panašios. Laukelių su *D. complanatum* augalija panašesnė į laukelių su jaunais pataisinais augaliją.



5 pav. Daugiamatė pušynų su juvenilinėmis pataisinių populiacijomis ir brandžiais *L. clavatum* ir *D. complanatum* sąžalynais struktūra (NMDS) pagal Bray-Curtis indeksą

Varėnos r. sausų pušynų bendrijos su juvenilniais pataisinais nėra gausios rūšių, jose neišreikštas krūmų ardai, nebuvo subrendusių pataisinių sąžalynų, o

žolinėje dangoje vyravo *Deschampsia flexuosa* (L.) Trin. (6 pav.). Renyi įvairovės profiliai (Lövei et al., 2013) leidžia teigti, kad tirti miškai buvo lengvai sutrikdyti. Šios aukščiau išvardintos savybės yra svarbiausios naujoms juvenilinėms pataisinių populiacijoms susidaryti ir įsikurti.



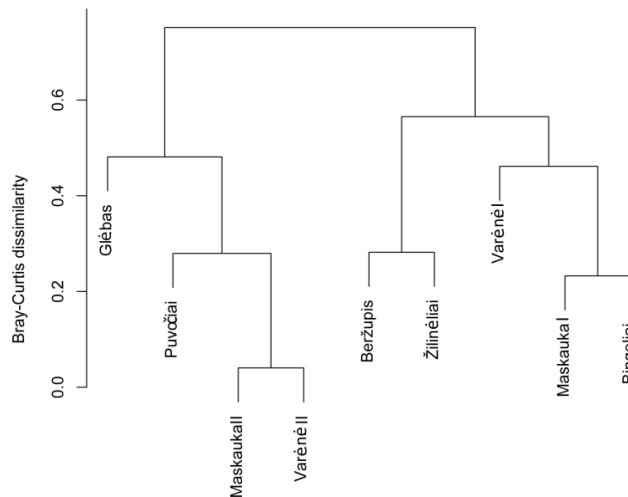
6 pav. Tipinė tyrimų vieta su juvenilniais pataisinais sausame pušyne: a – *Lycopodium annotinum*, b – *Diphasiastrum complanatum*

***Lycopodium* ir *Diphasiastrum* pataisinių pasitaikomumo dažnis.** Didžiausias bendras pataisinių dažnis buvo Varėnėje II (133 taškai iš 510 vertintų, 26,07 %), o mažiausias – Bingeliuose (du taškai, 0,39 %). Didžiausias juvenilinių pataisinių pasitaikomumas nustatytas Maskaukoje I (35 taškai, 6,86 %), mažiausias – Bingeliuose (du taškai, 0,39 %). Lygindami juvenilinių pataisinių pasitaikomumą visose devyniose tyrimų vietose, galime išskirti keturias grupes. Dviejose tyrimų vietose daugiau nei 80 % visų pataisinių buvo juveniliniai: Bingeliuose (100 %) ir Maskaukoje I (81 %). Trijose tyrimo vietose daugiau nei 50 % visų pataisinių buvo juveniliniai: Beržupyje (5 %), Varėnėje (51 %) ir Glėbe (51 %). Vienoje tyrimo vietoje – Žilinėliuose (32 %) – daugiau nei 30 % pataisinių buvo juveniliniai. Likusiose trijose tyrimo vietose mažiau nei 7 % pataisinių buvo juveniliniai: Varėnėje II (6 %), Maskaukoje II (5 %) ir Puvočiuose (5 %).

Penkiose tyrimo vietose vyravo *L. annotinum*, o likusiose keturiose – *L. clavatum* pasitaikomumas buvo didžiausias. Visose devyniose tyrimo vietose nustatytas didžiausias *L. annotinum* pasitaikomumas (nuo 2 iki 33 taškų). Juveniliniai *L. clavatum* pasitaikė tik trijose, o *D. complanatum* – keturiose tyrimo vietose (nuo 1 iki 3 taškų). Nė vienoje iš devynių tyrimo vietų visos trys vertintos sporifikuojančios pataisinių rūšys nebuvo rastos kartu. Trijų pataisinių rūšių suaugę, bet nesporifikuojantys individai pasitaikė kartu vienoje tyrimo vietoje – Puvočiuose. Trijose tyrimo vietose – Maskaukoje I, Varėnėje I ir Glėbe – juveniliniai trijų rūšių pataisiniai augo greta vieni kitų. Sporifikuojantis *L. annotinum* aptiktas tik vienoje tyrimo vietoje, o *L. clavatum* – penkiose, pasitaikomumas įvairavo nuo 5 (Žilinėliai) iki 87 taškų (Varėnė II). Sporifikuojantis *D. complanatum* pasitaikė tik trijose tyrimo vietose.

Varėnos rajono sausi pušynai pasižymi unikalia mozaikiška pataisinių populiacijų struktūra. Čia palyginti nedideliu atstumu išsidėsčiusias lokalias pataisinių populiacijas sudaro įvairių rūšių ir skirtingos raidos stadijų pataisiniai. Bingelių ir Maskaukos I pataisinių populiacijos buvo jauniausios, o Varėnės II, Maskaukos II ir Puvočių pataisinių populiacijos – pasiekusios brandą. Klasterinė analizė su Bray-Curtis indeksu (7 pav.) devynias tyrimo vietas padalino į dvi grupes. Pirmą grupę sudaro brandžios pataisinių populiacijos: Glėbas, Puvočiai, Maskauka II, Varėnė II, o antrą – jaunos pataisinių populiacijos: Beržupis, Žilinėliai, Varėnė I, Maskauka I ir Bingeliai. Artimiausios pataisinių populiacijos pagal bendrą pataisinių pasitaikomumą buvo Maskauka II ir Varėnė II bei Maskauka I ir Bingeliai.

Visose devyniose tyrimo vietose didžiausias pasitaikomumo dažnis buvo juvenilinių *L. annotinum*. Dažniausia sporifikuojanti pataisinių rūšis buvo *L. clavatum*.



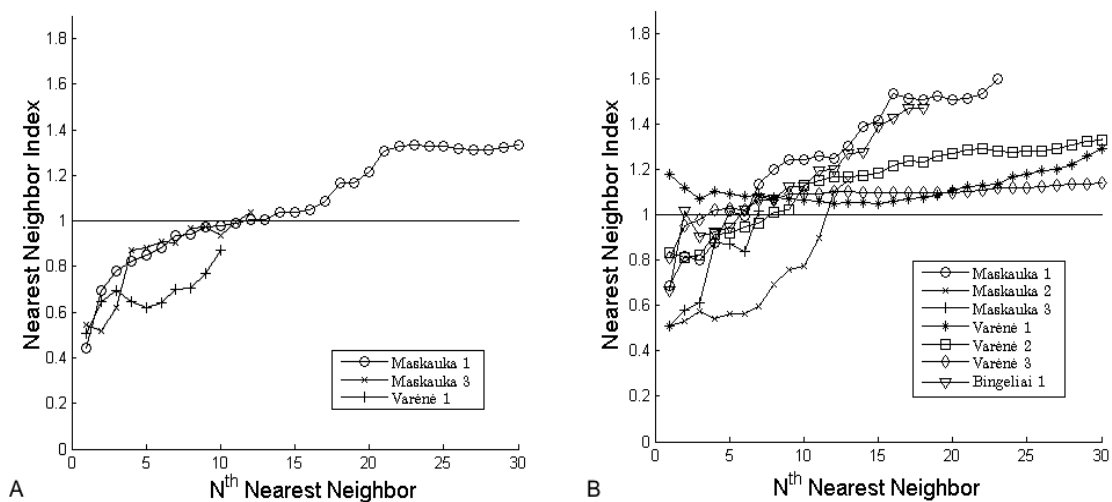
7 pav. Devynių tyrimo vietų klasterinė dendrograma pagal bendro skirtingų raidos stadijų trijų pataisinių rūšių pasitaikomumo Bray-Curtis indeksą

***Lycopodium* ir *Diphasiastrum* požeminių pataisinių ir juvenilinių sporofitų populiacijų įvairovė.** Per ketverius tyrimo metus rasti 595 gametofitai (1 lent.). Rastų požeminių gametofitų pasiskirstymas dirvožemio mėginiuose nebuvo tolygus. Daugiausia viename mėginyje buvo rasti 133 gametofitai (Varėnė I), mažiausiai – 2 gametofitai (Žilinėliai). Požeminių gametofitų ir antžeminių sporofitų santykis taip pat nebuvo tolygus. 12-oje mėginių iš 31 juvenilinių sporofitų skaičius buvo mažesnis nei dirvožemyje rastų gametofitų, 10-yje mėginių juvenilinių sporofitų skaičius buvo didesnis nei dirvožemyje rastų gametofitų. Dviejuose mėginiuose gametofitų ir sporofitų santykis buvo vienodas, viename buvo rasta gametofitų, nors juvenilinių sporofitų neaptikta (Žilinėliai).

1 lentelė. Skirtingos raidos stadijos gametofitų ir juvenilinių sporofitų, rastų dirvožemio mėginiuose, skaičius

Gametofitai ir jaunatviniai sporofitai	2014	2013	2012	Iš viso
Rutuliškas	5	3	8	16
Disko pavidalo	33	7	40	80
Dubenėlio pavidalo	69	183	120	372
Dubenėlio pavidalo su sporofitu	12	22	20	54
Šakniavaisių morkos ar runkelio pavidalo	3	33	31	67
Šakniavaisių morkos ar runkelio pavidalo su sporofitu	0	5	2	7
Gametofitų skaičius iš viso	122	253	221	595
<i>L. annotinum</i> juveniliniai sporofitai	108	26	21	155
<i>L. clavatum</i> juveniliniai sporofitai	0	1	2	3
<i>D. complanatum</i> juveniliniai sporofitai	1	0	3	4
Juvenilinių sporofitų skaičius iš viso	109	27	26	162

Erdvinė gametofitų ir juvenilinių sporofitų populiacijų struktūra. Aukštesnės eilės artimiausio kaimyno analizė (angl. *Higher order nearest neighbor analysis*) Maskaukos I, Varėnės I ir Bingelių mėginių pavyzdžiu (8 pav.) parodė, kad pataisinių gametofitai ir juveniliniai sporofitai yra linkę grupotis ir jų pasiskirstymas dirvožemio mėginyje nebuvo visiškai atsitiktinis. Juveniliniai sporofitai buvo linkę telktis labiau nei gametofitai.



8 pav. Erdvinė juvenilinių pataisinių kaimyniškumo struktūra dirvožemio mėginiuose (1–3) Pietryčių Lietuvos sausuose pušynuose: Maskaukos I, Varėnės I ir Bingelių tyrimo vietose. A – juveniliniai sporofitai, B – gametofitai. Vertės: < 1 rodo agregaciją, = 1 – atsitiktinį pasiskirstymą, > 1 – tolygų pasiskirstymą (Rimgailė-Voicik et al., 2015)

Artimiausio kaimyno indeksas (NNI, angl. *Nearest neighbor index*) Maskaukos I ir Varėnės I mėginiuose buvo 0,44–0,55, o vidutinis atstumas (r_A) tarp juvenilinių pataisinių – 1,65–3,78 cm. Visais atvejais atstumas buvo mažesnis nei tikėtinas, jeigu pasiskirstymas būtų atsitiktinis. Gametofitų grupavimasis buvo ne

toks ryškus, artimiausio kaimyno indeksas visuose mėginiuose buvo 0,51–0,84. Didžiausios NNI vertės buvo Varėnės I mėginiuose, viename NNI viršijo vieneta: 1,18.

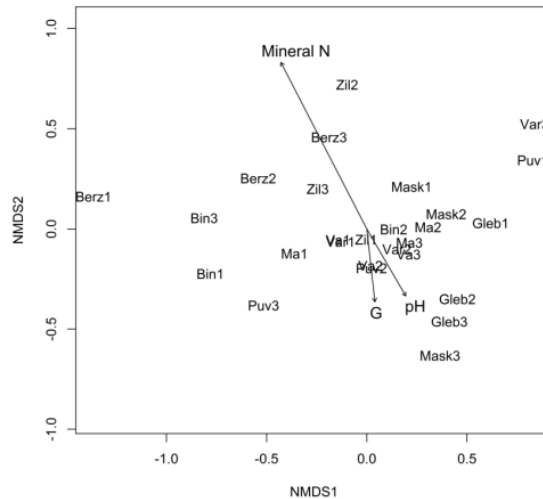
Visi rasti gametofitai buvo humuso sluoksnyje, 0,1–2 cm gylyje. Rutuliški, netaisyklingo dubenėlio pavidalo ir netaisyklingo dubenėlio pavidalo su ūgliu gametofitų rasti 0,2–0,3 cm gylyje, o dauguma disko pavidalo gametofitų – 0,2–0,4 cm gylyje. Pavienių disko pavidalo gametofitų pasitaikė 1 cm gylyje. Netaisyklingo dubenėlio pavidalo gametofitų su ūgliais buvo rasta 1,7 cm gylyje, o netaisyklingo dubenėlio pavidalo gametofitų – net 2 cm gylyje. Dažniausiai I tipo gametofitai aptikti 0,2–0,4 cm gylyje. II tipo gametofitų viršūnės dažniausiai buvo 0,2 cm, bet pasitaikė ir 1,2–1,8 cm gylyje. Reikšmingos koreliacijos tarp gametofitų ilgio ir gylio nenustatėme ($r_{xy} = 0,113$, $p = 0,06$).

Požeminių gametofitų ir juvenilinių sporofitų pasitaikomumo ir dirvožemio savybių ryšiai. Priežastys, lemiančios lokalių juvenilinių pataisinių populiacijų susidarymą miškuose, nėra nustatytos. Mes atlikome dirvožemio cheminės sudėties analizę. Adonis funkcija Vegan pakete atskleidė, kad tik mineralinio azoto kiekis devyniose tyrimo vietose skyrėsi reikšmingai ($R^2 = 0,135$, $p < 0,05$). Dirvožemio pH visuose vietovėse buvo rūgštus (3,1–3,7), kiti parametrai reikšmingai nesiskyrė. Organinės anglies kiekis (0,84–3,95) buvo didžiausias Puvočiuose, kur pH buvo žemiausias (3,1) ir nebuvo rasta gametofitų. Žilinėliai išsiskyrė daugelio vertintų savybių aukščiausiomis vertėmis (P_2O_5 , K_2O , Ca, Mg, bendras N), bet šioje tyrimų vietoje buvo rasta nedaug gametofitų. Varėnės I tyrimo vietoje iš viso buvo rasti 207 gametofitai, bet dirvožemio mėginių cheminės analizės rezultatai nebuvo išskirtiniai. Įvertinus Bingelių ir Maskaukos I tyrimo vietų, kurios buvo panašiausios pagal bendrą pataisinių pasitaikomumą ir rastų gametofitų skaičių (45 Maskaukoje I ir 38 Bingeliuose), matyti, kad Maskauka I išsiskyrė mažiausiais P_2O_5 , K_2O ir bendros C kiekiais, o Bingeliuose nustatyti mažiausi Ca, Mg bei antri mažiausi P_2O_5 ir K_2O kiekiai. Todėl galime teigti, kad dirvožemis su gausiomis juvenilinėmis pataisinių populiacijomis yra rūgščios reakcijos ir labai skurdus, turi mažą maistmedžiagių ir mikroelementų kiekį. Statistinė analizė parodė, kad pH vertė koreliuoja su rastų gametofitų skaičiumi: pH vertei didėjant mažėja mineralinio azoto kiekis (9 pav.).

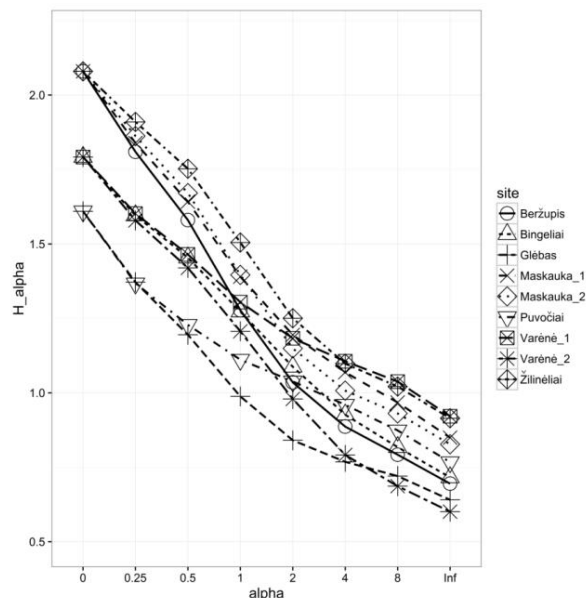
Požeminių gametofitų ir juvenilinių sporofitų ryšiai su augalija. Pearson koreliacijos koeficientas parodė vidutinę teigiamą koreliaciją tarp rastų pataisinių gametofitų ir sporofitų skaičiaus ($r_{xy} = 0,57$; $p < 0,05$). Rūšių dalyvavimo dydžio duomenys buvo naudoti tikrinant, ar pataisinių dalyvavimas koreliuoja su kitomis augalų rūšimis. Nustatyta silpna teigiama koreliacija tarp *D. flexuosa* ir *L. annotinum* ($r_{xy} = 0,39$; $p < 0,05$) ir vidutinė neigiama koreliacija tarp *D. flexuosa* ir *Vaccinium myrtillus* L. ($r_{xy} = -0,41$; $p < 0,05$), *L. annotinum* ir *V. myrtillus* ($r_{xy} = -0,37$; $p < 0,05$).

Visi Beržupio, Puvočių mėginiai, du Bingelių mėginiai ir du Žilinėlių mėginiai buvo labiau išsibarstę NMDS diagramoje su 7 % Kendall streso verte. Kitų

mėginių augalija buvo panaši. Remiantis Renyi įvairovės profiliais, devynios tyrimo vietos negali būti suklasifikuotos pagal įvairovę, nes ties skirtingų indeksų vertėmis jos ne kartą kerta viena kitą (10 pav.).



9 pav. Daugiamatė sausų pušynų bendrijų su juvenilinėmis pataisinių populiacijomis struktūra NMDS pagal Bray-Curtis indeksą: pH ir G vektoriai rodo teigiamą koreliaciją tarp rastų gametofitų skaičiaus ir didėjančios pH vertės, Mineral N rodo neigiamą koreliaciją tarp mineralinio azoto kiekio mėginiuose ir pH bei gametofitų skaičiaus



10 pav. Devynių tyrimo vietų augalijos Renyi įvairovės profiliai. $\alpha = 0$ atitinka rūšių gausumo indekso logaritmą; $\alpha = 1$ yra Shannon įvairovės indeksas, $\alpha = 2$ yra Simpsono įvairovės indekso algoritmas. x ir y ašys atitinka Renyi formulės alpha vertę ir asocijuotą Renyi įvairovės profilio vertę

Augalijos kaita pastoviam tyrimų laukelyje su juveniline pataisinių populiacija. Pastoviam Maskaukos laukelyje flora nebuvo gausi rūšių ir per ketverius metus trukusį tyrimą rūšių gausumas mažai įvairavo (2 lent.).

2 lentelė. Pastovaus 100 m² Maskaukos tyrimo laukelio (54.28202, 24.59892 WGS) su juvenilniais pataisinais požymiais

Požymiai	2012	2013	2014	2015
Laukelių* su juvenilniais pataisinais skaičius	12	11	13	13
Vidutinis ± SD žolių ir krūmokšnių padengimas (%)	34 ± 23	35 ± 23	34 ± 23	36,3 ± 15
Vidutinis ± SD samanų ir kerpių padengimas (%)	95 ± 14	95 ± 13	95 ± 14	98 ± 9
Absoliuti dažniausių rūšių gausa:				
<i>Pleurozium schreberi</i>	52,1	51,7	54,4	52,9
<i>Deschampsia flexuosa</i>	20,6	21,3	20,3	20,4
<i>Dicranum polysetum</i>	17,5	17,5	15,1	14,0
<i>Vaccinium myrtillus</i>	1,1	1,1	1,4	2,7
<i>Vaccinium vitis-idaea</i>	0,7	0,7	0,8	1,5
Induočių augalų rūšių skaičius	7	8	10	13
Samanų bei kerpių rūšių skaičius	6	4	6	5
Bendras rūšių skaičius	13	12	16	18

* Bendras laukelių skaičius – 100. SD – standartinis nuokrypis

Deschampsia flexuosa nustatyta 96 laukeliuose iš 100, jos vidutinis projekcinis padengimas buvo 46 %. Koreliacijos matrica atskleidė silpną teigiamą koreliaciją tarp *D. flexuosa* ir *L. annotinum* dalyvavimo dydžių ($r_{xy} = 0,22$; $p < 0,05$). Kitų statistiškai reikšmingų koreliacijų tarp *L. annotinum* ir kitų rūšių nebuvo nustatyta.

Statistinė analizė parodė, kad laukeliai, kurių nedengė medžių laja, turėjo stabilesnę rūšių įvairovę ir gausumą bei reikšmingai nepakito per tyrimo laikotarpį. Juveniliniai pataisiniai rasti tik neužpavėsintuose laukeliuose. Nustatyta, kad medžių lajos užpavėsinti laukeliai reikšmingai skyrėsi nuo neužpavėsintų laukelių nuo 2012 iki 2014 m. (permutational MANOVA pagal Bray-Curtis indeksą; $R^2 = 0,05$; $p < 0,01$), bet 2015 m. skirtumo nebuvo. Shannon indeksas tarp laukelių įvairiais metais skyrėsi reikšmingai (pakartotinių matavimų ANOVA su Greenhouse-Geisser korekcija; $F = 19,1649$; $p < 0,0001$). Post hoc testais, naudojant Bonferroni korekciją, buvo nustatyta, kad tik 2015 metais duomenys statistiškai reikšmingai skyrėsi nuo kitų metų ($p < 0,01$). Tolesnė analizė atskleidė, kad tyrimo laikotarpiu Shannon indeksas reikšmingai skyrėsi ir kai tik laukeliai be medžių lajų buvo įtraukti į analizę (pakartotinių matavimų ANOVA; $F = 18,08$; $p < 0,0001$). Simpson indeksas taip pat reikšmingai skyrėsi tarp tyrimo metų (pakartotinių matavimų ANOVA; $F = 18,17$; $p < 0,0001$) ir post hoc testais naudojant Bonferroni korekciją atskleidė, kad tik 2015 m. duomenys reikšmingai skyrėsi nuo kitų metų ($p < 0,01$). Simpson indeksas taip pat statistiškai reikšmingai skyrėsi įvairiais tyrimo metais ($F = 18,08$; $p < 0,0001$) ir kai tik laukeliai su medžių lajomis buvo įtraukti į analizę.

Daugelyje laukelių žolių ir krūmokšnių projekcinis padengimas buvo didesnis nei 50 % ir reikšmingai per tyrimo metus nepakito. Iš viso juveniliniai pataisiniai dengė apie 10 % bendro pastovaus laukelio ploto, augo 14-oje iš 100 laukelių, iš viso virš samanų sluoksnio užfiksuoti 35 ūgliai. Juveniliniai *L. annotinum* vyravo,

L. clavatum augo tik viename laukelyje kartu su *L. annotinum*, *Diphasiastrum* nepasitaikė. Kiekvienais metais laukelyje atsirasdavo medžių daigų, bet dauguma jų žūdavo. Samanų ir kerpių projekcinis padengimas buvo artimas 100 %. Tik *Pleurozium schreberi* (Brid.) Mitt. augo visuose laukeliuose kartu su juvenilniais pataisiniais (2 lent.). Nors statistinė analizė parodė, kad laukelių su juvenilniais pataisiniais augalija tyrimo laikotarpiu reikšmingai nesikeitė, būtent juose buvo nustatytos negausios samanų rūšys, pasitaikiusios tik vieną sezoną.

2015 m. dvidešimt 10×10 cm dydžio dirvožemio mėginių buvo išanalizuota ir rasti 22 *L. annotinum* ir 1 *L. clavatum* juveniliniai sporofitai. Taip pat samanų sluoksnyje rasti 3 žuvę juveniliniai sporofitai. Vieno mėginio iš 20 humusingajame horizonte, 0,2 cm gylyje, buvo rasti du netaisyklingo dubenėlio pavidalo gametofitai (I tipas, *Lycopodium clavatum* tipas pagal Bruchmann, 1898: *Lycopodium* sp.; $1,5 \times 1,8$ cm ir $0,4 \times 1,2$ cm). Sporofitų ilgis, šakojimosi pobūdis ir kiti augimo parametrai buvo netolygūs (3 lent.). Cheminė analizė parodė, kad dirvožemis yra silpnai rūgštus (pH 5), bendras azotas sudaro $1,3 \pm 0,11$ g / kg, o bendras fosforas -10 ± 1 mg / kg.

3 lentelė. Duomenys apie juvenilinius pataisinius, surinktus iš pastovaus Maskaukos tyrimų laukelio 2015 m.

Požymis	Vidurkis ir SD	Max	Min
Samanų sluoksnis, cm	$4,65 \pm 1,87$	9	2
Humuso sluoksnis, cm	$2,36 \pm 0,97$	4	0,8
Juvenilinių sporofitų skaičius mėginyje*	$1,21 \pm 0,71$	4	1
Metinių lapų sutankėjimų skaičius	$3,68 \pm 1,55$	8	2
Šaknų skaičius	$2,52 \pm 1,16$	6	1
Šakų skaičius	$4,04 \pm 3,5$	13	1
Atstumas tarp šakų, cm	$2,43 \pm 1,77$	17	0,8
Šakų ilgis, cm	$3,27 \pm 2,97$	12,3	0,2
Juvenilinių sporofitų ilgis, cm	$16,39 \pm 7,87$	39,9	7,2

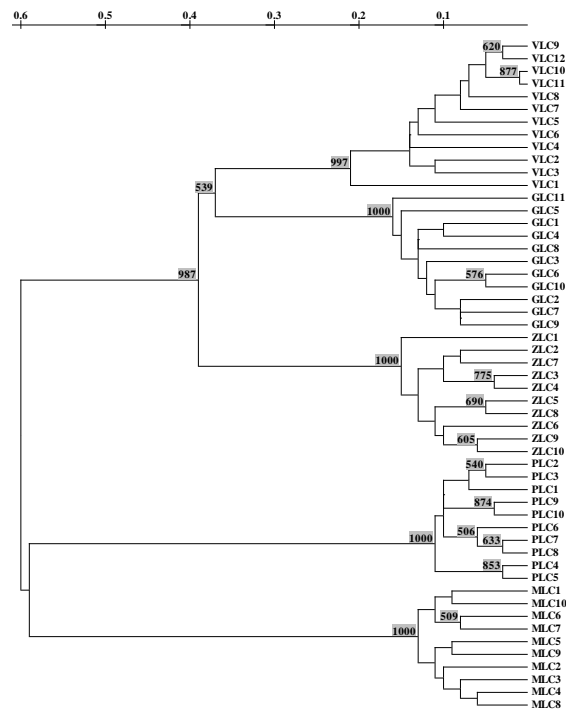
* Iš viso rasti 23 juveniliniai sporofitai

Pataisų genetinės įvairovės tyrimai. Atliekant pataisų populiacijų Varėnos r. genetinės struktūros tyrimus buvo ištirti 103 augalai iš dešimties populiacijų: 50 *L. annotinum* ir 53 *L. clavatum* augalai. ISSR analizei panaudoti keturi pradmenys: B, C, I-28 ir I-50a. *Lycopodium clavatum* populiacijose bendras pagausintų DNR juostų skaičius buvo 129, o *L. annotinum* – 127. DNR fragmentų dydis įvairavo nuo 280 iki 1800 bp, šeši fragmentai buvo monomorfiniai (4 lent.).

4 lentelė. *L. clavatum* ir *L. annotinum* populiacijų 103 pavyzdžių DNR polimorfizmas

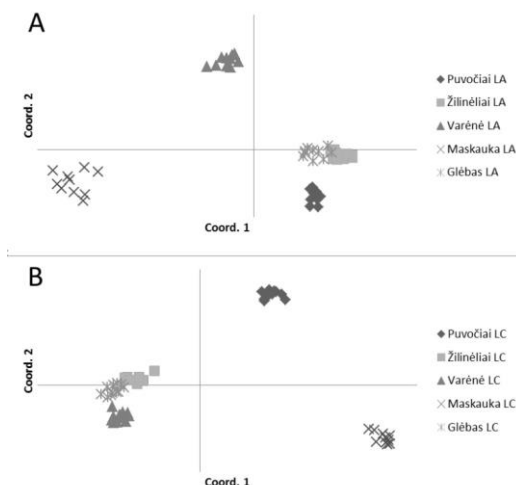
Pradmuo	Seka 5'→3'	Nustatytų lokusų skaičius	Monomorfinių/ Polimorfinių lokusų skaičius	DNR fragmentų dydis (bp)	Polimorfizmas, %	
<i>L. annotinum</i>						
ISSR B	(AG) ₈ CG	23	0	23	320-1800	100
ISSR C	(AG) ₈ TG	34	1	33	280-1800	97
ISSR I-28	(GT) ₆ CG	34	1	33	320-1800	97
ISSR I-50a	CCA(GCT) ₄	36	0	36	380-1800	100
Iš viso		127	2	125	280-1800	98
<i>L. clavatum</i>						
ISSR B	(AG) ₈ CG	24	2	22	280-1200	91
ISSR C	(AG) ₈ TG	31	0	31	320-1800	100
ISSR I-28	(GT) ₆ CG	35	1	34	320-1600	97
ISSR I-50a	CCA(GCT) ₄	39	1	38	320-1800	97
Iš viso		129	4	125	280-1800	96

Tirtų populiacijų tarpusavio giminingumas buvo įvertintas UPGMA klasterinės analizės metodu. UPGMA analizė suskirstė genotipus į dvi dideles grupes, kurios atitiko tiriamas rūšis. Pakartojus analizę rūšių lygmenyje, dendrograma taip pat parodė didesnę genetinę panašumą tarp augalų populiacijos ribose nei tarp populiacijų (11 pav.)



11 pav. Penkių *L. clavatum* populiacijų genetinės įvairovės dendrograma pagal ISSR lokusų polimorfizmą. Dendrograma sudaryta UPGMA metodu, naudojant Nei ir Li genetinių atstumų matricą su 1000 iteracijų. LC – *L. clavatum*, LA – *L. annotinum* populiacijos: V – Varėnė, G – Glėbas, Z – Žilinėliai, P – Puvočiai, M – Maskauka

Genetinės įvairovės rodikliai pateikti 5 ir 6 lentelėse. Vidutinis polimorfizmas *L. clavatum* populiacijose buvo žemesnis (18,37 %) nei *L. annotinum* (22,97 %). Didžiausias polimorfizmas nustatytas Maskaukos *L. annotinum* populiacijoje. PCoA koordinacijų analizė atskleidė, kad Maskaukos ir Varėnės *L. annotinum* bei Maskaukos ir Puvočių *L. clavatum* populiacijos labiausiai skiriasi nuo likusių tirtų populiacijų (12 pav.).



12 pav. Principinių koordinacijų analizė (PCoA), atlikta naudojant Nei genetinių atstumų 103 individų matricą ir rodanti genetinį penkių *L. clavatum* (B) bei penkių *L. annotinum* (LA) populiacijų panašumą

5 Lentelė. Penkių *L. clavatum* (LC) ir penkių *L. annotinum* (LA) genetinės įvairovės rodikliai pagal keturis 4 ISSR žymenis

Populiacija	Indiv. sk.	Lokusų sk.	Unikalių lokusų sk.	Polimorfinių lokusų sk.	Polimorfizmas, %	Na ¹ ±SD	Ne ² ±SD	h ³ ± SD	I ⁴ ± SD
Puvočiai LC	10	60	1	20	13,51	1,135 ± 0,343	1,080 ± 0,232	0,047 ± 0,129	0,070 ± 0,188
Žilinėliai LC	10	55	1	22	14,86	1,149 ± 0,357	1,112 ± 0,282	0,062 ± 0,154	0,090 ± 0,220
Varėnė LC	12	60	1	29	19,59	1,196 ± 0,398	1,134 ± 0,309	0,074 ± 0,163	0,109 ± 0,233
Maskauka LC	10	82	8	34	22,97	1,230 ± 0,422	1,159 ± 0,313	0,091 ± 0,173	0,133 ± 0,250
Glėbas LC	11	66	3	31	20,95	1,210 ± 0,408	1,126 ± 0,286	0,073 ± 0,157	0,108 ± 0,226
Puvočiai LA	10	49	0	23	15,54	1,155 ± 0,364	1,101 ± 0,258	0,059 ± 0,144	0,087 ± 0,209
Žilinėliai LA	10	58	0	36	24,32	1,243 ± 0,431	1,131 ± 0,265	0,081 ± 0,154	0,123 ± 0,229
Varėnė LA	10	56	0	27	18,24	1,182 ± 0,388	1,099 ± 0,245	0,060 ± 0,138	0,091 ± 0,204
Maskauka LA	10	95	11	52	35,14	1,351 ± 0,479	1,220 ± 0,335	0,130 ± 0,187	0,193 ± 0,273
Glėbas LA	10	62	2	32	21,62	1,216 ± 0,413	1,123 ± 0,275	0,073 ± 0,153	0,110 ± 0,224

1 – nustatytų alelių skaičius, 2 – efektyvių alelių skaičius; 3 – Nei genetinė įvairovė; 4 – Shannon indeksas, 4 – Nei ir Li genetinis atstumas

6 lentelė. *Lycopodium clavatum* ir *L. annotinum* populiacijų genetiniai panašumai (virš įstrižainės) ir genetiniai atstumai (po įstrižainės)

<i>L. clavatum</i>					
	Puvočiai LC	Žilinėliai LC	Varėnė LC	Maskauka LC	Glėbas LC
Puvočiai LC	****	0,784	0,728	0,629	0,770
Žilinėliai LC	0,244	****	0,819	0,643	0,819
Varėnė LC	0,318	0,200	****	0,645	0,844
Maskauka LC	0,463	0,442	0,438	****	0,694
Glėbas LC	0,262	0,201	0,170	0,365	****
<i>L. annotinum</i>					
	Puvočiai LA	Žilinėliai LA	Varėnė LA	Maskauka LA	Glėbas LA
Puvočiai LA	****	0,841	0,752	0,684	0,816
Žilinėliai LA	0,173	****	0,783	0,657	0,834
Varėnė LA	0,285	0,245	****	0,736	0,775
Maskauka LA	0,375	0,420	0,306	****	0,676
Glėbas LA	0,204	0,182	0,255	0,391	****

DISKUSIJA

Mokslinių duomenų apie pataisinių populiacijų funkcionavimą ir ekologiją yra palyginti mažai, todėl daug šių augalų biologijos fundamentinių klausimų lieka neatsakytų. Nuo 1873 m. iki dabar buvo paskelbta mažiau nei 25 moksliniai straipsniai apie gamtoje rastus pataisinių požeminius gametofitus ir juvenilinius sporofitus. Mūsų žiniomis, nebuvo publikuotas nė vienas darbas apie juvenilinių pataisinių populiacijų struktūrą ir dinamiką. Mūsų tyrimai parodė, kad sausuose Pietryčių Lietuvos pušynuose lokaliuose teritorijose gali susidaryti gana gausios požeminių pataisinių gametofitų populiacijos (iki 500 individų 1 m²). Kiti tyrėjai taip pat yra aptikę gausių pataisinių gametofitų populiacijų. Pavyzdžiui, Masačusetse, JAV, Degener (1924) surado apie 300 *Lycopodium annotinum* ir *L. clavatum* gametofitų, o Stokey ir Starr (1924) rado daugiau nei 100 juvenilinių *Diphasiastrum complanatum* sporofitų. Daugelis pteridologų (Bruchmann, 1898; Oinonen, 1968; Horn et al., 2013) mano, kad pataisinių gametofitų susidarymas yra labai retas ir unikalus reiškinys, o patys gametofitai dirvožemyje išlieka gyvybingi nuo kelerių metų iki dešimtmečių (Bruchmann, 1898; Eames, 1942). Tinkamiausiais požeminių gametofitų indikatoriais tebėra juveniliniai sporofitai. Iš 31 dirvožemio pavyzdžio, paimto devyniose Varėnos r. pušynų tyrimo vietose su juveniliniais sporofitais, 20-yje radome gametofitų. Nustatyta vidutinė statistiškai patikima sąsaja tarp rastų požeminių gametofitų ir juvenilinių sporofitų skaičiaus. Įvairūs autoriai (Bruchmann, 1898; Degener, 1924; Gauthier and Dumais, 1938) teigė, kad pataisinių gametofitai gali būti rasti tik tose vietose, kur nėra brandžių sporofitų. Paparčių *Athyrium filix-femina*, *Gymnocarpium dryopteris*, *Phegopteris connectilis* požeminių propagulių taip pat pasitaikė dirvožemyje, kur brandžių sporofitų nebuvo (Rydgren and Hestmark, 1997).

Kol kas nėra sukurto neinvazinio metodo, kuriuo būtų galima nustatyti požeminių gametofitų populiacijų ribas, todėl nesuardant populiacijos įmanoma vertinti tik juvenilinių sporofitų paplitimą. Požeminių pataisinių gametofitų ir antžeminių sporofitų santykis dirvožemio mėginiuose nebuvo tolygus. 12-oje dirvožemio mėginių iš 31 antžeminių sporofitų skaičius buvo mažesnis nei

požeminių gametofitų, o 10-yje mėginių nustatytas atvirkščias santykis. Tiriant *Botrychium* populiacijas, požeminių gametofitų buvo nustatyta kelis kartus daugiau nei antžeminių sporofitų (Johnson-Groh et al., 2002). Kartais pataisinių gametofitų prie juvenilinių sporofitų nepavyksta rasti. Tik labai jauni ortotropinio augimo sporofitai yra patikimi požeminių gametofitų indikatoriai. Sėkminga gametofitų paieška priklauso ir nuo mėginių dydžio. Norint atlikti gametofitų erdvinę analizę, reikia imti didesnius, 25 × 25 cm ar 50 × 50 cm dydžio, dirvožemio mėginius. Vieno tokio dirvožemio mėginio analizė užtrunka nuo dviejų iki keturių dienų (Rimgailė-Voicik et al., 2015).

Juvenilinių pataisinių gametofitų populiacijų įvairovė ir struktūra. Šiaurės pusrutulyje I tipo, arba *Lycopodium clavatum*, (pagal Bruchmann, 1898) susidaro dažniau nei II tipo, arba *Diphasiastrum complanatum*, gametofitai. Skirtingo išsivystymo juveniliniai pataisinių sporofitai, rasti pastoviam Maskaukos tyrimų laukelyje, leidžia daryti prielaidą, kad pataisinių juvenilinių populiacijų vystymasis yra asinchroninis. Mūsų tyrimo rezultatai sutampa su Eames (1942) duomenimis. Asinchroninę pataisinių jaunatvinių populiacijų raidą gali lemti dvi pagrindinės priežastys: 1) sporų sudygimas konkrečioje vietoje nėra vienalaikis, 2) gametofitų vystymosi laikas įvairuoja. Galima teigti, kad juvenilinės pataisinių populiacijos yra sudarytos iš skirtingo amžiaus sporofitų, atsiradusių iš įvairaus kalendorinio amžiaus gametofitų. Todėl juveniliniai sporofitai neturėtų būti genetiškai identiški.

0,25 m² dirvožemio mėginiuose pataisinių gametofitų gausumas buvo įvairus. Gausiausia grupė buvo I tipo netaisyklingo dubenėlio pavidalo gametofitai (372). Viename dirvožemio mėginyje radome nuo 5 iki 133 gametofitų ir nuo 4 iki 45 juvenilinių sporofitų. Antžeminių juvenilinių sporofitų ir požeminių gametofitų santykis dirvožemio mėginiuose taip pat įvairavo. Pavyzdžiui, mėginyje su 45 juveniliniais sporofitais rasti tik 24 gametofitai, o mėginyje su 15 juvenilinių pataisinių rasti net 133 gametofitai. Dirvožemio mėginys su 133 gametofitais išsiskyrė itin tankia *Deschamsia flexuosa* veja ir nesusivėrusiu samanų sluoksniu. Panašu, kad *D. flexuosa* galėjo lemti specifinio mikroklimato, itin palankaus gametofitams vystytis, susidarymą.

Mokslinių duomenų apie požeminių pataisinių gametofitų populiacijų funkcionavimą beveik nėra paskelbta. Tyrimų metu dirvožemyje randama tiek pavienių (Bruchmann, 1898; Stokey and Starr, 1924; Horn et al., 2013), tiek į įvairaus dydžio santalkas susitelkusių (Stokey and Starr, 1924; Eames, 1942) gametofitų ir juvenilinių sporofitų. Juveniliniai sporofitai su nesuirusiais gametofitais randami įvairių raidos stadijų: nuo požeminių nefotosintetinančių iki išsišakojusių fotosintetinančių. Mūsų tyrimai parodė, kad humusingajame horizonte pataisinių gametofitai: 1) gali augti atskirai, 2) gali priartėti vieni prie kitų be tiesioginio kontakto, 3) gali tiesiogiai kontaktuoti (Rimgailė-Voicik et al., 2015). Dažniausiai grupės susidaro iš 2–5 skirtingos raidos stadijos pataisinių gametofitų. Manoma, kad tokios gametofitų grupės susidaro palaipsniui (Naujalis, 1995). Nors dvilyčiai gametofitai gali būti laikomi optimaliausia dauginimosi

sistema dėl daug didesnės apvaisinimo tikimybės, kai anteridžiai ir archegonės išsidėsto labai arti vieni kitų, bet dėl didėjančio homozigotiškumo gali kilti inbrydingo depresija (Charnov, 1982).

Dauguma požeminių gametofitų buvo rasti 0,2–0,4 cm gylyje. Tos pačios arba panašios vystymosi stadijos gametofitų rasta visose humuso sluoksnio dalyse. Artimiausio kaimyno indeksas parodė, kad juveniliniai sporofitai linkę labiau telktis nei gametofitai. Tikėtina, kad tokio juvenilinių sporofitų išsidėstymo pagrindinė priežastis – netolygus maistmedžiagių pasiskirstymas. Gali būti, kad rasti juveniliniai sporofitai susidaro po tarpgametofitinio apvaisinimo, bet daugeliu atvejų gametofitai nesudarė grupių, tad apvaisinimas tame pačiame gametofite labiau tikėtinas.

Dabartinių (Rimgailė-Voicik et al., 2015) ir ankstesnių (Naujalis, 1995) tyrimų Lietuvoje metu buvo rasti keli gametofitai su dviem ar daugiau sporofitų ūglių, tad apvaisinimas gametofite gali įvykti pakartotinai, jeigu pirmas sporofito ūglis nežūva. Reiškiny, kad daugiau nei vienas sporofitas auga iš to paties gametofito, buvo nustatytas ir anksčiau. Eames teigimu (1942), du sporofitų ūgliai pasitaiko dažnai, 3–5 – rečiau, o iš vieno didelio gametofito buvo išaugę net septyni normaliai išsivystę sporofitų ūgliai. Bruce ir Beitel (1979) rado 26 gametofitus, kurie turėjo vieną sporofito ūglį, o dar 25 turėjo daugiau nei po vieną. Daugiausiai iš vieno gametofito buvo išaugę 13 sporofitų ūglių!

Juvenilinių pataisinių populiacijų augavietės. Juvenilinių pataisinių populiacijų susidarymas sausuose pušynuose yra lokalus reiškinys, nulemtas specifinių aplinkos sąlygų. Pagrindinis juvenilinių pataisinių populiacijų stabilumo veiksnys gali būti nuolatinis jų papildymas naujais gametofitais ir jų ilgaamžiškumas. Tikėtina, kad aplinkos sąlygos, būtinos juvenilinėms pataisinių populiacijoms įsikurti, nėra trumpalaikės. Dirvožemio heterogeniškumą lemia mikrotopografijos, mikroklimato, tėvinių individų, mikorizės ir mikroorganizmų įvairovė (Stark, 1994). Neaišku, ar nauji gametofitai susidaro kasmet ir kas – mikorizė ar fotosintezė – yra svarbiausi veiksniai, lemiantys sėkmingą juvenilinio pataisinio vystymąsi. Tinkamose augavietėse požeminiai gametofitai ir juveniliniai sporofitai sudaro gausias 1–6 rūšių individų grupes, greta kurių nėra sporifikuojančių klonų (Fankhauser, 1873; Bruchmann, 1898; Lang, 1899; Spessard, 1922; Stokey and Starr, 1924; Degener, 1924; Gauthier and Dumais, 1938; Eames, 1942). Mūsų tyrimų rezultatai patvirtina šiuos rezultatus (Rimgailė-Voicik and Naujalis, 2015, 2016).

Lietuvoje, Varėnos rajone, buveinės su brandžiais *D. complanatum* pasižymi mažesne floristine įvairove nei vietos su *L. clavatum*. Juvenilinių pataisinių augaviečių augalija panašesnė į brandžių *D. complanatum* augaviečių. Juvenilinių pataisinių augavietės nepasižymėjo rūšių įvairove, neturėjo išreikšto krūmų ardo, o žolių ir krūmokšnių arde vyravo *Deschampsia flexuosa*. Ankstesni tyrimai (Strengbom et al., 2004; Ruotsalainen et al., 2007) parodė, kad sutrikdytuose miškuose sumažėjusi konkurencija dėl šviesos sukelia *D. flexuosa* sąžalynų plėtrą. Pastoviam Maskaukos tyrimų laukelyje nustatėme silpną teigiamą koreliaciją

tarp *D. flexuosa* ir *L. annotinum* dalyvavimo dydžio, kitų reikšmingų korelacių nepavyko nustatyti (Rimgailė-Voicik and Naujalis, 2016). Ódor (1996) teigė, kad *L. clavatum* ir *D. complanatum* gali lengvai egzistuoti kartu su *V. myrtillus*. Palyginus devynių tyrimo vietų augaliją, nustatėme silpną neigiamą korelacią tarp *L. annotinum* ir *V. myrtillus*, bet silpną teigiamą korelacią tarp *L. annotinum* ir *D. flexuosa* dalyvavimo dydžio (Rimgailė-Voicik and Naujalis, 2016). Tirtuose Varėnos r. sausuose pušynuose vykstančių bendrijų kaitos procesų metu *D. flexuosa* nukonkuruoja *V. myrtillus* ir *V. vitis-idaea* L., nors prieš 40 metų *D. flexuosa* Lietuvoje priskirta retoms rūšims (Natkevičaitė-Ivanauskienė, 1963).

Tikėtina, kad pataisinių, kaip ir paparčių (Miller, 1968; Windham et al., 1986) sporų bankams būdingas ilgaamžiškumas. Tarp juvenilinių pataisinių sporofitų Varėnos r. vyravo *L. annotinum* individai, o *Lycopodium* gametofitai sudarė daugiau nei 80 % visų rastų gametofitų (Rimgailė-Voicik et al., 2015). Toks santykis buvo nustatytas ir tyrimais, atliktais prie Glėbo ežero Varėnos r., 1986–1989 m. (Naujalis, 1995). Klasterinė analizė su Bray-Curtis indeksu sugrupavo visas devynias tyrimų vietas į dvi dideles grupes, atspindinčias pataisinių populiacijų brandą. Panašiausios buvo Maskaukos II ir Varėnės II, taip pat Maskaukos I ir Bingelių tyrimo vietos. Tai, kad tarp juvenilinių individų vyravo *L. annotinum*, o tarp sporifikuojančių – *L. clavatum*, gali reikšti, jog *L. clavatum* sporos nesudaro gyvybingų sporų bankų arba tai, kad susidariusiuose gametofituose dėl nežinomų priežasčių neįvyksta apvaisinimas. Duomenų apie pakitusią *L. clavatum* sporifikaciją neturime. Atavizmas, kai ūglio viršūnėje susidaro vegetatyvinės struktūros po generatyvinių struktūrų susidarymo, yra žinomas tik *L. annotinum* (Gola et al., 2015) ir šis reiškinys yra susijęs su *LAMBI* geno raiška sporogeniniame audinyje (Svensson et al., 2000).

Kai kuriose vietose su juvenilinėmis pataisinių populiacijomis pušų kamienai buvo apanglėję. Paviršiniai miškų gaisrai gali būti pagrindinis tinkamas buveinės juvenilinių pataisinių populiacijoms įsikurti formuojantis veiksnys. Anksčiau požeminiai gametofitai ir juveniliniai sporofitai buvo rasti greta kelių, takų, miško kvartalinių linijų, slidinėjimo trasų (Bruchmann, 1898; Degener, 1924; Stokey and Starr, 1924; Muller et al., 2003; Horn et al., 2013). Lietuvoje juvenilinės pataisinių populiacijos taip pat aptiktos labiau ar mažiau sutrikdytose miško vietose (Naujalis, 1995; Rimgailė-Voicik et al., 2015; Rimgailė-Voicik and Naujalis, 2016). Pasak Stokey ir Starr (1924), visos vietos, kuriose pavyko rasti juvenilines pataisinių populiacijas, gali būti apibūdintos kaip „skurdžios“ ir didesnė juvenilinių pataisinių populiacijų susidarymo tikimybė yra tada, kai 10–12 metų nebūna katastrofinių sausrų. Juvenilinių pataisinių populiacijų buveinių dirvožemių cheminės sudėties palyginimas su ilgalaikių dirvožemio tyrimų rezultatais (Beniušis, 2008; Armolaitis et al., 2011) leidžia teigti, kad tyrimų vietos niekada nebuvo naudojamos kaip dirbami laukai ir nebuvo tręšiamos. Eames (1942) pabrėžė, kad gausios juvenilinių pataisinių populiacijos buvo rastos 5–25 metų medynuose, susiformavusiuose po miško gaisro, kuris kilo iškirtus mišką.

Per septynerių metų stebėjimus (1985–1991) sausuose pušynuose buvo nustatyta, kad daugiau nei 50 % rastų *L. annotinum* juvenilinių sporofitų žuvo, metinis išgyvenusių sporofitų priaugis buvo 1–3 cm (Naujalis, 1995). Per ketverių metų tyrimus pastoviam Maskaukos laukelyje (Rimgailė-Voicik and Naujalis, 2016) nustatyta, kad pagrindinė juvenilinių pataisinių žūtis priežastis gali būti konkurencija su samanų sluoksniu.

Pagrindinė juvenilinių pataisinių funkcija – naujų augaviečių kolonizavimas. Ar klonai yra genetiškai unikalūs individai ar juos sudaro miškotvarkos ar kitų procesų metu suskaidyto to paties individo dalys nėra žinoma. ISSR polimorfizmo analizė parodė, kad tarpopuliacinė genetinė įvairovė yra gerokai didesnė nei populiacijų viduje. Tad vegetatyvinis dauginimasis yra labiau tikėtinas. PCoA analizė parodė, kad Maskaukos tyrimo vietos *L. annotinum* ir *L. clavatum* populiacijos ryškiausiai skyrėsi nuo likusių populiacijų, jos pasižymėjo ir didžiausiu unikalių lokusų skaičiumi. Tai galėjo nulemti vykstantis lytinis pataisų dauginimasis ir naujų klonų formavimasis iš unikalių, lytinio dauginimosi keliu susidariusių individų.

IŠVADOS

1. Devyniose tyrimo vietose sausuose Varėnos r. pušnyuose tarp juvenilinių pataisinių vyravo *Lycopodium annotinum*, o tarp sporifikuojančių pataisinių – *Lycopodium clavatum*.
2. Sausuose Pietryčių Lietuvos pušnyuose vyravo I tipo *Lycopodium clavatum* (pagal Bruchmann klasifikaciją) gametofitai. I tipo gametofitai (rasti 522 vnt.) išsivysto kur kas dažniau nei II tipo *Diphasiastrum complanatum* gametofitai (rasti 74 vnt.), kartais iš vieno gametofito išauga daugiau nei vienas sporofitas.
3. Tyrimas pastoviam Maskaukos laukelyje parodė, kad juvenilinių pataisinių populiacijų formavimasis yra ilgalaikis procesas, kurio metu vyksta nesinchronizuotas naujų lytinės kilmės sporofitų susidarymas iš požeminių gametofitų ir dalinė juvenilinių sporofitų eliminacija.
4. Tarp rastų pataisinių gametofitų ir juvenilinių sporofitų skaičiaus nustatyta vidutinė teigiama koreliacija ($r_{xy} = 0,57$; $p < 0,05$), patvirtinanti hipotezę, kad didžiausia tikimybė surasti požeminius gametofitus yra ten, kur pastebėti juveniliniai sporofitai.
5. Juveniliniai sporofitai yra linkę labiau telktis nei gametofitai. Juvenilinių pataisinių artimiausio kaimyno indeksas (NNI) buvo 0,44–0,55, vidutinis atstumas (r_A) tarp individų – 1,65–3,78 cm. Gametofitų grupavimasis nebuvo toks ryškus: NNI įvairavo nuo 0,51 iki 1,18.
6. Juvenilinėms pataisinių populiacijoms būdingas asinchroninis vystymasis, nes įvairavo dirvožemio mėginyje rastų gametofitų dydis, forma ir pasiskirstymas dirvožemio humuso sluoksnyje.
7. Maskaukos pastovaus tyrimų laukelio augalijos koreliacijos matrica parodė silpną teigiamą koreliaciją tarp *Deschampsia flexuosa* ir *L. annotinum* projekcinio padengimo ($r_{xy} = 0,22$; $p < 0,05$). Devynių tyrimo vietų augalijos analizės metu taip pat nustatyta silpna teigiama koreliacija tarp *D. flexuosa* ir *L. annotinum* ($r_{xy} = 0,39$; $p < 0,05$) ir silpna neigiama koreliacija tarp *D. flexuosa* ir *Vaccinium myrtillus* L. ($r_{xy} = -0,41$; $p < 0,05$), *L. annotinum* ir *V. myrtillus* ($r_{xy} = -0,37$; $p < 0,05$).
8. Varėnos r. pataisų populiacijoms buvo charakteringas žemas ISSR lokusų polimorfizmas: vidutinis polimorfizmas *L. clavatum* populiacijose buvo žemesnis (18.37 %) nei *L. annotinum* (22.97 %) populiacijose.
9. Tarp *L. clavatum* ir *L. annotinum* populiacijų nustatyta didelė molekulinė genetinė įvairovė (atitinkamai 78 % ir 69 %) rodo, kad genų srautas tarp populiacijų yra labai ribotas.

Summary

Archaic monophyletic Lycopodiaceae *s. lat.*, comprise approximately 400 living species (Øllgaard and Windisch, 2014; Christenhusz and Byng, 2016). In various temperate forests, homosporous herbaceous lycophytes have an opportunistic, guerrilla-type growth strategy (Harper, 1985) and their evergreen perennial vascular sporophytes form large clones. Club moss sporophytes originate from subterranean, achlorophyllous gametophytes (also called prothallia) that are associated with fungal endophytes (Read et al., 2000). Spores of club mosses only germinate in the dark (Whittier, 1977) and subterranean gametophytes of club mosses do not develop without a specific group of endophytic fungi (Rimington et al., 2014; Pressel et al., 2016). The development of gametophytes from spore germination to fertilization and new sporophyte formation can take five to six or more years (Bruchmann, 1910; Horn et al., 2013). Gametophyte and sporophyte generations are separated. Therefore, juvenile club moss populations are spatially isolated from old clones, have different abiotic and biotic habitat requirements, and emerge in sites with limited habitat disturbance (Bruchmann, 1898; Degener, 1924; Naujalis, 1995). The presence of fire adaptations is also expected (Eames, 1942; Oinonen, 1968).

The Main Objective: to study organization and functioning patterns of *Lycopodium* and *Diphasiastrum* populations with an emphasis on gametophytes and juvenile sporophytes of emerging in dry pine forests of southern Lithuania.

Objectives:

- To investigate spatial structure of club moss subterranean gametophyte and juvenile sporophyte populations
- To determine developmental stages and species composition of club moss gametophytes and evaluate subterranean gametophyte population composition
- To study the specificity of habitats required by juvenile club moss populations
- To study vegetation cover change in a habitat with juvenile club moss sporophytes
- To assess relationships of soil properties with juvenile sporophyte and subterranean gametophyte abundance
- To assess genetic structure of club moss populations

Habitat disturbance is thought to be an important determinant of juvenile club moss population occurrence, yet there have been few exploratory studies on juvenile club moss populations. No studies have investigated the relationships among subterranean gametophytes with or without incipient sporophytes and aboveground vegetation. Understanding how vegetation determines the development of a juvenile club moss population is crucial for establishing protection for these archaic plants.

This novel research presents the first spatial structure analysis of club moss subterranean gametophyte and juvenile sporophyte populations. Detailed juvenile

club moss population characteristics are presented. The results obtained provide the possibility to propose the predominant fertilization pathway. The relationships among juvenile club moss populations, soil parameters and vegetation cover are addressed and primary data on population genetic structure are presented. Additionally, this research presents the first instance of *Diphasiastrum* gametophytes in Lithuania.

During our research, juvenile club moss sporophytes were discovered in 21 localities. The dry pine forests with juvenile club moss populations in the Varėna District of Lithuania were not species rich and had no shrub layer. In sites with juvenile club mosses grass *Deschampsia flexuosa* dominated and no adult club moss clones were present in close proximity. The Renyi diversity index (Lövei et al., 2013) indicated that forest sites were slightly stressed and disturbed. We propose that all of the above listed characteristics made the researched forests suitable to support juvenile club moss populations.

The highest rate of total club moss occurrence was recorded in Varėnė II (133 points of 510 assessed, 26.07%). The lowest rate of total club moss occurrence was recorded in Bingėliai (two points, 0.39%). When the occurrence rates of sporulating club mosses were compared, we noticed that in zero out of nine sites all three species were sporulating together. Adult club mosses of the three species were detected growing together in one site (Puvočiai). In all sites juvenile *L. annotinum* was the most prevalent.

In total, 595 club moss gametophytes were found in 31 soil samples. The distribution of gametophytes in soil samples and the ratio of aboveground and belowground structures were uneven. The largest number of gametophytes found in one soil sample was 133 (Varėnė I) and the lowest was two (Žilinėliai). The Pearson correlation coefficient showed moderate positive association between the number of gametophytes and sporophytes ($r_{xy} = 0.57$; $p < 0.05$). We split the diversity of Type I gametophytes into four groups (globular, disk shape, irregular bowl shape and irregular bowl shape with sprout). Type II gametophytes were categorized into two groups (carrot shape and carrot shape with sprout). These groups represent different developmental stages of gametophytes.

Higher order nearest neighbor analysis of Maskauka, Varėnė and Bingėliai samples showed that gametophytes and juvenile sporophytes tend to cluster and their distribution in the soil is not absolutely random. Juvenile sporophytes tend to cluster more. All gametophytes found were located in the humus layer from 0.1–2 cm in depth. No correlation was found between the length of gametophytes and the depth in which they were found ($r_{xy} = 0.11322$, $p = 0.06$).

We determined the main soil components that might influence club moss population development. Adonis function in R revealed that only the amount of mineral nitrogen differed significantly among sites ($R^2 = 0.135$, $p < 0.05$). Sites with abundant juvenile club moss populations were extremely acidic and outstanced as poor, with low level of humus and nutrients.

We used species cover data to test for a correlation among different species. A weak positive correlation was found between *Deschampsia flexuosa* and *L. annotinum* ($r_{xy} = 0.39$; $p < 0.05$). *Deschampsia flexuosa* and *Vaccinium myrtillus* L. ($r_{xy} = -0.41$; $p < 0.05$), *L. annotinum* and *V. myrtillus* ($r_{xy} = -0.37$; $p < 0.05$) and *D. flexuosa* and *Dicranum polysetum* ($r_{xy} = -0.45$; $p < 0.05$) had moderately negative Pearson correlations.

Statistical analysis revealed that subplots in permanent Maskauka plot not shaded by the tree canopy were more stable in regards to species diversity and abundance, and did not change significantly during the research period. Juvenile lycopods were identified in subplots that were not shaded. The subplots with and without tree canopy shading differed significantly from 2012 to 2014 (permutational MANOVA on Bray-Curtis distances; $R^2 = 0.05$; $p < 0.01$), but not in 2015. Species composition in the permanent Maskauka site did not change over our four-year study, but reappearing tree seedlings showed the presence of open microniches. The correlation matrix showed a weak, but positive correlation between *D. flexuosa* and *L. annotinum* cover ($r_{xy} = 0.22$; $p < 0.05$) using average cover from permanent Maskauka plot over four years in the calculation. No significant correlation was detected between *L. annotinum* and any other species. Cousens et al. (1985) suggested that sites for gametophyte development were rare and lead to many different species spores clustering in a small territory. This hypothesis is supported by the present study, as we found diverse developmental stages of gametophytes of different species in close proximity to each other.

During the genetic analysis, 103 individuals from ten Varėna District populations were examined: 50 *L. annotinum* and 53 *L. clavatum* individuals. The UPGMA method revealed that all populations analysed fell into two large groups that represent species *L. clavatum* and *L. annotinum*. All plants were more similar within the populations. Analysis of molecular variance (AMOVA), calculated based on a genetic distance matrix showed that among *L. annotinum* populations the total molecular variance was 69% while within populations the variance was 31%. Total molecular variance among *L. clavatum* was higher (78%) while the variance within the population was 22%.

All populations had low DNA polymorphisms. Average polymorphism was lower in *L. clavatum* (18.37%) populations than in *L. annotinum* (22.97%) populations. PCoA plots generated separately for *L. clavatum* and *L. annotinum* populations showed that *L. annotinum* Varėnė and Maskauka populations and *L. clavatum* Puvočiai and Maskauka were the most divergent. The highest polymorphism was measured within *L. annotinum* collected from the Maskauka population (35.14%).

CONCLUSIONS

1. Among the juvenile club moss sporophytes discovered, *Lycopodium annotinum* dominated while among sporulating club mosses, *Lycopodium clavatum* was the most common at nine research sites in dry pine forests of the Varèna District.
2. Among the gametophytes discovered, the genus *Lycopodium* dominated. Type I (*Lycopodium clavatum* type) gametophytes developed more often than Type II (*Diphasiastrum complanatum* type) in dry pine forests of the Varèna District. Five-hundred and twenty-two *Lycopodium* and 74 *Diphasiastrum* gametophytes were found; more than one sporophyte sprout was discovered emerging from a gametophyte.
3. Research conducted in the permanent Maskauka site showed that the development of the juvenile club moss populations is a long-term process, during which the unsynchronized occurrence of juvenile sporophytes from subterranean gametophytes takes place and partial elimination of juvenile sporophytes occurs.
4. There was a moderately positive correlation ($r_{xy} = 0.57$; $p < 0.05$) between the number of club moss gametophytes and juvenile sporophytes present in the soil sample, supporting the hypothesis that the best place to look for gametophytes is where juvenile sporophytes are present.
5. Juvenile sporophytes tend to cluster more than the gametophytes. The Nearest Neighbor Index (NNI) for juvenile sporophytes varied from 0.44–0.55 with an average distance (r_A) between sproutlings of 1.65–3.78 cm. Clasterization of gametophytes was not that apparent; the NNI for gametophytes varied from 0.51–1.18.
6. Asynchronous development was discovered within juvenile club moss populations. Gametophytes varied in size and shape, and were distributed only in the soil humus layer.
7. In the permanent Maskauka research site, the correlation matrix showed a weak, but positive significant correlation between *Deschampsia flexuosa* and *L. annotinum* cover ($r_{xy} = 0.22$; $p < 0.05$). However, when comparing the nine research sites, a weak positive correlation was found between *D. flexuosa* and *L. annotinum* ($r_{xy} = 0.39$; $p < 0.05$) and a weak negative correlation was determined between *D. flexuosa* and *Vaccinium myrtillus* L. ($r_{xy} = -0.41$; $p < 0.05$), *L. annotinum* and *V. myrtillus* ($r_{xy} = -0.37$; $p < 0.05$).
8. Club moss populations in Varèna District were characterised by low ISSR polymorphism: average percentage of polymorphic loci in *L. clavatum* populations was lower than in *L. annotinum* populations (18.37 % and 22.97 %, respectively).
9. *L. clavatum* and *L. annotinum* populations were highly differentiated (78% and 69% respectively), which imply that gene flow among populations is very limited.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Armolaitis, K., Žėkaitė, V., Aleinikovienė, J., Česnulevičienė, R. 2011. Renaturalization of Arenosols in the land afforested with Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and abandoned arable land. *Žemdirbystė* **98**:275–282.
2. Anonimas, 2015. Nacionalinis Lietuvos Respublikos atlasas. Klimatinis rajonavimas © Nacionalinė žemės tarnyba ir Vilniaus universitetas: www.geoportal.lt
3. Balevičienė, J., Vaičys, M. 2001. Augmenija [Vegetation]. Pp. 157-164, in: Buivydaitė V. V. et al. (eds.), Lietuvos dirvožemiai [Soil of Lithuania]. Lietuvos mokslas 32, Vilnius.
4. Beniušis, R. 2008. Lietuvos smėlžemių genezė ir savybės: daktaro disertacija, Akademija, Kaunas.
5. Bierhorst, D.W. 1971. Morphology of vascular plants. The MacMillan Company, New York.
6. Bosiacka, B., Pacewicz, K., Pieńkowski, P. 2008. Spatial analysis of plant species distribution among small water bodies in an agricultural landscape. *Acta Agrobot.* **2**:93–101.
7. Bower, F.O. 1894. Studies in the Morphology of spore producing members. Part 1: Equisetineae and Lycopodineae. *Phil. Trans. R. Soc. B* **185B**:473–572.
8. Bruchmann, H. 1898. Über die Prothallien und die Keimpflanzen mehrerer europäischer Lycopodien, und zwar über die von *Lycopodium clavatum*, *L. annotinum*, *L. complanatum* und *L. selago*. Perthes, Gotha.
9. Bruchmann, H. 1910. Die Keimung der sporen und die entwicklung der prothallien von *Lycopodium clavatum* L., *L. annotinum* L. und *L. selago* L. *Flora* **1**:220–267.
10. Bruce, J.G. 1979a. Gametophyte and young sporophyte of *Lycopodium carolinianum*. *Am. J. Bot.* **66**(10):1156–1163.
11. Bruce, J.G. 1979b. Gametophyte and young sporophyte of *Lycopodium digitatum*. *Am. J. Bot.* **66**(10):1138–1150.
12. Bruce, J.G., Beitel, J.M. 1979. A community of *Lycopodium* gametophytes in Michigan. *Am. Fern J.* **69**(2):33–41.
13. Charnov, E.L. 1982. The Theory of Sex Allocation. Princeton University Press, Princeton.
14. Christenhusz, M.J.M., Byng, J.W. 2016. The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotax.* **261**(3):201–217. Doi: 10.11646/phytotaxa.261.3.1
15. Cousens, M.I., Lacey, D.G. Kelly, E.M. 1985. Life-history studies of ferns – a consideration of perspective. *Proc. R. Soc. of Edinb. B* **86**:371–380.
16. Degener, O. 1924. Four new stations of *Lycopodium* prothallia. *Bot. Gaz.* **77**:89–95.
17. Doyle, J.J., Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**(1):13–15.

18. Eames, A.J. 1942. Illustrations of some *Lycopodium* gametophytes. *Am. Fern J.* **32**:1–12.
19. Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondria DNA restriction sites. *Genetics* **131**:479–491.
20. Fankhauser, J. 1873. Über den Vorkeim von *Lycopodium*. *Bot. Zeit.* **31**:1–6.
21. Gauthier, R. and Dumais, R. 1938. Les prothalles de lycopes dans le Quebec. *Contrib. Inst. Bot. Montréal.* **32**:7–11.
22. Ghilarov, M.S., Striganova B.R. 1987. *Kolichestvenije metodi v pochvennoj zoologii.* Moscow, Nauka Publishing House.
23. Gola, E.M., Dolzblasz, A., Otręba, P., Śliwińska-Wyrzychowska, A. 2015. Development of abnormal strobili in *Lycopodium annotinum* as an example of the reversio phenomenon in lower vascular plants. *Botany* **93**(10): 701–707. Doi: 10.1139/cjb-2015-0051.
24. Gudžinskas Z., 1999. *Lietuvos induočiai augalai.* Vilnius.
25. Harper, J.L. 1985. Modules, branches and the capture of the resources. Pp. 1–34, *in*: Jackson J. B. C., Buss L. W., Cook R. E (eds.). *Population Biology and Evolution of Clonal Organisms.* Yale University Press.
26. Hill, M.O. 1973. Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences. *Ecology* **54**:427–432.
27. Horn, K., Franke, T., Unterseher, M., Schnittler, M., Beenken, L. 2013. Morphological and molecular analyses of fungal endophytes of achlorophyllous gametophytes of *Diphasiastrum alpinum* (Lycopodiaceae). *Am. J. Bot.* **11**:2158–2174. doi: 10.3732/ajb.1300011.
28. Johnson-Groh, C.L., Riedel C., Schoessler, L. Skogen, K. 2002. Belowground distribution and abundance of *Botrychium* gametophytes and juvenile sporophytes. *Am. Fern J.* **92**:80–92.
29. Korchagin, A.A. 1964. [Plant Species Composition and Methods of the Study]. Pp. 39–62, *in*: Lavrenko, E.M., Korchagin, A.A. (eds.). [Field Geobotany 3], Nauka Publishing House (in Russian).
30. Lang, W.H. 1899. The prothallus of *Lycopodium clavatum* L. *Ann. Bot.* **13**:279–317.
31. Lawrence, M.A. 2011. ez: Easy analysis and visualization of factorial experiments. R package version 3.0-0. <http://CRAN.R-project.org/package=ez>
32. Levine, N. 2010. *CrimeStat*: a spatial statistics program for the analysis of crime incident locations (v 3.3), Ned Levine & Associates, Houston.
33. Lövei, G. L., W. X. Liu, J. Y. Guo and F. H. Wan. 2013. The use of the Rényi scalable diversity index to assess diversity trends in comparative and monitoring studies of effects of transgenic crops. *J. Biosaf.* **22**:43–50.
34. Matuszkiewicz, W. 2001. *Przewodnik do oznaczania zbiorowisk roślinnych Polski* [Guide for the determination of Polish plant communities]. Warszawa, PWN.

35. Miller, J. H. 1968. Fern gametophytes as experimental material. *Bot. Rev.* **34**:361–440.
36. Muller, S., Jerome, C., and Horn, K. 2003. Importance of secondary habitats and need for ecological management for the conservation of *Diphasiastrum tristachyum* (Lycopodiaceae, Pteridophyta) in the Vosges Mountains (France). *Biodivers. Conserv.* **12**:321–332. doi: 10.1023/A:1022419030577.
37. Natkevičaitė-Ivanauskienė, M. 1963. Gramineae šeima. Pp. 114–298, in Minkevičius A. et al. (eds.). Lietuvos TSR flora II [Flora of Lithuanian SSR II]. Vilnius.
38. Naujalis, J. 1995. Sporiniai induočiai kaip augalų bendrijų komponentai. Vilnius.
39. Oinonen, E. 1968. The size of *Lycopodium clavatum* L. and *L. annotinum* L. stands as compared to that of *L. complanatum* L. and *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn stands, the age of tree stand and the dates of fire, on the site. *Acta For. Fenn.* **87**:5–53.
40. Ódor, P. 1996. A coenological study of club moss populations in Western Hungary. *Abstr. Bot.* **20**:47–54.
41. Oksanen J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens M.H.H., Wagner, H. 2016. *Vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.3-5. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
42. Øllgaard, B. 2012. New combinations in Neotropical Lycopodiaceae. *Phytotax.* **57**:10–22. doi: 10.11646/phytotaxa.57.1.3.
43. Øllgaard, B., Windisch, P.G. 2014. Lycopodiaceae in Brazil. Conspectus of the family I. The genera *Lycopodium*, *Austrolycopodium*, *Diphasium* and *Diphasiastrum*. *Rodriguésia*, **2**:293–309. doi: 10.1590/S2175-78602014000200002.
44. Patamsytė, J., Čėsniienė T. Naugžemys, D., Kleizaitė, V., Vaitkūnienė, V., Rančelis, V., Žvingila, D. 2011. Genetic diversity of warty cabbage (*Bunias orientalis* L.) revealed by RAPD and ISSR markers. *Zemdirbyste* **98**(3):293–300.
45. Peakall R., Smouse P., 2006. GenALEX v.6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics* **78**:265–285. Doi: 10.1093/bioinformatics/bts460
46. PPG I. 2016. A community-derived classification for extant lycopods and ferns. *J. Syst. Evol.* **54**:563–603. doi: 10.1111/jse.12229
47. Pressel, S., Bidartondo, M.I., Field, K.J., Rimington, W.R., Duckett, J.G. 2016. Pteridophyte fungal associations: Current knowledge and future perspectives. *J. Syst. Evol.* **54**:666–678. doi: 10.1111/jse.12227.
48. Primack, R.B. 1973. Growth patterns of five species of *Lycopodium*. *Am. Fern J.* **63**:3–7.

49. Read, D.J., Duckett, J.G., Francis R., Ligrone R., Russell, A. 2000. Symbiotic fungal associations in 'lower' land plants. *Philos. Trans. R. Soc. B.* **355**:815–831.
50. Renzaglia, K.S., Whittier, D.P. 2013. Microanatomy of the placenta of *Lycopodium obscurum*: novel design in an underground embryo. *Ann. Bot.* **6**: 1083–1088. doi: 10.1093/aob/mct178.
51. Rényi, A. 1961. On measures of information and entropy. Proceedings of the 4th Berkeley Symposium on Mathematics, Statistics and Probability **1960**:547–561.
52. Rimgailė-Voicik, R., Naujalis, J.R., Voicikas, A. 2015. Organization of club moss gametophytes and juvenile sporophyte populations in pine forests. *Pol. J. Ecol.* **66**:311–324. doi: 10.3161/15052249PJE2015.63.4.001.
53. Rimgailė-Voicik, R., Naujalis, J.R. 2015. Reporting on first genus *Diphasiastrum* subterranean gametophyte findings in Lithuania. *Bot. Lith.* **21**:133–135. doi: 10.1515/botlit-2015-0016.
54. Rimgailė-Voicik R., Naujalis J. R. 2016. Presence of juvenile club moss (*Lycopodiaceae*) sporophytes and gametophytes in relation to vegetation cover in dry pine forests. *Am. Fern J.* **106**(4): (*in press*).
55. Rimington, W.R., Pressel, S., Duckett, J.G., Bidartondo, M.I. 2014. Fungal diversity in early vascular plants: Reopening a closed book? *New Phytol.* **205**:1394–1398. doi: 10.1111/nph.13221
56. Rydgren K., Hestmark, G. 1997. The soil propagule bank in a boreal old-growth spruce forest: changes with depth and relationship to aboveground vegetation. *Can. J. Bot.* **75**:121–128.
57. Ryman, N., Leimar, O. 2009. GST is still a useful measure of genetic differentiation – a comment on Jost's D. *Mol. Ecol.* **18**:2084–2087.
58. Rothmaler, W. 1944. Pteridophyten–Studien I. Feddes Repert. **54**:55–82.
59. Ruotsalainen, A., Markkola, L.A., Kozlov, M.V. 2007. Root fungal colonization in *Deschampsia flexuosa*: effects of pollution and neighboring trees. *Environ. Pollut.* **147**:723–728.
60. Spessard, E.A. 1922. Prothallia of *Lycopodium* in America II. *L. lucidulum* and *L. obscurum* var. *dendroideum*. *Bot. Gaz.* **74**(4):392–413.
61. Stark, J.M. 1994. Causes of soil nutrient heterogeneity at different scales. Pp. 255–284. *in*: Caldwell, M.M., Percy, R.W. *Exploitation of Environmental Heterogeneity by Plants*, Academic, San Diego.
62. Stokay, A.G., Starr, A.M. 1924. *Lycopodium* prothallia in Western Massachusetts. *Bot. Gaz.* **77**(1):80–88.
63. Strengbom, J., Näsholm, T., Ericson, L. 2004. Light, not nitrogen, limits growth of the grass *Descampsia flexuosa* in boreal forests. *Can. J. Bot.*, **82**:430–435.
64. Svensson, M.E., Johannesson, H., Engström, P. 2000. The *LAMB1* gene from the club moss, *Lycopodium annotinum*, is a divergent *MADS-box* gene,

- expressed specifically in sporogenic structures. *Gene* **253**:31–43. Doi: 10.1046/j.1469-8137.2002.00392.x.
65. Van de Peer, Y., De Wachter, R. 1994. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Applic. Biosci.*, **10**:569–570.
 66. Wagner, W.H., Beitel, J.M. 1992. Generic classification of modern North American Lycopodiaceae. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **79**:676–686.
 67. Webster, C.R., Jenkins, M.A. 2008. Age structure and spatial patterning of *Trillium* populations in old-growth forests. *Plant Ecol.* **199**:43–54.
 68. Windham, M.D., Haufler, C.H. 1986. Biosystematic uses of fern gametophytes derived from herbarium specimens. *Am. Fern. J.* **76**:114–128.
 69. Wittig, R., Jungman, R., Ballach, H.J. 2007. The extent of clonality in large stands of *Lycopodium annotinum* L. *Flora* **202**:98–105.
 70. Whittier, D.P. 1977. Gametophytes of *Lycopodium obscurum* as grown in axenic culture. *Can. J. Bot.* **55**(5):563–567.
 71. Whittier, D.P. 1998. Germination of Spores of the Lycopodiaceae in Axenic Culture. *Am. Fern J.* **88**(3):106–113.
 72. Whittier, D.P., Pintaud, J.C., Braggins, J.E. 2005. The Gametophyte of *Lycopodium deuterodensum*: Type II or I. *Am. Fern J.* **95**(1):22–29. doi: 10.1640/0002-8444(2005)095[0022:TGOLDT]2.0.CO;2.
 73. Wikström, N., Kenrick, P. 1997. Phylogeny of Lycopodiaceae (Lycopsidea) and the relationships of *Phylloglossum drummondii* Kunze based on *rbcL* sequences. *J. Plant Sci.* **158**(6):862–871.
 74. Wikström, N., Kenrick, P. 2000. Relationships of *Lycopodium* and *Lycopodiella* based on combined Plastid *rbcL* gene and *trnL* intron sequence data. *Syst. Bot.* **25**:495–510.
 75. Thomas, D.W. 1975. Wild gametophytes of *Diphasiastrum alpinum* (L.) Rothm. in North Wales. *Watsonia* **3**:277–279.
 76. Treub, M. 1884. Études sur les Lycopodiacées. I. Le prothalle du *Lycopodium cernuum* L. *Ann. Jard. Bot. Buitenzorg* **7**:107–138.
 77. Tupčiauskaitė, J. 2007a. Patvankinis pataisiukas. *Lycopodiella inundata* (L.) Holub. P. 384, in: V. Rašomavičius (red.). Lietuvos raudonoji knyga, Kaunas.
 78. Tupčiauskaitė, J. 2007b. Statusis atgiris. *Huperzia selago* (L.) Bernh. ex Schrank et Mart. P. 385, in: V. Rašomavičius (red.). Lietuvos raudonoji knyga, Kaunas.
 79. Tupčiauskaitė, J., Žemgulytė, T. 2012. Preliminary Data on distribution and identification of *Diphasiastrum* × *zeilleri* (Rouy) Holub in Lithuania. *Bot. Lith.* **18**:147–153.

MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS

Publikacijos disertacijos tema

Straipsniai žurnaluose, referuojamuose ISI Web of Science (WoS):

Rimgailė-Voicik, R., Naujalis, J. R., Voicikas, A. 2015. Organization of club moss gametophytes and juvenile sporophyte populations in pine forests. *Pol. J. Ecol.* 66:311–324.

Rimgailė-Voicik, R., Naujalis, J. R. 2016. Presence of juvenile club moss (*Lycopodiaceae*) sporophytes and gametophytes in relation to vegetation cover in dry pine forests. *Am. Fern J.* 106(4): 242–257.

Straipsniai žurnaluose, referuojamuose ISI Master List:

Rimgailė-Voicik, R., Naujalis, J. R. 2015. Reporting on first genus *Diphasiastrum* subterranean gametophyte findings in Lithuania. *Bot. Lith.* 21:133–135.

Moksliniai straipsniai kituose recenzuojamuose leidiniuose:

Rimgailė-Voicik, R., 2015: Localized events of juvenile club moss populations occurrence: a field study. *IDK 2015 conference book*, p. 535–544.

Konferencijų tezės:

Rimgailė-Voicik R. 2016: Initial club moss populations: locating and evaluating – *Current Issues of Plant Conservation*, 16 p., Kaunas.

Rimgailė-Voicik R., Naujalis J. R. 2015: Initial application of morphological features in club moss (*Lycopodiaceae*) population studies. – *The 8th Baltic Morphology scientific conference: Interdisciplinary Nature of Contemporary Morphology*: 61 p., Vilnius.

Rimgailė-Voicik R. 2015: Juvenile populations of club mosses: alternative research component for evaluating club moss population vitality. – In: *Proceedings of III(XI) International Botanical Conference of Young Scientists in Saint-Petersburg*, 133 p., St. Petersburg, Russia.

Rimgailė-Voicik R. 2015: Juvenile populations of club mosses: alternative research component for evaluating club moss population vitality. – *V Всероссийская геоботаническая школа-конференция с международным участием тезисы конференции*, 12 p., St. Petersburg, Russia.

Rimgailė-Voicik R. 2015: Juvenile populations of club mosses: occurrence and diversity. – *International Doctoral Conference abstract book*: 32–33 pp. Pecs, Hungary.

Rimgailaitė R., Naujalis J. R. 2014: Pataisinių gametofitai Pietryčių Lietuvos pušnyuose. – *Mokslas Gamtos mokslų universitete* 2014(8): p. 179–180.

Rimgailaitė R. 2014: Gametophytes of Club Mosses in Pine Forests of Southeastern Lithuania. – International Conference The Coins abstract book: 61–62 pp.

Dalyvavimas nacionalinėse ir tarptautinėse konferencijose:

Current Issues of Plant Conservation, August 16-18th, 2016, Kaunas.

The 8th Baltic Morphology scientific conference: November 12-14th, 2015, Vilnius.

III (XI) International 8 Botanical Conference of Young Scientists and V Russian Geobotanical School-Conference: October 9-14th, 2015, Saint Petersburg, Russia.

International Doctoral Conference: May 14-15th, 2015, Pecs, Hungary.

Mokslas Gamtos mokslų universitete: October 3rd, 2014, Vilnius.

International Conference The Coins: March 7th, 2014, Vilnius.

Kiti moksliniai darbai, nesusiję su disertacijos tema

Straipsniai žurnaluose, referuojamuose ISI Web of Science (WoS):

Naujalis J. R., **Rimgailė-Voicik R.**, 2016. Plant community associations and complexes of associations in the Lithuanian seashore: retrospective on the studies and tragic fate of the botanist Dr Abromas Kisinas (1899–1945). *Israel Journal of Plant Sciences* 63(3):167–175. doi.org/10.1080/07929978.2016.1154320.

Kiti moksliniai straipsniai:

Meldžiukienė, A., **Rimgailė-Voicik, R.**, Rasimavičius, M. 2015. Botanikos rinkiniai Vilniaus senienų muziejuje. P. 411–423. *In: Kova dėl istorijos: Vilniaus senienų muziejus (1855–1915) straipsnių rinkinys. Lietuvos nacionalinis muziejus, Vilnius.*

Konferencijų tezės:

Rimgailė-Voicik R., Tupčiauskaitė J., Rasimavičius M., Meldžiukienė A., 2016: Vilnius University Herbarium as a Data Source for Endangered Species Research. *In: Current Issues of Plant Conservation book of abstracts: 17 p.*

Rimgailė-Voicik R., Rasimavičius, M., Meldžiukienė, A., 2016: Herbarium of Vilnius University – Fundamental Platform for Scientific Research. *In: Vita Scientia conference book: 46–47 pp.*

Meldžiukienė A., **Rimgailė-Voicik R.**, Rasimavičius M. 2015: Botanikos rinkiniai Vilniaus senienų muziejuje. *Kova dėl istorijos: Vilniaus senienų muziejus (1855–1915) programa ir pranešimų tezės: p. 99–102.*

Mokslo populiarinimas

Publikacijos:

Rimgailė-Voicik, R., Juzėnas, S. 2016. Ką žinome apie archajiškiausius miškų augalus? Mūsų girios, 12:24–25.

Rimgailė-Voicik R. 2015. Sausi lapai! O kiek juose ne vien minties, bet ir širdies virpesių... Beigelių krautuvėlė, 1:10–12 (lietuvių, rusų ir anglų k.).

Žodiniai pranešimai:

2015 09 06: „Europos žydų kultūros diena“, ekskursija VU herbariume: „Panerių kalvų pasakojimai: prof. Jokūbas Movšovičius ir Lietuvos floros tyrimai tarpukaryje“.

2014 09 18: „Erdvėlaivis žemė“: praktinis seminaras „Žiedų dulkės“.

2013 12 10: VU herbariumo istorinių kolekcijų pristatymas Europos vaistų agentūros Augalinių vaistinių preparatų komiteto nariams (anglų k.).

Padėkos

Tyrimai atlikti Botanikos ir genetikos katedroje, Gamtos mokslų fakultete. Esu dėkinga moksliniam vadovui prof. habil. dr. Jonui Remigijui Naujaliui už tyrimų idėją, patarimus ir pagalbą. Dėkoju moksliniam konsultantui prof. dr. Donatui Žvingilai, dr. Jolantai Patamsytei, dr. Virginijai Tunaitienei ir visai augalų genetikos mokslinei grupei, kurie nestokojo pagalbos ir patarimų atliekant pataisinių genetinius tyrimus laboratorijoje. Ačiū dr. Jūratei Tupčiauskaitei, kuri padėjo išversti Bruchmann ir Fankhauser darbus. Už vertingus komentarus rengiant straipsnius dėkoju dr. Elizabeth Georgian.

Už galimybę eksperimentuoti ruošiant pastovius gametofitų preparatus įliejant į parafiną ar epoksidinę dervą esu dėkinga Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Anatomijos instituto prof. dr. Neringai Paužienei. Už galimybę eksperimentuoti išskiriant alkaloidus iš pataisinių vegetatyvinių dalių dėkoju Vytauto Didžiojo universiteto Gamtos mokslų fakulteto prof. habil. dr. Audriui Maruškai. Už šiltą bendravimą, patarimus ir pagalbą, atsivėrusias bendradarbiavimo galimybes dėkoju Greifsvaldo universiteto Botanikos ir kraštovaizdžio ekologijos instituto vadovui prof. dr. Martin Schnittler ir Karsten Horn. Taip pat dėkoju dr. Mindaugui Lapelei už pagalbą organizuojant mokslinę ekspediciją Čepkelių rezervate. Dėkoju recenzentėms ir visiems kolegoms, kurie nepagailėjo savo laiko, perskaitė mano darbą ir išsakė pastabų, kurios padėjo man tobulėti.

Esu be galo dėkinga artimiesiems, kurie kartu su manimi nuėjo šį sunkų ketverių metų kelią. Mano pergalės be Jūsų palaikymo būtų neįmanomos.

Tyrimai iš dalies finansuoti Lietuvos mokslo tarybos nacionalinės mokslo programos „Agro, miško ir vandens ekosistemų tvarumas“, Nr. SIT-1/2015.

CURRICULUM VITAE

Vardas, pavardė	Radvilė Rimgailė-Voicik
Gimimo data ir vieta	1987 11 13, Vilnius
Darbovietės adresas	Biomokslų institutas, Gyvybės mokslų centras, Vilniaus universitetas, Saulėtekio al. 7, Vilnius, Lietuva, LT-10224, el. p. radvile.rimgailaite@gmail.com
Išsilavinimas	2006 m. baigė Vilniaus Radvilų gimnaziją (su pagyrimu) 2010 m. įgijo biologijos bakalauro laipsnį Vilniaus universitete 2012 m. įgijo botanikos magistro laipsnį Vilniaus universitete (<i>cum laude</i>) 2012–2016 m. studijavo biologijos krypties doktorantūroje Botanikos ir genetikos katedroje, Gamtos mokslų fakultete (GMF), Vilniaus universitete
Darbo patirtis	2012–2016 m. dirbo vyresniąja specialiste VU GMF Botanikos ir genetikos katedroje, herbariume Nuo 2016 m. spalio – jaunesnioji mokslo darbuotoja
Dalyvavimas projektuose	2015–2018 m. LMT nacionalinės agro-, miško ir ekosistemų tvarumo programos projektas „Plynujų kirtimų poveikio miškų ekosistemų biologinės įvairovės dinamikai tyrimai“ (MEKODINA) – tyrėja specialistė, pagrindinė vykdytoja. 2015 m. „Mokslinių tyrimų ir išsklaidytos informacijos apie saugomas rūšis parengimas ir įvedimas į vieningą Saugomų rūšių informacinę sistemą (SRIS)“ EEE-LT03-AM-01-K-01-001, WI herbariumo duomenų teikėja. 2013 m. „EB svarbos natūralių buveinių inventorizavimas, palankios apsaugos būklės kriterijų nustatymas ir monitoringo sistemos sukūrimas“, lauko tyrėja. 2012 m. Creazone: Jaunųjų lyderių sprendimai, VP1-2.2-ŠMM-07-K-03-036 asmeninių ir socialinių verslumo įgūdžių lavinimas, projekto dalyvė.
Moksliniai interesai	Sporinių induočių filogenija, populiacijų struktūra, ekologija ir apsauga, pedobiologija, mokslo istorija.