

VILNIAUS UNIVERSITETAS

JURGITA
BUTKUVIENĖ

BATRACHIUM LIETUVOS UPĖSE:
MORFOLOGINĖ IR GENETINĖ
ĮVAIROVĖ BEI JĄ LEMIANTYS
VEIKSNIAI

Daktaro disertacija

Biomedicinos mokslai, Biologija (01B)

Vilnius, 2017

Disertacija rengta 2012 – 2016 metais Vilniaus universitete

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

Mokslinis konsultantas – dr. Donatas Naugžemys (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01B).

TURINYS

SANTRUMPOS.....	5
ĮVADAS	7
I. LITERATŪROS APŽVALGA	12
1.1. <i>Batrachium</i> gentis ir jos taksonomijos problemos	12
1.1.1. <i>Batrachium</i> rūšių įvairovė Lietuvoje.....	15
1.1.2. <i>Batrachium</i> rūšių morfologiniai požymiai, biologija ir paplitimas	16
1.1.3. Tekančio vandens augalų bendrijos su <i>Batrachium</i>	22
1.2. Molekulinių žymenų taikymas genetinės įvairovės įvertinimui	25
1.2.1. Genetinės įvairovės tyrimai ISSR metodu	25
1.2.2. Chloroplastų DNR specifinių regionų sekoskaita	28
1.2.3. Branduolio ribosominės DNR regionų sekoskaita	30
1.3. <i>Batrachium</i> genties augalų molekuliniai tyrimai.....	31
II. TYRIMŲ MEDŽIAGA IR METODAI	33
2.1. <i>Batrachium</i> augalinės medžiagos morfologiniams ir molekuliniams tyrimams surinkimas.....	33
2.2. Bendrijų su <i>Batrachium</i> rūšimis aprašymai.....	35
2.3. <i>Batrachium</i> genties individų morfologinių požymių tyrimas.....	36
2.4. Fizikiniai ir cheminiai upių vandens parametrai.....	38
2.5. Vandens transporto įtakos <i>Batrachium</i> augalams tyrimas.....	38
2.6. DNR išskyrimas modifikuotu CTAB metodu.....	39
2.7. DNR koncentracijos ir kokybės nustatymas	40
2.8. PGR vykdymas	41
2.8.1. ISSR-PGR vykdymas	41
2.8.2. Chloroplastų DNR <i>trnH-psbA</i> ir branduolio ribosominės DNR <i>ITS</i> regionų sekų pagausinimas	42
2.9. ISSR-PGR produktų frakcionavimas agarozės gelyje	43
2.10. Pagausintų cpDNR ir rDNR sekų klonavimas.....	44
2.11. <i>Escherichia coli</i> transformacija ir transformantų analizė	44
2.12. Klonuotų DNR fragmentų sekoskaita	45
2.13. Statistinė duomenų analizė.....	46
III. REZULTATAI.....	48

3.1. Vilniaus universiteto ir Gamtos tyrimo centro Botanikos instituto herbariumų <i>Batrachium</i> pavyzdžių peržiūra	48
3.2. <i>Batrachium</i> surinktų pavyzdžių morfologiniai tyrimai.....	49
3.3. Bendrijų su <i>Batrachium</i> rūšimis tyrimai.....	52
3.4. Vandens turizmo poveikis <i>Batrachium</i> genties augalams ir jų bendrijoms	59
3.5. <i>Batrachium</i> augalų tyrimai naudojant DNR žymenų metodus	61
3.5.1. <i>Batrachium</i> populiacijų genetinės sandaros tyrimai naudojant ISSR metodą.....	62
3.5.2. I grupės (<i>Batrachium fluitans</i>) ir II grupės (<i>Batrachium penicillatum</i> s.l. ir <i>B. trichophyllum</i>) augalų genetinės ir genotipinės įvairovės palyginimas.....	68
3.5.3. Chloroplastų ir branduolio DNR specifinių sekų tyrimas sekoskaitos metodu.....	69
3.5.4. <i>Batrachium</i> augalų chloroplastų bei branduolio DNR specifinių regionų originalių sekų ir NCBI, GenBank® registruotų <i>Batrachium</i> taksonų sekų palyginimas.....	72
IV. REZULTATŲ APTARIMAS	77
4.1. Morfologinių požymių svarba <i>Batrachium</i> taksonomijai	77
4.2. <i>Batrachium</i> genetinė įvairovė ir skirtingų rūšių identifikavimas	80
4.3. Bendrijų su <i>Batrachium</i> rūšimis floristinė sandara, aplinkos sąlygos ir antropogeninio poveikio joms įtaka	86
IŠVADOS	92
MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS	94
PADĖKA	96
LITERATŪROS SĄRAŠAS	97

SANTRUMPOS

AFLP – pagausintų fragmentų ilgio polimorfizmas (angl. *Amplified Fragments Length Polymorphism*)

AMOVA – genetinės įvairovės molekulinės variacijos analizė (angl. *Analysis of MOlecular VAriance*)

BLAST – pagrindinis vietinis išlyginamosios paieškos įrankis, naudojamas nukleotidų sekų palyginimui su NCBI duomenų bazėje registruotomis sekomis (angl. *Basic Local Alignment Search Tool*)

bp – bazių pora

Ch. – charakteringos rūšys

cpDNR – chloroplastų DNR

CTAB – cetiltrimetilamonio bromidas

IPTG – izopropil-β-D-tiogalaktopiranozidas

EDTA – etilendiaminotetraacto rūgštis

ISSR – paprastų pasikartojančių sekų intarpai (angl. *Inter-Simples Sequence Repeats*)

ITS – vidinis transkribuotas tarpiklis (angl. *Internal Transcribed Spacer*)

MANOVA – daugiamatė dispersinė analizė (angl. *Multivariate Analysis of Variance*)

NCBI – nacionalinis biotechnologijos informacijos centras (angl. *National Center for Biotechnology Information*)

NMDS – nemetrinis daugiamatis mastelio nustatymas (angl. *Non-Metric Multidimensional Scaling*)

ML – didžiausio tikėtinumo algoritmas (angl. *Maximum Likelihood*)

nt – nukleotidai / nukleotidas

PGR – polimerazinė grandininė reakcija (angl. *PCR, Polymerase Chain Reaction*)

RAPD – atsitiktinai pagausinta polimorfinė DNR (angl. *Random Amplified Polymorphic DNA*)

rDNR – ribosominės RNR genų lokusas

s.l. – plačiąja prasme (lot. *Sensu lato*)

SSR – paprastosios pasikartojančios sekos (angl. *Simple Sequence Repeats*)

s.str. – siaurąja prasme (lot. *Sensu stricto*)

VNP – vieno nukleotido polimorfizmas (angl. *SNP, Single Nucleotide Polymorphism*)

X-Gal – 5-bromo-4-chloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozidas

ĮVADAS

Kurklė (*Batrachium*, Ranunculaceae Juss.) taksonominiu požiūriu yra viena iš sudėtingiausių žiedinių vandens augalų grupių, kurios taksonominis rangas tebėra diskutuotinas ir kito nuo vėdryno genties sekcijos (*Ranunculus* sect. *Batrachium* DC.), pogentės (*Ranunculus* subgen. *Batrachium* (DC.) Peterm.) iki atskiros kurklės genties (*Batrachium* (DC.) S.F. Gray). Remdamiesi Tzvelev (1998) ir Lietuvos autoriais (Lekavičius, 1989; Gudžinskas, 1999) šiame darbe *Batrachium* traktuojame kaip gentį.

Šios genties sistematiką komplikuoja ypač didelis augalų fenotipinis plastiškumas, poliploidija ir hibridizacija. Kurklės gentis evoliuciškai yra gana jauna palyginti su kitomis vėdryninių šeimos gentimis, todėl rūšių morfologiniai požymiai dar nenusistovėję ir labai varijuoja priklausomai nuo augalo išsivystymo stadijos ir ekologinių sąlygų. Tose pačiose sąlygose augantys augalai gali būti labai skirtingai, o skirtingose sąlygose augantys – labai panašūs. Tai parodo, kad rūšies nustatymo pagal morfologinius požymius galimybės praktiniam naudojimui gali būti labai ribotos. Dėl to, šios genties rūšių identifikavimui nepakanka tik biometrinės analizės, būtina panaudoti ir kitus biosistematinis metodus. Molekuliniai metodai (DNR sekoskaita, SSR, AFLP, ISSR ir kt.), kuriais analizuojamas individų panašumas makromolekulių lygmenyje, vis plačiau naudojami augalų taksonomijoje ir filogenetikoje (Simpson, 2010). AFLP (Bradley ir kt., 2013; Lambertini ir kt., 2017), ISSR (Wang ir kt., 2010; Coppi ir kt., 2015) molekulinį žymenų bei branduolio rDNR ir chloroplastų DNR regionų sekoskaitos (Telford ir kt., 2011; Zalewska-Gałosz ir kt., 2015; Bobrov ir kt., 2017; Lambertini ir kt., 2017) panaudojimas jau suteikė vertingos informacijos apie kurklių taksonomiją ir šių augalų populiacijų sandarą.

Europa yra svarbiausias *Batrachium* rūšių įvairovės centras, tačiau atskiri regionai labai skiriasi pagal rūšių iširtumą. Daugiausia sistematinis tyrimų atlikta vakarų ir šiaurės vakarų Europoje – Jungtinėje Karalystėje, kur tyrimai neapsiriboja vien tik šių šalių teritorija. Pastaruoju metu tyrimai suintensyvėjo

ir rytų Europoje (Zalewska-Gałosz ir kt., 2014; Bobrov ir kt., 2015; Bobrov ir kt., 2017). Daugelis šių tyrimų autorių pabrėžia, kad būtini išsamesni *Batrachium* rūšių įvairovės ir jų paplitimo tyrimai (Telford ir kt., 2011; Zalewska-Gałosz ir kt., 2014).

Lietuva, kaip ir visas Baltijos šalių regionas, priskiriama prie prasčiausiai šiuo požiūriu ištirtų teritorijų, kuriose *Batrachium* rūšių įvairovė iki šiol nenustatyta. Daugiausia klausimų iškyla identifikuojant tekančių vandenų kurklių rūšis. Paskutiniame Baltijos regiono šalių sąvade „Flora of the Baltic Countries“ (Laasimer ir kt., 1993), nurodoma, kad Lietuvoje auga keturios rūšys. Iš Lietuvos floros buvo visiškai eliminuota tekančių vandenų rūšis *Batrachium fluitans* (Lam.) Wimm., kuri nurodoma tik kaip galinti augti pietinės dalies upėse, nors šios rūšies paplitimą dabartinėje Lietuvos teritorijoje nurodo visi 19 ir 20 a. botanikai (Jundziū, 1830; Kuprevičius, 1934; Snarskis, 1954; Apalia, Lekavičius, 1961; Lekavičius, 1989). Viename iš paskutiniųjų tyrimų, kurio metu buvo analizuojami herbariumų pavyzdžiai, teigiama, kad Lietuvos tekančiuose vandenyse aptinkamos šešios *Batrachium* genties rūšys: *B. circinatum* (Sibth.) Spach., *B. trichophyllum* (Chaix) Bosch., *B. aquatile* (L.) Dum., *B. peltatum* Schrank, *B. fluitans* (Lam.) Wimm. ir *B. penicillatum* Dumort. Pastaroji rūšis išskiriama į du porūšius: *B. penicillatum* Dumort. subsp. *penicillatum* ir *B. penicillatum* subsp. *pseudofluitans* (Laurinavičiūtė, 2007).

Lietuvoje *Batrachium* tyrimai yra būtini norint įvertinti ne tik rūšių įvairovę, bet ir organizuojant Europinės svarbos buveinių apsaugą bei įgyvendinant Vandens buveinių direktyvos nuostatas. Upėse augančios kurklių rūšys yra svarbiausia Europinės svarbos buveinių „Upių sraunumos su kurklių bendrijomis“ augalijos sudedamoji dalis ir geros šaltavandenių upių ekologinės būklės indikatorius. Todėl jų tyrimai svarbūs moksliniu ir gamtosauginiu požiūriu ne tik Lietuvoje, bet ir visoje Europoje.

DARBO TIKSLAS

Nustatyti *Batrachium* rūšių, paplitusių Lietuvos tekančiuose vandenyse, įvairovę, populiacijų genetinį, morfologinį kintamumą ir įvertinti juos lemiančių veiksnių įtaką rūšių paplitimui.

PAGRINDINIAI TYRIMŲ UŽDAVINIAI

1. Remiantis *Batrachium* rūšių pavyzdžių, esančių Vilniaus universiteto herbariume (WI) ir Gamtos tyrimų centro Botanikos instituto herbariume (BILAS), analizės rezultatais parinkti augalų rinkimo vietas.
2. Įvertinti *Batrachium* augalų rūšinę įvairovę ir morfologinį kintamumą pasirinktose Lietuvos upių populiacijose.
3. ISSR metodu ištirti *Batrachium* rūšių, paplitusių tekančiuose vandenyse, populiacijų genetinę sandarą ir įvertinti jai įtaką darančius veiksnius.
4. Atlikti taksonominę *Batrachium* analizę naudojant branduolio *ITS* ir chloroplastų *trnH-psbA* regionų sekoskaitą.
5. Įvertinti tekančiuose vandenyse augančių *Batrachium* rūšių augaviečių ekologines sąlygas ir jų įtaką bendrijų su *Batrachium* augalais įvairovei.
6. Parengti rekomendacijas dėl *Batrachium* rūšių ir jų buveinių apsaugos.

DARBO NAUJUMAS IR PRAKTINĖ REIKŠMĖ

Pirmąkart atlikti *Batrachium* augalų gamtinių populiacijų tyrimai, panaudojant morfologinius ir DNR (ISSR, cpDNR ir rDNR) žymenis, įvertinta šios genties augalų rūšių bei populiacijų įvairovė.

Sekoskaitos metodu nustatytos ištirtų augalų cpDNR *trnH-psbA* regiono pilnos sekos buvo užregistruotos GenBank® duomenų bazėje.

Išskirta nauja augalų su kurklėmis *Ranunculetum pseudofluitantis* bendrija, kuri skiriasi nuo kitų autorių aprašytų bendrijų su šia rūšimi, nustatyti regioniniai bendrijų savitumai.

Pateiktos rekomendacijos Valstybinei saugomų teritorijų tarnybai prie Aplinkos ministerijos dėl kurklių buveinių išsaugojimo ir *B. fluitans* įtraukimo į saugomų rūšių sąrašus.

GYNIMUI PRISTATOMI TEIGINIAI

1. Vidutinis vainiklapių ilgis, antrojo ir šeštojo lapo ilgis, žiedsosčio plaukuotumas – pagrindiniai *Batrachium* augalų morfologiniai požymiai, kurie yra tinkami rūšiai Lietuvos upėse nustatyti.
2. Mažas DNR polimorfizmas ir klonų paplitimas rodo, kad kai kurių Lietuvos upių *Batrachium* populiacijose vyrauja nelytinis dauginimasis.
3. ISSR polimorfizmo tyrimai leidžia daryti prielaidą, kad kiekvienoje tirtoje Lietuvos upėje yra savita *Batrachium* genties rūšių populiacijų genotipinė įvairovė.
4. Chloroplastų *trnH-psbA* ir branduolio *ITS* regionų sekoskaita rodo, kad tirtose Lietuvos upėse auga *B. fluitans*, *B. pseudofluitans*, *B. trichophyllum* ir *B. penicillatum* s.str.
5. Morfologiškai panašios rūšys (*B. fluitans* ir *B. pseudofluitans*) ir augalų bendrijos su jomis paplitę skirtingose pagal fizikinius ir hidrocheminius rodiklius augavietėse.
6. Vandens turizmas daro neigiamą įtaką *Batrachium* sąžalynams ir bendrijoms su kurklėmis.

DARBO APROBAVIMAS

Disertacijos tema paskelbtos dvi publikacijos: viena – *ISI Master Journal List* sąrašė esančiame žurnale „*Botanica Lithuanica*“, kita – *Clarivate Analytics Web of Science* referuojamame, citavimo indeksą turinčiame, žurnale „*Aquatic Botany*“. Vienas straipsnis išspausdintas recenzuojamame leidinyje ir vienas – mokslo populiarinimo žurnale. Tyrimų rezultatai buvo pristatyti vienoje respublikinėje ir keturiose tarptautinėse konferencijose. Buvo perskaitytas pranešimas Valstybinėje saugomų teritorijų tarnyboje. Aplinkos ministerijai pateiktos rekomendacijos įtraukti *B. fluitans* į saugomų rūšių sąrašus ir parengti priemones šių rūšių bendrijoms išsaugoti.

I. LITERATŪROS APŽVALGA

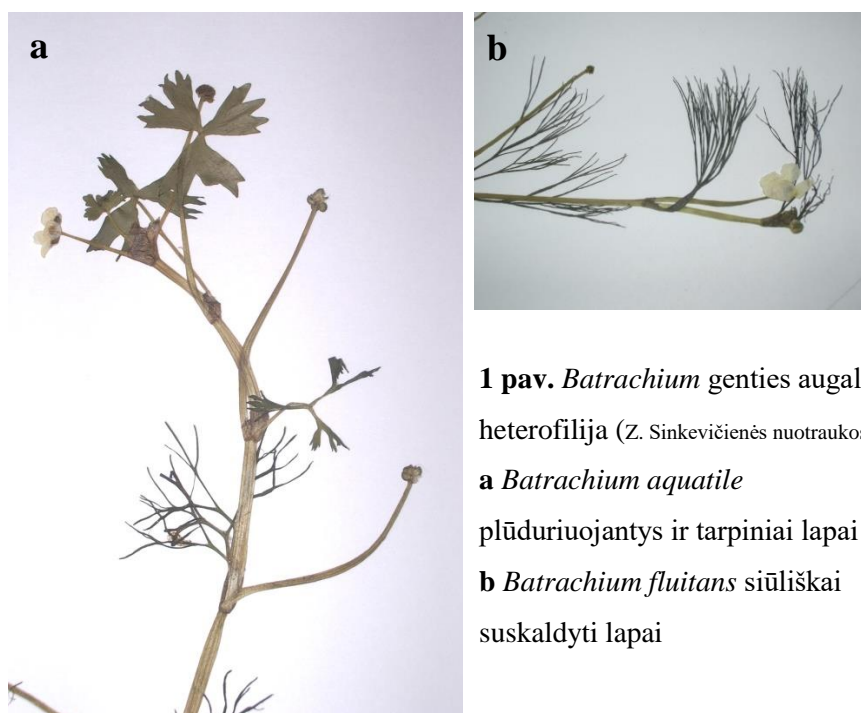
1.1. *Batrachium* gentis ir jos taksonomijos problemos

Kurklės – *Batrachium* (DC.) A. F. Gray (Ranunculaceae) genčiai priklauso vėdryninių (Ranunculaceae Juss.) šeimos baltažiedžiai vienmečiai ir daugiamečiai vandens augalai. Jie auga tekančio ir stovinčio vandens telkiniuose. Vienmečiai augalai dažniau auga upėse, mažuose upeliuose, grioviuose, kanaluose, tvenkiniuose, ežeruose, o daugiamečiai – didelėse, srauniose upėse (Poynter, 2011). *Batrachium* gali augti nedidelėmis grupėmis arba sudaryti didelius plotus apimančias bendrijas, kurios užima visą vandens tūrį sudarydamos kliūtis vandens transportui (Cook, 1966; Dawson, 1984). Retkarčiais, sumažėjus vandens kiekiui sausros metu, kai kurių *Batrachium* genties rūšių augalai dalį vegetacijos laiko gali būti išnirę virš vandens. *Batrachium* augalams yra būdingos ir terestrinės (antžeminės) formos (Dahlgren, 1995).

Daug rūpesčių sistematikams kelia didelis kurklių morfologinių požymių kintamumas. Esant nevienodom sąlygom tos pačios rūšies individai gali atrodyti labai skirtingi, o skirtingų rūšių augalai, esant panašiom sąlygom, gali būti labai panašūs. Šios genties rūšių identifikavimą apsunkina heterofilija (1 pav.): dalis augalų suformuoja ir povandeninius suskaldytus lapus, ir vandens paviršiuje plūduriuojančius, kita dalis – tik povandeninius suskaldytus (1 pav. b). Šios genties augalams yra būdingi ir tarpiniai lapai (1 pav. a), tačiau jie ne visada išauga. Tai gali priklausyti nuo aplinkos sąlygų (Cook, 1966; Wiegleb, Herr 1983; Dahlgren 1992, 1993, 1995; Preston, Croft, 2001). Webster ir Rich (1998) teigia, kad *B. penicillatum* augalai, augantys paunksmėje lėtai tekančiame vandenyje, turi ilgesnius lapus ir jų fenotipas būna panašesnis į *B. fluitans*. Tačiau *B. fluitans* augalų, augančių stipresnėje srovėje ir labiau apšviestose upėse, lapai gali būti trumpesni ir tvirtesni.

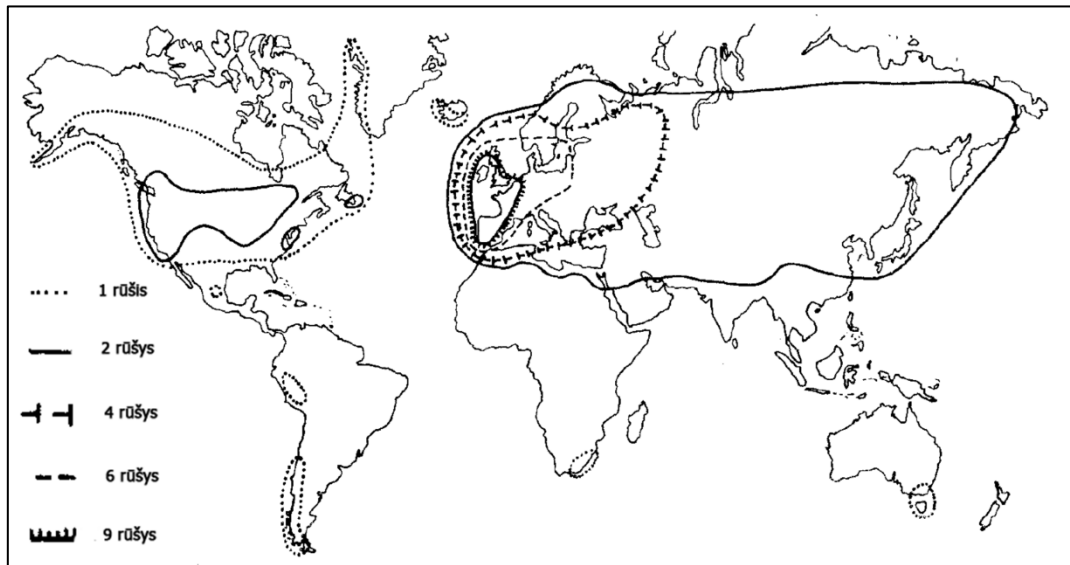
Batrachium taksonominį įvertinimą labai apsunkina augalams būdingas įvairių tipų lytinis (apvaisinimo būdai: alogamija, autogamija, kleistogamija) ir

vegetatyvinis dauginimasis (Cook, 1966; Dahlgren, 1992, 1993, 1995; Bobrov, 2003) bei poliploidija (Cook, 1966; Zalewska-Gałosz ir kt., 2014). Šių augalų bazinis chromosomų skaičius yra 8, tačiau yra žinomos diploidinės, tetraploidinės ir heksaploidinės formos, o taip pat spontaniniai tri- ir pentaploidai (Bobrov, 2003) bei hibridai (Zalewska-Gałosz ir kt., 2014; Bobrov ir kt., 2015).



1 pav. *Batrachium* genties augalų heterofilija (Z. Sinkevičienės nuotraukos)
a *Batrachium aquatile* plūduriuojantys ir tarpiniai lapai
b *Batrachium fluitans* siūliškai suskaldyti lapai

Įvairių autorių nuomone, *Batrachium* gentyje yra nuo 17 iki 30 rūšių (Cook, 1966; Pizarro, 1995; Dahlgren, 1995; Kadota, 1996; Hörandl ir kt., 2005; Wiegleb ir kt., 2017) (2 pav.). Taksonominę įvairovę didina ir keletas tarprūšinių hibridų (Cook, 1966; 1975; Vollrath, Kohler 1972; Webster, 1988; Webster, Rich, 1998; Lansdown, 2007; Zalewska-Gałosz ir kt., 2014). Didžiausia šios genties augalų įvairovė yra vakarų ir šiaurės-vakarų Europoje, tačiau paplitimo ribos nusitęsia rytų kryptimi per Aziją ir kaip kitas įvairovės centras yra nurodomos Kinija ir Japonija. Šiaurės Amerikoje ir Šiaurės Afrikoje taip pat yra didelė šių augalų rūšių įvairovė, daug mažesnė – pietų Afrikoje, Pietų Amerikoje, pietryčių Australijoje ir Tasmanijoje (Cook, 1966; Dahlgren, 1993; Lumbreras ir kt., 2011).



2 pav. *Batrachium* rūšių skaičius skirtinguose žemynuose (pagal Cook, 1966)

Batrachium taksonominis rangas įvairiais laikotarpiais kito nuo vėdryno genties sekcijos (*Ranunculus* sect. *Batrachium* DC.), pogentės (*Ranunculus* subgen. *Batrachium* (DC.) Peterm.) iki atskiros kurklės genties (*Batrachium* (DC.) S.F. Gray). Cook'o monografijoje (1966), kuri yra vienas svarbiausių veikalų aprašančių šią gentį, *Batrachium* traktuojama kaip *Ranunculus* (vėdryno) genties pogentė. Šiuo autoriumi remiasi vėliau kurkles tyrę ir šiuo metu tiriantys mokslininkai (Laasimer, 1993; Rich, Jermy, 1998; Dahlgren, Jonsell, 2001; Lansdown, 2007; Lumbreras ir kt., 2009; Lumbreras ir kt., 2011), kurie *Batrachium* taip pat traktuoja kaip *Ranunculus* (vėdryno) genties pogentę. Naudojant molekulinis metodus nustatyta, kad *Batrachium* yra monofiletinė grupė *Ranunculus* genties viduje (Emadzade ir kt., 2010; Horandl, Emadzade, 2012). Naujausioje savo publikacijoje Horandl ir Emadzade (2012) *Batrachium* traktuoja kaip sekciją *Ranunculus* viduje. Pastaraisiais autoriais remiasi ir paskutiniųjų publikacijų apie *Batrachium* autoriai (Zalewska-Gałosz ir kt., 2014; Bobrov ir kt., 2015; Englmaier, 2016; Lambertini ir kt., 2017). Tzvelev (1998) *Batrachium* aprašo kaip atskirą gentį. Remiantis šiuo autoriumi Lietuvoje *Batrachium* taip pat laikoma atskira gentimi (Gudžinskas, 1999).

Tokia, galutinai nenusistovėjusi, *Batrachium* nomenklatūra tik parodo, kad ši augalų grupė taksonominiu požiūriu yra viena iš sudėtingiausių tarp vandens augalų ir nėra ištirta iki galo. Jos sistematika iki šiol nėra nusistovėjusi tiek Europoje, tiek ir visame pasaulyje.

1.1.1. *Batrachium* rūšių įvairovė Lietuvoje

Nors pasaulio floroje yra priskaičiuojama apie 30 *Batrachium* rūšių, tačiau Lietuvos teritorijoje nurodomos ne daugiau kaip keturios: *B. fluitans*, *B. circinatum*, *B. aquatile* ir *B. trichophyllum* (Apalia, Lekavičius, 1961; Lekavičius, 1989). Pirmosios žinios apie *Batrachium* rūšis Lietuvos upėse aptinkamos dar 18-ojo amžiaus šaltiniuose. Tuo metu Gilibert'as (1782) minėjo tokias rūšis kaip *R. diversifolius* Gilib. (dabar vadinama *B. aquatile*), *R. peucedanifolius* (dabar – *B. fluitans*) ir *R. foeniculaceus* Gilib. (dabar – *B. circinatum* arba *B. trichophyllum*). Vėliau Jundziŭ'as (1830) aprašė tik dvi *Batrachium* genties rūšis: *R. peucedanifolius* (dabar – *B. fluitans*) ir *R. aquatilis* (dabar – *B. aquatile*). Jis taip pat nurodė, kad pastaroji rūšis auga tiesiog vandenyse, o *B. fluitans* aptinkama tik upėse. Slawinski's (1924) taip pat minėjo dvi *Batrachium* genties rūšis – *R. circinatus* ir *R. fluitans*, o Mowszowicz'ius (1938, 1958) prie *Ranunculus* genties nurodė *R. fluitans*, *R. circinatus*, *R. aquatilis* ir *R. flaccidus* (dabar vadinama *B. trichophyllum*). 1934 m. Kuprevičius aprašė tris rūšis – *B. fluitans*, *B. aquatile* ir *B. divaricatum* (dabar – *B. circinatum*). Pastarosios rūšies augalų augavietėmis nurodomos tik lotinės vandens sistemos. Snarskis (1954) aprašė keturias *Batrachium* genties rūšis: *B. trichophyllum* ir *B. circinatum* aptinkamas stovinčiuose ir lėtai tekančiuose vandenyse, *B. fluitans* augančią tekančiuose vandenyse ir *B. aquatile* aptinkamą stovinčiuose ir lėtai tekančiuose vandenyse bei šlapiose pakrantėse. Šios keturios *Batrachium* rūšys buvo aprašytos ir „Lietuvos floroje“ (Apalia, Lekavičius, 1961). Reikia paminėti, kad autoriai išskiria du Lietuvos teritorijoje aptinkamus *B. aquatile* varietetus: var. *submersum* Gren. et Godr. – be plūduriuojančių lapų ir var. *heterophyllum* Freyn. – su

plūduriuojančiais lapais. Jie pabrėžia, kad kiti autoriai šios rūšies porūšius ir variatetus laiko atskiromis rūšimis, tačiau net atskirų porūšių paplitimo Lietuvoje nustatymui ir literatūroje aprašomų smulkesnių rūšių išskyrimui kol kas duomenų neužtenka. *B. trichophyllum*, *B. circinatum*, *B. fluitans* ir *B. aquatile* rūšis aprašė ir Lekavičius (1989). Laasimer su kolegomis išleistame leidinyje „Flora of the Baltic Countries“ (1993) pateikia dar vieną rūšį – *B. penicillatum*. Šiame darbe iš Lietuvos floros buvo „eliminuota“ *B. fluitans* rūšis, su pastaba, kad ji gali augti Lietuvos, ypač pietinės dalies, tekančiuose vandenyse. Taigi, iki tol laikyta labiausiai paplitusia Lietuvos tekančiuose vandenyse, *B. fluitans* buvo nurodoma tik kaip ieškotina, tačiau pažymint, kad būtini detalesni šios genties rūšių įvairovės ir paplitimo tyrimai.

Batrachium genties rūšių tyrimų rezultatus 2007 m. savo darbe pateikė ir Laurinavičiūtė. Remiantis herbariumuose esančių pavyzdžių analize buvo padaryta išvada, kad Lietuvos tekančiuose vandenyse auga šešios *Batrachium* genties rūšys: *B. aquatile*, *B. circinatum*, *B. fluitans*, *B. trichophyllum*, *B. trichophyllum* ir *B. penicillatum*. Autorė nurodo du *B. penicillatum* porūšius: *B. penicillatum* subsp. *penicillatum* augalai paplitę išimtinai greitai tekančiuose vandenyse, o *B. penicillatum* subsp. *pseudofluitans* paplitimui įvertinti trūksta duomenų.

1.1.2. *Batrachium* rūšių morfologiniai požymiai, biologija ir paplitimas

Nors *Batrachium* genties rūšių požymiai pasižymi dideliu kintamumu, tačiau jie svarbūs identifikuojant tam tikras šios genties rūšis. Pats ryškiausias *Batrachium* genties daugumos rūšių skiriamasis požymis – balti vainiklapiai. Įvairių rūšių augalų žiedų vainiklapių skaičius labai varijuoja, tačiau dažniausiai jų būna 5, išskyrus *B. fluitans*, kurios augalai turi jų daugiau nei penkis. Vainiklapio forma pastovi ir būdinga visoms *Batrachium* rūšims. Žydėjimo metu kai kurių rūšių augalų vainiklapiai persidengia, kitų rūšių – nesusiliečia. Kiekvienai rūšiai yra būdingas savitas vainiklapio ilgis, kuris

dažniausiai keičiasi priklausomai nuo gamtinių sąlygų (Cook, 1966; Bobrov, 2003). Labai svarbus sisteminis *Batrachium* genties augalų požymis – nektarinės forma (Dahlgren, 1992; Bobrov, 2003). Tačiau ne visada galima nustatyti išdžiūvusių augalų nektarinių formą (Cook, 1966), o kai kurios nektarinės gali būti redukuotos ir tuomet labai sudėtinga tiksliai įvertinti jų formą (Bobrov, 2003). Atskiriant kai kurias *Batrachium* rūšis gali būti svarbi ir vaisių forma, kuri būna nuo apvalios iki plačiai kiaušiniškos (Rich, Jermy, 1998). Vaisių ilgis varijuoja nuo 1,25 mm iki 2,5 mm; dažniausiai, jie yra šiek tiek suploti iš šono, turi briauneles. Vaisių plaukuotumas nėra svarbus požymis, tačiau, dažniausiai nesubrendę, jie būna negausiai plaukuoti, o kai kurių rūšių subrendę – gana gausiai plaukuoti (Cook, 1966). Apibūdinimą apsunkina ir tai, kad ne visos *Batrachium* rūšys formuoja vaisius Lietuvos klimato sąlygomis. Identifikuojant rūšis kitas svarbus požymis yra žiedsosčio plaukuotumas. Žiedsostis būna arba tankiai plaukuotas, arba visai be plaukelių, nors kartais pasitaiko ir negausiai plaukuotas ar tik su pavieniais plaukeliais (Cook, 1966; Rich, Jarmy, 1998). Visoms *Batrachium* genties rūšims yra būdingi povandeniniai suskaldyti lapai, tačiau skirtingų rūšių lapai skiriasi lapalakščio ilgiu, skilčių skaičiumi, galinių lapo skilčių ilgiu ir skaičiumi. Taip pat svarbus požymis yra plūduriuojančių lapų buvimas / nebuvimas ir tarpiniai lapai, nors pastarieji išauga ne visada. Iš tekančiuose Lietuvos vandenyse augančių *Batrachium* genties rūšių tarpinius lapus gali išauginti tik kelios rūšys (Rich, Jermy, 1998).

Mūsų darbe buvo tiriamos šios upinės *Batrachium* rūšys:

1. *Batrachium fluitans* (Lam.) Wimm. (*R. fluitans* Lam.) – plūdinė kurklė (3 pav., 4 pav.). Tai daugiametis vandens augalas, kuris išaugina ilgus stiebus, kurių ilgis gali siekti daugiau nei 6 m. Stiebai mažai šakoti, 2-5 mm storio. Povandeniniai lapai 8-25 cm ilgio, ilgesni už tarpubamblius, 3-4 kartus suskaldyti, lapkotis apie 8 mm ilgio (Englmaier, 2016). Žiedai dideli, vainiklapių dažniausiai yra daugiau nei penki (3 pav.). Vainiklapiai balti su geltonu nageliu, atvirkščiai kiaušiniški, žydėjimo metu susiliečiantys, dažniausiai 7-13 mm ilgio. Nektarinė kriaušės formos (Rich, Jermy, 1998;

Dahlgren, Jonsell, 2001). Kuokelių skaičius svyruoja nuo 20 iki 30. Taurėlapiai yra 4-6 mm ilgio, išsiskėtę. Žiedkotis būna 5-10 cm ilgio, plikas arba su pavieniais plaukeliais. Būdingi elipsiški, šiek tiek suploti, besparniai, su skersinėmis briaunomis vaisiukai (Cook, 1966). Šios rūšies augalai dauginasi dažniausiai vegetatyviniu ir lytiniu būdu, tačiau Lietuvoje vaisių nesuformuoja (Butkuvienė ir kt., 2014), jie „mumifikuojasi“ (5 pav.).



3 pav. *B. fluitans* žiedai



4 pav. *B. fluitans* sąžalynai Neryje

Augalai žydi liepos-rugpjūčio mėnesiais. *B. fluitans* augalai geriausiai prisitaikę augti didelėse upėse su stabiliu žvirgždėtu gruntu, tačiau gali pasitaikyti ir sekliuose, eutrofiniuose, greitai tekančiuose upeliuose su smėlėtu gruntu. Nors šios rūšies augalai gana pakantūs užterštumui, tačiau jie yra šviesiamėgiai (Spink ir kt., 1997) ir, padidėjus vandens drumstumui, nunyksta (Cook, 1966).



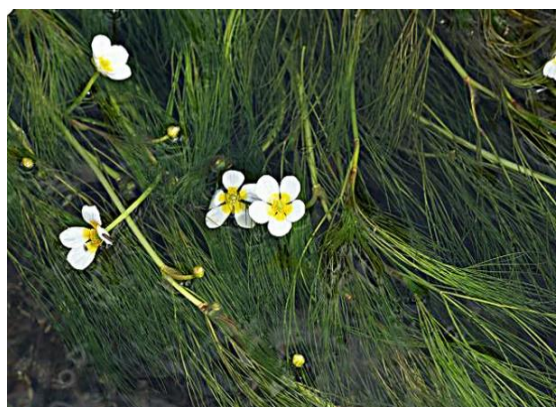
5 pav. Nesusiformavęs „mumifikuotas“ *B. fluitans* vaisynas



6 pav. Pilnai išsivystęs *B. trichophyllum* vaisynas su subrendusiais vaisiais

B. fluitans yra paplitusi Šiaurės ir Centrinėje Europoje (Dahlgren, Jonsell, 2001). Remiantis herbariumuose esančiais pavyzdžiais matyti, kad ši rūšis paplitusi Pietryčių ir Rytų Lietuvoje. Dažniausiai *B. fluitans* auga nekalkinguose vandenyse, o Pietryčių Lietuvos upės ir yra mažiausiai mineralizuotos. Vis dėlto pagrindinis *B. fluitans* paplitimą ribojantis veiksnys yra substratas ir jo savybės, o ne vandens cheminiai rodikliai. Kaip jau buvo minėta anksčiau, *B. fluitans* augalams reikalingas stabilus substratas. Šios rūšies augalai geriausiai prisitaikė augti didesnėse upėse su žvirgždėtu dugnu (Cook, 1966).

2. *Batrachium penicillatum* s.l. Dumort. – tai daugiametis augalas, kurio stiebo storis yra 4 mm, o ilgis – apie 3 m. Povandeniniai suskaldyti lapai yra ploni, 15-30 cm ilgio. Galinių lapo skilčių, kurios dažniausiai būna sukibę, 12-25 mm ilgio ir kietos, gali pasitaikyti iki keleto šimtų. Lapkočio ilgis varijuoja nuo 1 cm iki 3 cm. Penki baltos spalvos su geltonu nageliu, kiaušiniški vainiklapiai dažniausiai susiliečia žydėjimo metu, jų ilgis varijuoja nuo 5 mm iki 10 mm. Kuokelių būna apie 20 ar daugiau. Gali pasitaikyti kleistogaminių žiedų. Žiedsostis gausiai plaukuotas. Vaisiai šiek tiek suploti, besparniai su skersinėmis briaunomis, subrendę pliki ar retai plaukuoti. Žydi liepos – rugpjūčio mėnesiais (Cook, 1966; Rich, Jermy, 1998; Dahlgren, Jonsell, 2001).



7 pav. *B. penicillatum* subsp. *pseudofluitans*



8 pav. *Batrachium penicillatum* subsp. *penicillatum* (Neville McKee nuotrauka)

B. penicillatum s.l. sudėtingas taksonas. Cook (1966) aprašo tris jo variatetus: var. *penicillatus* (Dumort.) Bab., var. *calcareus* (Butcher) C. Cook ir var. *vertumnus* C. Cook. Vėliau Webster (1988) išskyrė du šios rūšies porūšius: subsp. *pseudofluitans* (7 pav.) ir subsp. *penicillatum* (8 pav.) bei du porūšio subsp. *pseudofluitans* variatetus: var. *pseudofluitans* (Syme) S. Webster ir var. *vertumnus* C. Cook. Cook (1966) savo monografijoje nurodo ir nevaisingus *Ranunculus fluitans* × *Ranunculus peltatus* ir *Ranunculus fluitans* × *Ranunculus aquatilis* / *Ranunculus trichophyllus* hibridus, kurie pagal savo morfologinius požymius labai panašūs į *B. penicillatum* s.l. Vėliau šiuos hibridus aprašė Webster (1988) ir Zalewska-Gałosz (2014).

Mūsų darbe yra vartojami *B. penicillatum* s.str. ir *B. pseudofluitans* pavadinimai (Tzvelev, 1998).

B. penicillatum s.str. (*B. penicillatum* subsp. *penicillatum*, *Ranunculus penicillatus* subsp. *penicillatus* (Dumort.) Bab.) priklausančioms augalams yra būdingi plūduriuojantys lapai, kurie būna skelti į tris ar penkias skiltis, kraštai gali būti lygūs arba dantyti; lapkotis 4-10 cm ilgio (8 pav.). Augalai gali turėti ir tarpinius lapus, tačiau jie gali būti ir neišreikšti. Povandeniniai suskaldyti lapai būna 6-8 kartus skelti. Vainiklapių ilgis varijuoja nuo 10 mm iki 16 mm, žiedkočio – nuo 0,2 cm iki 11 cm (Englmaier, 2016). *B. penicillatum* s.str. auga vakarinėje Didžiosios Britanijos dalyje ir Airijoje, tačiau šiose teritorijose ši rūšis nedažna. Didžiojoje Britanijoje šios rūšies augalai auga upėse, kurių substratas skurdus, o Airijoje įsikuria daugiau maisto medžiagų turinčiose augavietėse. Dažniausiai *B. penicillatum* s.str. auga upėse, tačiau geba įsikurti ir mažuose upeliuose, grioviuose, net ten, kur vanduo didžiąją laiko dalį būna stovintis (Rich, Jermy, 1998). Lietuvoje *B. penicillatum* s.str. taksonui priklausančių augalų paplitimas neaiškus, tačiau kitose šalyse jie aptinkami labai greitai tekančiuose vandenyse, gali augti ir ne ant tokio stabilaus substrato, nes įsišaknija ir ties tarpubambliais (Cook, 1966).

B. pseudofluitans (*B. penicillatus* subsp. *pseudofluitans*, *Ranunculus penicillatus* subsp. *pseudofluitans* (Syme) S. D. Webster) augalai neturi plūduriuojančių lapų. Tai yra pagrindinis požymis, kuris leidžia juos atskirti

nuo *B. penicillatum* s.str. Povandeniniai suskaldyti *B. pseudofluitans* lapai yra skelti 4-8 kartus. Žiedkotis gali būti nuo 0,2 cm iki 11 cm ilgio. Vainiklapių ilgis – 5-10 mm (Cook, 1966; Dahlgren, Jonsell, 2001). *B. pseudofluitans* dažniausiai auga upeliuose ir mažesnėse upėse, kuriose įprastomis sąlygomis vanduo teka lėtai. Tačiau tokioms upėms būdingi dažni vandens lygio padidėjimai, dėl kurių paspartėja ir vandens tėkmė (Englmaier, 2016). *B. pseudofluitans* augalai paplitę kalkingose ir daug maisto medžiagų turinčiose upėse pietų Anglijoje, retai ir šiaurinėje jos dalyje (Rich, Jarmy, 1998). Rūšis aptinkama ir pietvakarių Lenkijoje (Zalewska-Gałosz ir kt., 2014). Duomenų apie rūšies paplitimą kitose Europos vietose nėra.

3. *Batrachium trichophyllum* (Chaix) Bosch (*Ranunculus trichophyllus* Chaix) – siauralapė kurklė (9 pav.). Vienmetis vandens augalas, kurio stiebas gali būti iki 1 m ilgio. Plūduriuojančių lapų neturi, o povandeninių suskaldytų lapų ilgis varijuoja nuo 1,5 cm iki 4 cm. Žiedkotis retai kada būna ilgesnis nei 1,5-3,5 cm. Penkių, siaurai atvirksčiai kiaušiniškų, žydėjimo metu nesusiliečiančių, vainiklapių ilgis – nuo 3,5 mm iki 5,5 mm. Žiedsostis gausiai plaukuotas. Vaisiai elipsiški, šiek tiek suploti, besparniai, plaukuoti (6 pav.). Augalai žydi birželio-liepos mėnesiais (Englmaier, 2016).



9 pav. Žydintys *B. trichophyllum* augalai

Šios rūšies augalai dažniausiai auga laikinuose ar dirbtiniuose vandens telkiniuose: tvenkiniuose, grioviuose, sezoniškai užliejamose vietose, lėtai

tekančiuose kanaluose, mažuose upeliuose. Retai kada būna randami vandens telkiniuose, kurie yra gilesni nei 1 m (Dahlgren, Jonsell, 2001). Šie augalai nepakenčia šešėlio ar labai srauniai tekančio vandens. Dažniausiai *B. trichophyllum* aptinkama eutrofiniuose vandenyse, tačiau gali būti randama ir oligotrofiniuose (Cook, 1966). *B. trichophyllum* rūšies augalai plačiai paplitę. Paplitimo ribos apima visą Europą, išskyrus pačią šiaurinę dalį, pietų Aziją, šiaurės ir vakarų Kiniją, Japoniją, pietryčių Australiją, Tasmaniją bei centrinę Šiaurės Amerikos dalį (Cook, 1966). Lekavičius (1989) nurodo, kad Lietuvoje šios rūšies augalai aptinkami stovinčio ir lėtai tekančio vandens telkiniuose, tačiau pažymi, kad rūšis yra reta.

1.1.3. Tekančio vandens augalų bendrijos su *Batrachium*

Augalų bendrijos su kurklėmis yra svarbios moksliniu ir gamtosauginiu požiūriu ne tik Lietuvoje, bet ir visoje Europoje, nes jos yra reikšmingiausias Europinės svarbos buveinių „Upių sraunumos su kurklių bendrijomis“ (buveinės kodas 3260) augalijos komponentas (Council of the European Communities, 2007).

Šios buveinės aptinkamos natūraliose upių atkarpose, kuriose srovės greitis didesnis nei 2 m/s, gruntas yra akmenuotas gargždingas ir žvyringas. Jos gali pasitaikyti ir upėse, kuriose srovė greitis mažesnis nei 2 m/s ir vyrauja smėlio gruntas (Rašomavičius, 2012). Buveinėse gausu pakrantėje augančių augalų, kurie prisitaiko prie srovės sąlygų ir išaugina ilgus pasroviui nutįstančius lapus kaip *Sparganium* spp., *Sagittaria sagitifolia*, *Schoenoplectus lacustris*, raukšlėtus – kaip *Veronica anagallis-aquatica*, *Berula erecta* arba siaurus linijiškus – kaip plūdės. Šiose buveinėse vyrauja upės vagoje panirusi augalija, dažniausiai su *Batrachium*, *Potamogeton*, *Stuckenia* genties augalais (10 pav.). Taip pat pasitaiko ypač ant akmenų augančių vandens samanų (*Fontinalis antipyretica*), raudondumblių, o pakrantėse – helofitų, viksvų bendrijos. Mažų upelių pakraščiuose šio tipo buveinės ribojasi su žemaūgių varpinių (*Glycerietum notatae*, *Catabrosetum aquaticae*) bendrijomis, o

didelių upių – su *Butometum umbelatae* bendrijomis. Tipinės augalų rūšys šiose buveinėse yra *Batrachium fluitans*, *Batrachium penicillatum*, *Berula erecta*, *Butomus umbelatus* var. *vallisneriifolia*, *Calitriche cophocarpa*, *Potamogeton alpinus*, *Potamogeton perfoliatus*, *Stuckenia* × *fennica*, *Potamogeton* × *fluitans*, *Potamogeton* × *nitens*, *Sagittaria sagitifolia*, *Veronica anagalis-aquatica*, *Fontinalis antipyretica*. Taip pat būdingos rūšys yra *Batrachium trichophyllum*, *Myriophyllum spicatum*, *Nuphar luteum* var. *submersum*, *Potamogeton natans* ir *Sparganium emersum*.



10 pav. Augalų bendrija (3260) Peršokšnos upėje

Bendrijos su *Batrachium* augalais yra svarbios, nes keičia upės srovės greitį, maisto medžiagų ir nuosėdų judėjimą. Kurklės teikia prieglobstį ir yra svarbios ne tik lašišinėms žuvims, bet ir įvairiems bestuburiams, kuriems jos sudaro sąlygas prisitvirtinti ir maitintis (Pointer, 2014).

Tekančio vandens srovėje augančių kurklių bendrijos dažniausiai slepiasi po vienu sintaksonominiu pavadinimu – *Ranunculion fluitantis* Neuhäusl (1959) (eilė *Callitricho hamulatae-Ranunculetales aquatilis* Passarge ex Theurillat ir kt. 2015, klasė *Potamogetonetea* Klika in Klika, Novak 1941) (Mucina ir kt., 2016). Šiam sintaksonominiam rangui priskirtas bendrijas

formuoja ir *B. fluitans*, ir *B. penicillatum* s.l. rūšys (Oberdorfer, 1977). Šios bendrijos pasižymi skurdžia rūšine sudėtimi (Lumbreras ir kt., 2011) ir *Callitriche* genties rūšių gausa (Rodwell, 1995; Lumbreras ir kt., 2009). Vėliau kilo poreikis atskirti šias bendrijas ir išskirti atskiras bendrijas su *B. penicillatum* s.str. bei *B. pseudofluitans* (Dethioux, Noirfalise, 1985). Šiuo metu yra išskiriamos bendrijos su *B. pseudofluitans*: *Callitricho brutiae-Ranunculetum pseudofluitantis* Pizarro & Rivas-Martínez 2002, *Callitricho lusitanicae-Ranunculetum pseudofluitantis* Melendo, Cano & Valle 2003 (Lumbreras ir kt., 2009). Tačiau reikia paminėti, kad šiauriau (Didžiojoje Britanijoje) ir piečiau Lietuvos (Iberijos pusiasalyje) esančios *Batrachium* bendrijos skiriasi rūšių sudėtimi (Rivas-Martínez, ir kt, 2002; Melendo ir kt., 2003). Didžiosios Britanijos *Ranunculus penicillatus* ssp. *pseudofluitans* bendrijose aptinkamos tokios augalų rūšys kaip *Stuckenia pectinata*, *Berula erecta* ir *Elodea canadensis* (Rodwell, 1995), o piečiau Lietuvos esančiose bendrijose – gausu *Callitriche* genties rūšių (Rivas-Martínez, ir kt, 2002; Melendo ir kt., 2003).

Ranunculetum fluitantis bendrijos būdingos didesnėms, sraunesnėms, vidutinį kiekį maisto medžiagų turinčioms upėms (Rodwell, 1995). Tačiau Pott (1995) ir Cook (1966) pastebi, kad *R. fluitans* yra pakankamai tolerantiška taršai tol, kol vanduo išlieka skaidrus. Cook (1966) nurodo, kad substrato sudėtis, bet ne vandens hidrochemija, yra bendrijas su *Batrachium fluitans* limituojantis veiksnys.

B. pseudofluitans bendrijos aptinkamos tik kalkingose upėse, kurių vanduo pasižymi aukštomis savitojo elektrinio laidžio ir šarmingumo vertėmis (Rodwell, 1995; Spink ir kt., 1997; Hatton-Ellis, Grieve, 2003; Poynter, 2014). Danijoje šio tipo bendrijos aptinkamos srauniose upėse su moreniniu molingu substratu (Dahlgren, Jonsell, 2001).

1.2. Molekulinių žymenų taikymas genetinės įvairovės įvertinimui

Molekulinis žymuo yra specifinė DNR nukleotidų seka, kuri nustatoma polimorfiniame DNR lokuse naudojant įvairius molekulinės genetikos metodus. Šiuo metu yra taikoma daug molekulinių žymenų rūšių, kurių esmę sudaro genetinio kintamumo konvertavimas į skirtingo dydžio DNR fragmentus. Palyginti su morfologiniais žymenimis, molekuliniai žymenys turi svarų privalumą – objektyvų duomenų įvertinimą (Conner, Hartl, 2007). Molekuliniai DNR žymenys naudojami genetinei įvairovei apibūdinti, sąsajoms tarp genotipų ir fenotipinių požymių nustatyti, filogenetiniams ryšiams tirti, homozigotiškumui ir heterozigotiškumui, genetiniam populiacijų polimorfiškumui įvertinti ir kt. (Widén ir kt. 1994; Henry, 2013). Naudojant molekulinius žymenis gali būti sprendžiami sudėtingi klausimai, susiję ne tik su genetiniu kintamumu, bet ir su augalų prisitaikymu, evoliucija, rūšių išsaugojimu ir autorinių teisių apsauga selekcijoje.

1.2.1. Genetinės įvairovės tyrimai ISSR metodu

Vienas iš metodų, kuriuo tiriama genetinė įvairovė, yra paprastų pasikartojančių sekų intarpų metodas – ISSR (angl. *Inter Simple Sequence Repeat*). Jo esmė – DNR sekų, esančių tarp mikrosatelitinių lokusų, pagausinimas naudojant pasikartojančių di-, tri-, tetra-, pentanukleotidų motyvų pradmenis ir polimerazinę grandininę reakciją (Zietkiewicz ir kt., 1994). Šis metodas yra RAPD (angl. *Random Amplified Polymorphic DNA*) metodo modifikacija, kai vietoje atsitiktinės sekos pradmens naudojamas mikrosatelitinės sekos pradmuo. Tačiau ISSR atskleidžia didesnę genetinę įvairovę ir produkuoja labiau polimorfiškus DNR juostų profilius palyginti su RAPD (Crawford ir kt., 1998). Tai parodo ir natūralių augalų populiacijų tyrimai, kurių metu ISSR metodas buvo įvertintas žymiai geriau nei RAPD, nes atskleidė didesnę genetinę įvairovę bei paskatino padaryti išvadą, kad šis metodas gali būti labai sėkmingai naudojamas augalų populiacijoms tirti

(Robinson ir kt., 1997; Wolfe ir kt., 1998 a, b; Crawford ir kt., 1998; Coppi ir kt., 2015; Kupcinskiene ir kt., 2015).

Vienas iš pagrindinių šio metodo privalumų yra tas, kad nereikalinga informacija apie tiriamo objekto DNR sekas. Metodas yra greitas, santykinai pigus, nereikalauja brangios įrangos ir didelio įdirbio ruošiant pradmenis. Be to ISSR žymenys yra labai polimorfiški, o dėl naudojamų ilgesnių pradmenų, aukštesnės jų jungimosi prie DNR temperatūros, šie žymenys patikimai atsikartoja nepriklausomuose eksperimentuose. Šio metodo privalumai rodo, kad jis yra perspektyvus filogenetinėje analizėje, evoliuciniuose bei genetinės įvairovės tyrimuose (Nybom, 2004; Xing ir kt., 2015).

ISSR metodas yra plačiai naudojamas augalų populiacijoms tirti visame pasaulyje (Crawford ir kt., 1998; Camacho, Liston, 2001; Archak ir kt., 2003; Ge ir kt., 2005; Vyšniauskienė ir kt., 2015; Xing ir kt., 2015; Pahlevani ir kt., 2017). Šis metodas buvo panaudotas Kinijoje *Potamogeton malaianus* populiacijoms, esančioms dešimtyje skirtingų ežerų, sujungtų viena Yangtze upe, tirti (Chen ir kt., 2009). Autoriai analizavo *P. malaianus* genetinę įvairovę ir populiacijų struktūrą. Rezultatai parodė, kad tirtoms šios rūšies populiacijoms yra būdinga vidutinė genetinė įvairovė palyginti su kitų rūšių populiacijomis, kurios įsikūrę tokio tipo buveinėse. Vidutinė genetinė diferenciacija tarp tirtų populiacijų sudarė 20 % visos genetinės įvairovės. Remiantis tyrimų rezultatais teigiama, kad genų srautas turi didesnę reikšmę *P. malaianus* genetinei struktūrai palyginti su genų dreifu (Chen ir kt., 2009). Panaudojus ISSR metodą, taip pat buvo tiriamos endeminės rūšies *Blysmus sinocompressus* devynios populiacijos Kinijos šiaurės vakaruose. Įvertinus genetinę įvairovę ir nustatius populiacijų genetinę struktūrą, paaiškėjo, kad augalams būdinga didelė genetinė įvairovė rūšies lygmenyje, tačiau santykinai maža – populiacijos lygmenyje. Žemas genetinės įvairovės lygis populiacijose ir aukštas genetinės diferenciacijos lygis paskatino padaryti išvadą, kad *B. sinocompressus* augalams turėtų būti numatyta tam tikra apsaugos strategija (Li ir kt., 2016). Šiaurės Graikijoje augančių *Lotus corniculatus* augalų tyrimų ISSR metodu rezultatai parodė nedidelę genetinę diferenciaciją tarp tirtų

populiacijų, o vidupopuliacinė genetinė įvairovė sudarė net 90 % (Abraham ir kt., 2015). Coppi ir kt. (2015) atliko *Batrachium baudotii* tyrimus Capraia saloje natūraliose gamtinėse populiacijose, o taip pat šios augalų rūšies *ex situ* kolekcijos tyrimus. Gauti rezultatai atskleidė, kad ISSR metodas labai tinka ne tik *B. baudotii* genetiniams ištekliams įvertinti, bet ir moksliskai pagrįstam populiacijų atkūrimui upėse vykdyti. (Coppi ir kt., 2015). Taigi, atlikti tyrimai dar kartą patvirtina, kad ISSR metodas puikiai tinka augalų populiacijų genetinei įvairovei tirti.

ISSR metodas naudojamas sprendžiant ir taksonominius klausimus (Sun ir kt., 2005; Celka ir kt., 2012; Fajardo ir kt., 2014; Vyšniauskienė ir kt. 2015). Celka ir kt. (2012) analizavo dviejų *Malva* genties rūšių taksonomines problemas. Pagal morfologinius požymius *Malva alcea* ir *M. excisa* labai panašios rūšys, tačiau paplitimo arealas skiriasi. Naudojant ISSR metodą buvo identifikuotos ISSR specifinės juostos: *M. alcea* – 4, *M. excisa* – 2, tačiau pastarųjų atsikartojamumas buvo mažas. Analizuojant genetinę įvairovę tarp šių dviejų rūšių populiacijų Centrinėje ir rytų Europoje nebuvo nustatyta jokių statistiškai reikšmingų skirtumų. Taigi, nors *M. excisa* ir *M. alcea* yra traktuojamos kaip dvi atskiros rūšys, šio tyrimo rezultatai to nepatvirtino ir labiau tikėtina, kad *M. excisa* galėtų būti traktuojama kaip *M. alcea* porūšis (Celka ir kt., 2012). Fajardo ir kt. (2014) taip pat nagrinėjo taksonomines problemas naudodami ISSR metodą. Autoriai bandė išsiaiškinti filogenetinius ryšius tarp *Cattleya granulosa*, kuri yra saugoma Brazilijoje ir keturių kitų vietinių rūšių: *Brassavola tuberculata*, *Cattleya bicolor*, *C. labiata* ir *C. schofieldiana*. Atlikti tyrimai atskleidė, kad vienlapės (*Cattleya labiata*) ir dvilapės (*Brassavola tuberculata*, *Cattleya bicolor*, *C. granulosa* ir *C. schofieldiana*) rūšys skiriasi genetiškai. Genetinė įvairovė tarp rūšių sudarė 23,26 % (Fajardo ir kt., 2014). Taip pat buvo nustatyta, kad dvi rūšys, *C. granulosa* ir *C. Schofieldiana*, yra artimai susijusios ir manoma, kad *C. schofieldiana* gali būti traktuojama kaip *C. granulosa* variatetas ir žinoma kaip *Cattleya granulosa* var. *schofieldiana* (Fajardo ir kt., 2014). ISSR metodas buvo panaudotas tiriant *Pueraria* genties penkias rūšis: *P. lobata*, *P. edulis*, *P.*

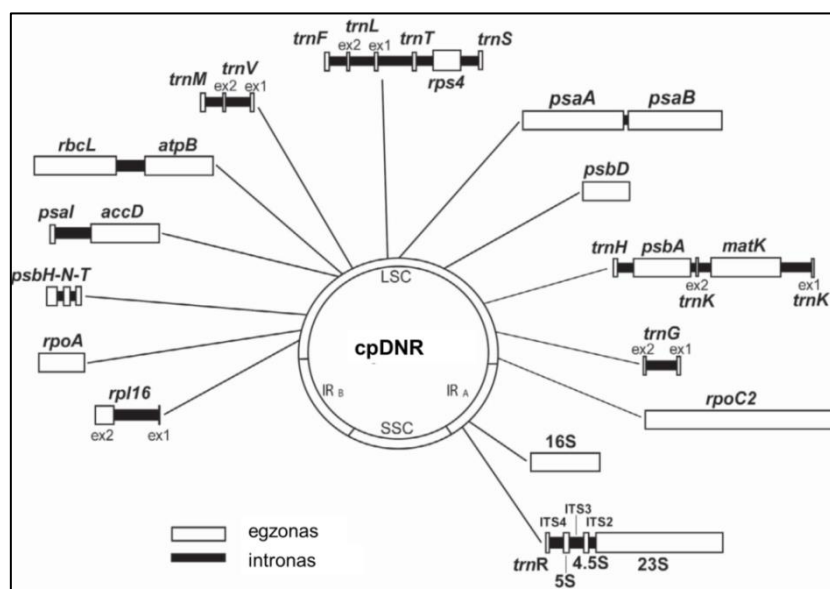
montana, *P. phaseoloides* ir *P. thomsoni*. Rezultatai parodė aiškius šių rūšių skirtumus (Sun ir kt., 2005). Ištyrus *P. lobata* augalus surinktus Kinijoje ir JAV, buvo nustatyta, kad JAV populiacija genetiškai artimesnė Kinijos populiacijai nei JAV esančioms giminingų rūšių populiacijoms. Kinijoje esančios *P. lobata*, *P. montana* ir *P. thomsoni* populiacijos pasižymėjo didele genetinė diferenciacija, o JAV esanti *P. lobata* populiacija – maža genetinė diferenciacija, tačiau didele genetinė įvairove. Tai patvirtina hipotezę, kad šios rūšies individai į JAV buvo atvežti iš Japonijos ar Kinijos, vėliau genetinė įvairovę didino genų mainai ir rekombinacija (Sun ir kt., 2005). Vyšniauskienė ir kt., (2015) nustatė filogenetinius ryšius bei genų srautą tarp *Medicago* subsp. *sativa*, *M. subsp. falcata* ir jų hibrido *M. subsp. varia*. Tyrimų rezultatai parodė mažą genetinė diferenciaciją tarp šių porūšių, tačiau didelę diferenciaciją tarp populiacijų. Buvo nustatyta, kad visų tirtų porūšių populiacijų genetinė įvairovė yra panaši. Taigi, tokie glaudūs ryšiai tarp populiacijų atskleidė, jog vyksta intensyvus genų srautas tarp skirtingų porūšių populiacijų (Vyšniauskienė ir kt., 2015).

1.2.2. Chloroplastų DNR specifinių regionų sekosckaita

Vienas iš šiuo metu plačiai naudojamų DNR žymenų metodų organizmų genetinei įvairovei tirti yra sekosckaita (De Vere ir kt., 2012). Gali būti sekvenuojami genai ar genų atkarpos branduolio, mitochondrijų ar chloroplastų DNR, o taip pat ištisi genomai. Augalų taksonomijoje vis plačiau naudojami chloroplastų DNR ir branduolio rDNR sekų tyrimai (Shaw ir kt., 2005; Hollingsworth ir kt., 2011; Telford ir kt., 2011; Załewska-Gałosz ir kt., 2015).

Kaip jau yra gerai žinoma, augalų ląstelėse esantys chloroplastai turi savo atskirai replikuojamą DNR ir baltymų sintezės sistemą. Nors augalų chloroplastų genomų sandara yra konservatyvi, tačiau nepaisant to, galimi įvairūs jos pokyčiai: gali pasitaikyti iškritų, intarpų, inversijų ir kt. (Yukawa ir kt., 2005). Chloroplastų DNR (cpDNR) molekulėje yra koduojančios ir nekoduojančios sritys (11 pav.). Nors nėra vienareikšmių rezultatų apie

mutacijų ar kitų pokyčių dažnį koduojančiose ir nekoduojančiose cpDNR srityse, tačiau manoma, kad įvairūs pokyčiai yra dažnesni, būtent, nekoduojančiose srityse (intronuose ir tarpgeniniuose tarpikliuose) (Kelchner, 2000; Matsuoka ir kt., 2002). Manoma, kad nekoduojanti DNR kinta greičiau, o joje atsiradę mutacijos kaupiasi, nes jų neveikia atranka (Scarcelli ir kt., 2011). Nors chloroplastų DNR tam tikrų regionų sekoskaita yra nepigus metodas, tačiau dėl galimybės identifikuoti atskirus taksonus ar nustatyti kelių taksonų filogenetinius ryšius sekoskaita plačiai naudojama visame pasaulyje (Shaw ir kt., 2005; Theis ir kt., 2008; Wang ir kt., 2017). Šis metodas tapo ypač populiarus tada, kai cpDNR tyrimuose buvo pritaikyta automatizuota sekoskaita (Raubeson, Jansen, 2005).

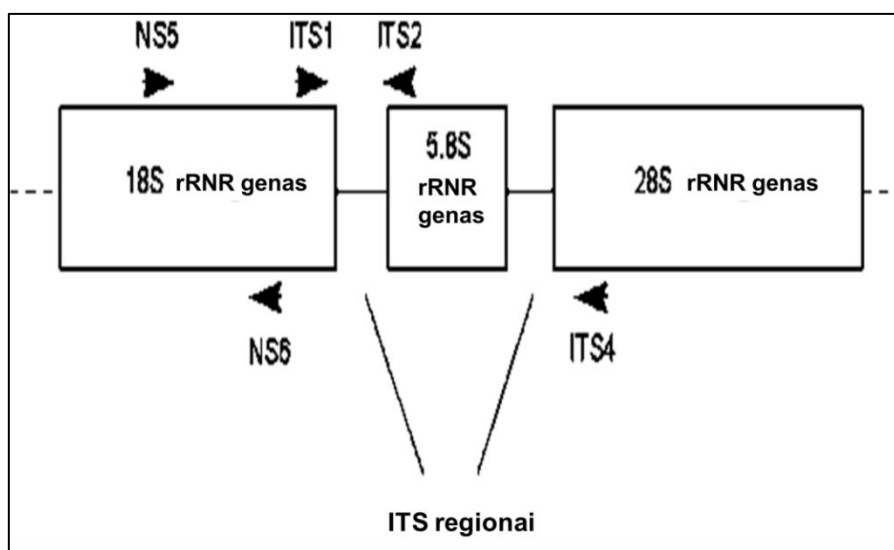


11 pav. cpDNR koduojantys ir nekoduojantys regionai (pagal Stech, Quandt, 2010)

Atliekama įvairių cpDNR regionų sekoskaita, tačiau dažniausiai analizuojami yra *trnC-ycf6* (Telford ir kt., 2011), *rps16-rps16*, *trnK-trnK*, *trnL-trnF* (Koga ir kt., 2008), *psbE-petL*, *rpl32-trnL* (Bobrov ir kt., 2015), *trnH-psbA* (Janzen ir kt., 2009; Telford ir kt., 2011) regionai. Pastarasis regionas pasižymi dideliu polimorfizmu (Hollingsworth ir kt., 2011; Telford ir kt., 2011).

1.2.3. Branduolio ribosominės DNR regionų sekoskaita

Ne tik chloroplastų, bet ir branduolio DNR yra plačiai naudojama augalų rūšių identifikavimui ir filogenetiniuose tyrimuose. Branduolio ribosominės DNR genų vidinis transkribuojamas tarpiklis (*ITS*) (12 pav.) yra vienas iš dažniausiai naudojamų DNR žymenų augalų ir kitų organizmų molekuliniėje sistematikoje genčiai ir rūšiai nustatyti (White ir kt., 1990; Baldwin ir kt., 1995; Cheng ir kt., 2016). Žiediniai augalai, ypač *Amelanchier* ir *Calycadenia* genčių atstovai, buvo vieni iš pirmųjų augalų, kurių filogenetiniai ryšiai buvo tiriami naudojant *ITS* (Baldwin ir kt., 1995; Campbell ir kt., 1997; Kress ir kt., 2005). *ITS* sėkmingai buvo panaudota nustatant ir kitų augalų, pavyzdžiui, *Betula* genties kai kurių rūšių hibridinę kilmę (Nagamitsu ir kt., 2006b), *Carpinus* genties kai kurių rūšių genetinę įvairovę ir populiacijų filogenetinius ryšius (Sun ir kt., 2011).



12 pav. Branduolio ribosominės DNR *ITS* regionai (pagal Lilley, Chinabut, 2000)

ITS kartu su kai kuriais chloroplastų genomo regionais buvo pradėti naudoti brūkšniniam kodavimui (Valentini ir kt., 2009). Pirmą kartą šis terminas buvo pavartotas 1993 metais (Arnot ir kt., 1993). Tačiau šio pobūdžio darbų „aukso amžius“ prasidėjo nuo 2003 metų (Hebert ir kt., 2004), kai vis daugiau tyrėjų pradėjo naudoti šį metodą, dažniausiai, skirtingų rūšių

identifikavimui, o genų bankai vis pasipildydavo įvairių rūšių papildomais konkrečių DNR regionų sekoskaitos duomenimis (Janzen ir kt., 2009; Hollingsworth ir kt., 2011; De Vere ir kt., 2012). Pirmiausia *ITS* buvo panaudotas žiedinių augalų rūšims nustatyti (Kress ir kt., 2005). Po daugelio darbų šia tema rezultatų paskelbimo atsirado tam tikras nusivylimas *ITS* tinkamumu dėl nevisiškai suderintos genų šeimos evoliucijos, per didelio pradmenų universalumo (1990 m. White ir kt. sukūrė pradmenis grybų tyrimams), DNR fragmento pagausinimo kai kuriose rūšyse problemų ir kt. (Cheng ir kt., 2016). *ITS* naudojimas molekuliniėje sistematikoje vėl suintensyvėjo nuo 2011 m. (Hollingsworth ir kt., 2011). Dabar rekomenduojama *ITS* naudoti kartu su cpDNR regionais. Pagrindiniai reikalavimai keliami DNR sekai, kuri tiktų brūkšniniam kodavimui, yra šie: ji turi būti būdinga daugumai augalų, neilga, polimorfinė, lengvai pagausinama ir identifikuojama. Vieni iš pirmųjų ir dabar dažniausiai naudojamų regionų yra anksčiau minėti *trnH-psbA* bei *ITS* (White ir kt., 1990; Telford ir kt., 2011; Lambertini ir kt., 2017).

1.3. *Batrachium* genties augalų molekuliniai tyrimai

Pastaruoju metu padaugėjo *Batrachium* genties augalų molekulinį-genetinių tyrimų (Telford ir kt., 2011; Bradley ir kt., 2013; Jopek, Dąbrowska, 2014; Zalewska-Gałosz ir kt., 2014; Bobrov ir kt., 2015; Coppi ir kt., 2015; Lambertini ir kt., 2017). Šios genties rūšių morfologinis plastiškumas, taksonominis neapibrėžtumas ir kitos jau minėtos priežastys pagrindžia molekulinį žymenų naudojimo būtinybę šių augalų tyrimuose.

Batrachium genties augalų molekulinį tyrimų yra nedaug. Pirmuosius tyrimus 2007 m. atliko Ku su kolegomis. Japonijoje. Jie nustatė endeminės rūšies *Ranunculus kadzusensis* populiacijų genetinę įvairovę panaudodami atsitiktinai pagausintos polimorfinės DNR (RAPD) metodą. Tyrimus Japonijoje taip pat vykdė Koga su bendradarbiais (Koga ir kt., 2008). Šie autoriai analizavo 46-ias *Batrachium* genties augalų populiacijas, naudodami

keturių cpDNR regionų sekoskaitą, ir nustatė kai kurioms rūšims savitus 8 haplotipus. Telford ir kt. (2011) atliko šios genties rūšių Jungtinėje Karalystėje taksonominius tyrimus naudodami cpDNR kelių regionų ir branduolio *18S-5.8S-26S* ribosominės DNR *ITS* regiono sekoskaitą. Jie nustatė galimus *B. circinatum*, *B. fluitans*, *B. peltatus*, *B. penicillatum* subsp. *pseudofluitans*, *B. trichophyllum* filogenetinius ryšius ir kai kurioms iš tirtų rūšių savitus haplotipus (Telford ir kt., 2011). Bradley ir kt. (2013), naudodami amplifikuotų fragmentų ilgio polimorfizmo (AFLP) metodą, ištyrė *R. fluitans* vienos Airijos populiacijos genetinę įvairovę. Tyrimų rezultatai parodė, kad populiacijoje vyravo lytinis dauginimasis. Vieno nukleotido polimorfizmo (VNP) tyrimų rezultatai neatskleidė *R. fluitans* ir *R. penicillatus* hibridizacijos populiacijoje. Vienus naujausių tyrimų atliko Lenkijos mokslininkai, kurie, naudodami cpDNR *matK* regiono ir branduolio *5.8S* ribosominės DNR *ITS* sekoskaitą, nustatė genotipo, priskiriamo heterogeniškai *Ranunculus penicillatus* grupei, tėvines rūšis – *Ranunculus fluitans* ir *R. peltatus* (Zalewska-Gałosz ir kt., 2014). Bobrov ir kt. (2015) ištyrė 26-ias šiaurės ir europinės Rusijos dalies bei Suomijos *Batrachium* genties augalų populiacijas. Ištyrė dviejų nekoduojančių cpDNR regionų polimorfizmą nustatė, kad *Ranunculus schmalhauseni* savo cpDNR paveldėjo iš dviejų skirtingos kilmės *Batrachium* linijų. Tai parodė, kad šis taksonas susidarė įvykus mažiausiai dviem hibridizacijos procesams. Norėdami nustatyti skirtumus tarp taksonų, mokslininkai tyrimo metu panaudojo ir branduolio *5.8S* ribosominės DNR *ITS* rajono sekoskaitą, tačiau cpDNR sekoskaitos rezultatai buvo informatyvesni. 2017 m. Lambertini ir kt., panaudodami AFLP žymenis ir *ITS* bei *matK* sekoskaitą, ištyrė tris *Ranunculus baudotii* vienos Danijos upės populiacijas. Autoriai norėjo išsiaiškinti vegetatyvinio ir lytinio dauginimosi reikšmę rūšies plitimui bei šių augalų genetinės įvairovės pasiskirstymą upėje. Gauti rezultatai parodė, kad visos trys populiacijos yra genetiškai skirtingos nepaisant mažos genetinės įvairovės. Taip pat buvo padaryta išvada, kad vegetatyvinis dauginimasis dominuoja *R. baudotii* metapopuliacijoje (Lambertini ir kt., 2017).

II. TYRIMŲ MEDŽIAGA IR METODAI

2.1. *Batrachium* augalinės medžiagos morfologiniams ir molekuliniais tyrimams surinkimas

Tyrimo vietos buvo pasirinktos atlikus Vilniaus universiteto herbariume (WI) ir Gamtos mokslų centro Botanikos instituto herbariume (BILAS) esančių kurklių pavyzdžių analizę (13 pav.). Didžioji dalis tyrimo vietų buvo rytinėje Lietuvos dalyje, kur yra tankus upių tinklas (vidutiniškai 1 km/km²).

Didžiausias upių tankis (1,55 km/km²) yra Vidurio Lietuvos žemumoje, kurioje vyrauja vandeniui nelaidūs molio dirvožemiai, o mažiausias (0,45 km/km²) – gerai drenuojamuose Pietų Lietuvos smėliuose (Gailiušis ir kt., 2001). Lietuvos upėms būdingi pavasario potvyniai ir žemas vandens lygis vasarą bei žiemą, tačiau laikinai jis gali padidėti dėl pastovių ir gausių kritulių. Vakarų Lietuvos upės pasižymi didžiausiais vandens lygio svyravimais, o rytų – mažiausiais. Lietuvos upių vandens mineralizacija yra gana įvairi, nuo mažiau nei 200 mg/l, iki daugiau nei 700 mg/l. Pietryčių ir Vakarų upėms būdinga santykinai maža ir pastovi mineralizacija (200-300 mg/l), o Šiaurės Lietuvoje esančių upių vandens mineralizacija gali kisti nuo 200 mg/l pavasarį iki 1700-2000 mg/l vasarą, kai yra žemas vandens lygis. Tokie upių vandens mineralizacijos svyravimai yra dėl dirvožemių sandaros skirtumų (Šiaurės Lietuvoje vyrauja silikatinės uolienos) (Kilkus, Stonevičius, 2011).



13 pav. *Batrachium* genties augalų paėmimo vietos: TA – Tatula, SI – Širvinta, PE – Peršokšna, ZE – Žeimena, ZA – Žalesa, VE – Veržuva, NE – Neris, VO – Vokė, VI – Vilnia, ME – Merkys, GA – Gauja, GR – Grūda, UL – Ūla, SK – Skroblus, VER – Verknė, VIE – Viešvilė

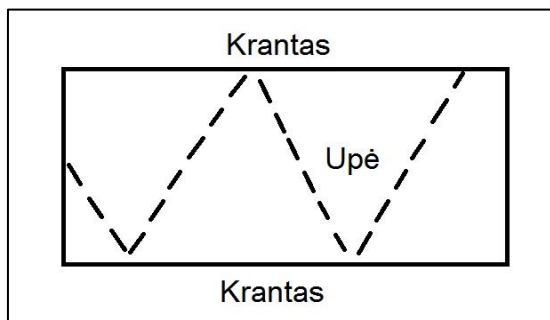
Kiekvienoje tyrimų vietoje paimtų individų skaičius priklausė nuo populiacijos dydžio ir svyravo nuo 8 iki 12 (1 lentelė). Morfologinių požymių analizei ir molekuliniais tyrimams buvo surinkti iš viso 185 *Batrachium* individai. Keletas kiekvieno augalo lapų buvo vežama į laboratoriją molekuliniais tyrimams, o likęs augalas buvo herbarizuojamas ir atliekami morfometriniai jo matavimai.

1 lentelė. *Batrachium* augalų populiacijos, jų kodavimas, tirtų individų skaičius ir koordinatės

Nr.	Populiacija	Populiacijos kodas	Pavyzdžių skaičius (vnt.)	Koordinatės (ilg.R; plat.Š)
1	Tatula	TA	8	56° 08' 17,21"; 24° 30' 37,07"
2	Širvinta	SI	12	55° 01' 57,05"; 24° 39' 41,45"
3	Peršokšna	PE	12	55° 09' 53,54"; 25° 50' 24,64"
4	Žeimena	ZE	12	54° 59' 01,68"; 25° 46' 23,62"
5	Žalesa	ZA	12	54° 51' 00,94"; 25° 20' 26,98"
6	Veržuva	VE	12	54° 45' 27,05"; 25° 23' 25,77"
7	Neris	NE	11	54° 45' 37,52"; 25° 21' 29,15"
8	Vokė	VO	12	54° 36' 49,32"; 25° 08' 10,06"
9	Vilnia	VI	12	54° 41' 15,32"; 25° 17' 36,54"
10	Merkys	ME	10	54° 06' 26,37"; 24° 16' 33,33"
11	Gauja	GA	12	54° 10' 47,16"; 25° 39' 35,01"
12	Grūda	GR	12	54° 07' 09,25"; 24° 18' 17,52"
13	Ūla	UL	12	54° 07' 47,58"; 24° 27' 42,23"
14	Skroblus	SK	12	54° 00' 56,18"; 24° 17' 36,23"
15	Verknė	VER	12	54° 35' 51,02"; 24° 05' 29,25"
16	Viešvilė	VIE	12	55° 05' 00,07"; 22° 23' 45,07"

2.2. Bendrijų su *Batrachium* rūšimis aprašymai

Kiekvienoje tyrimų vietoje buvo bendama upės vaga tam tikra trajektorija prieš srovę ir 100 m atkarpoje renkami augalai (14 pav., 15 pav.). Paimant augalą kiekvienoje vietoje buvo vertinamas gruntas, kuriame augalas auga, upės gylis, vagos plotis ir atliekamas bendrijų aprašymas.



14 pav. Bridimo upėje trajektorija



15 pav. Augalinės medžiagos rinkimas upės vagoje (J. Patamsytės nuotrauka)

Bendrijų aprašymai buvo atliekami 1 m × 4 m ploto laukeliuose. Augalų gausumui įvertinti buvo naudojama Braun-Blanquet (Braun-Blanquet, 1964) skalė:

r – pavieniai individai (iki penkių individų);

+ – individų mažai, dengia labai mažą plotą;

1 – < 5 % (individų gana daug, esant mažam padengimui, arba jų palyginti mažai, bet tada padengimas didesnis);

2 – 5 – 25 %;

3 – 25 – 50 %;

4 – 50 – 75 %;

5 – 75 – 100 %.

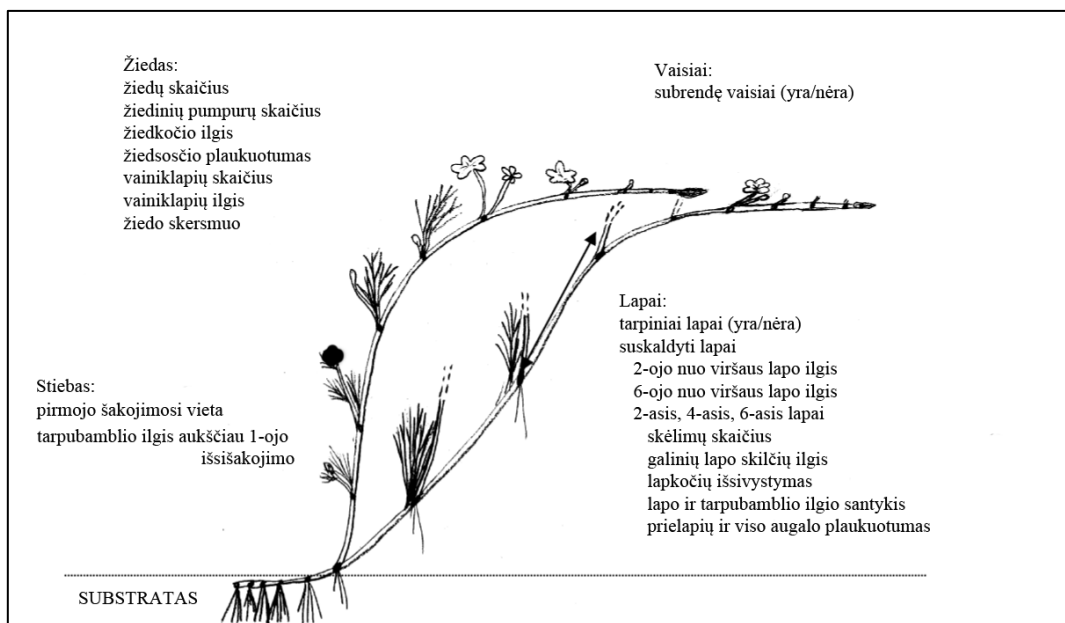
Iš viso buvo atlikti 185 geobotaniniai aprašymai.

2.3. *Batrachium* genties individų morfologinių požymių tyrimas

Prieš pradėdant morfologinių požymių analizę, pirmiausia buvo peržiūrėti kitų šalių autorių sudaryti *Batrachium* apibūdinimo raktai. Iš viso buvo pasirinkta 18 požymių, kurie dažniausiai naudojami šių augalų apibūdinimui, buvo vertinami atliekant augalų morfologinę analizę (16 pav).

Ne visi ištirti 185 augalai turėjo generatyvinius organus, todėl generatyviniai ir vegetatyviniai kiekvienos populiacijos individai buvo atskirti į atskiras grupes. Vegetatyviniais individais buvo laikomi tokie augalai, kurie neturėjo jokių generatyvinio dauginimosi struktūrų. Prie generatyvinių individų

buvo priskiriami augalai, kurie turėjo pilnai išsivysčiusius žiedus, „mumifikuotus“ arba pilnai išsivysčiusius vaisius. Kiti morfologiniai požymiai, kurie buvo įvertinti tyrimo metu, pateikti 16-ame paveiksle.



16 pav. *Batrachium* augalų požymiai, pagal kuriuos buvo atlikta morfologinė analizė

Augalų morfologijos tyrimai buvo atliekami analizuojant herbarizuotų augalų požymius (17 pav.). Kai kurių požymių analizei, pavyzdžiui, nustatant, kiek kartų lapas skeltas, lapai buvo mirkomi vandenyje (18 pav.).



17 pav. Herbarizuoti *B. penicillatum* lapai



18 pav. Mirkytas vandenyje ir išskleistas *B. penicillatum* lapas

Kai kurių morfologinių požymių (pvz., žiedsosčio plaukuotumo) vertinimui buvo naudojama binarinė sistema (pvz., plaukuotas žiedsostis – 1, plikas arba su pavieniais plaukeliais – 0). Mikroskopinių požymių analizei buvo panaudotas mikroskopas NIKON SMZ800 su vaizdų analizavimo programa NIC – Elements.

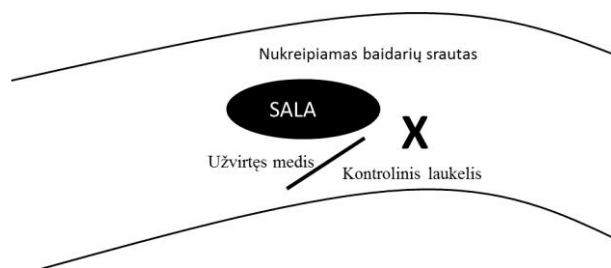
2.4. Fizikiniai ir cheminiai upių vandens parametrai

Norėdami nustatyti augaviečių, kuriose įsikūrę bendrijos su skirtingomis *Batrachium* rūšimis, ekologinių sąlygų skirtumus, panaudojome 30 upių atkarpu, kurios sutapo su valstybinio monitoringo taškais, vandens fizikinius-cheminius rodiklius: srovės greitį (m/s), pH, šarmingumą (mmol/l), savitąjį elektrinį laidį ($\mu\text{m}/\text{cm}$), amonio jonus (NH_4^+) (mg/l), nitritus (NO_2^-), (mg/l), nitratų (NO_3^-) (mg/l), bendrą azotą (bendras N) (mg/l), bendrą fosforą (bendras P), (mg/l), fosfatų (PO_4^-) (mg/l) ir kalcio jonus (Ca^{2+}) (mg/l). Minėtų rodiklių vertės buvo paimtos iš laisvai prieinamų Aplinkos apsaugos agentūros duomenų (<http://vanduo.gamta.lt/cms/index?rubricId=6adeeb1d-c902-49ab-81bb-d64b8bcceffd>) (Valstybinio upių monitoringo duomenys, 2013, 2014, 2015). Skirtingų tyrimo vietų aplinkos rodiklių palyginimui buvo panaudotas porinis Mann-Whitney *U* testas.

2.5. Vandens transporto įtakos *Batrachium* augalams tyrimas

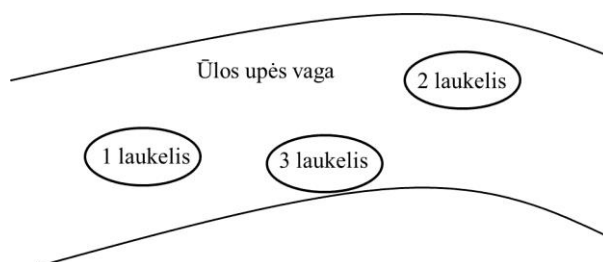
Vykdamas „vandens transporto įtakos *Batrachium* genties augalams“ eksperimentą, Ūlos upėje buvo įrengti tiriamieji laukeliai. Tyrimai buvo atliekami 2016 metais gegužės – rugsėjo mėnesiais.

Kaip kontrolė buvo pasirinktas 1 m × 4 m dydžio laukelis, esantis ties Mančiagire (54° 07' 57,4" / 24° 27' 08,87"), kur vandens turizmo įtaka buvo minimali, nes upės viduryje yra susiformavusi sala ir vienoje jos pusėje kliūtį baidarėms plaukti sudarė nuvirtęs medis bei šakos, todėl visas baidarių srautas buvo nukreipiamas į kitą pusę (19 pav.).



19 pav. Eksperimento „vandens transporto įtakos *Batrachium* augalams tyrimas“ kontrolės laukelis

Trys eksperimentiniai laukeliai, kurių dydis 1 m × 4 m, buvo pasirinkti Ūlos upėje ties „Ūlos akimi“ (54° 08' 30,18" / 24° 26' 22,29"), kur baidarių poveikis intensyviausias. Laukelių išdėstymas pateiktas 20-ame paveiksle.



20 pav. Eksperimentinių laukelių išdėstymas Ūlos upėje

Batrachium ir kitų makrofitų rūšių gausumas buvo vertinamas naudojant Braun-Blanquet skalę (Braun-Blanquet, 1964). Taip pat buvo vertinamas upės gylis, kuriame auga augalai ir *Batrachium* genties augalų generatyvinių struktūrų (žiedų ar vaisių) susiformavimas.

Duomenys apie Ūlos upę praplaukusių baidarių skaičių buvo gauti iš Dzūkijos nacionalinio parko direkcijos.

2.6. DNR išskyrimas modifikuotu CTAB metodu

Augalų genomine DNR buvo skiriama naudojant modifikuotą CTAB metodą (Doyle, Doyle, 1987). Pirmiausia buvo paruoštas CTAB ekstrakcijos buferis: 10 ml CTAB buferio paruošti buvo naudojama 0,4 ml 0,5M EDTA

(pH 8,0), 1 ml 1M Tris (pH 8,0), 2,75 ml 5M NaCl, 2 ml 10 % CTAB, 0,02 ml 2-merkaptoetanolio ir 100 mg PVP-40. Ekstrakcijos buferis buvo išpilstomas į mėgintuvėlius po 0,8 ml. Į kiekvieną mėgintuvėlį įlašinama po 5 µl ribonukleazės A (10 mg/ml). Augalai buvo plaunami tekančiu čiaupo vandeniui, perplaunami distiliuotu, nusausinami filtriniu popieriumi ir apie 80-100 g augalo masės homogenizuojama suskystintame azote. Homogenizuota masė buvo perkeliama į 2 ml tūrio mėgintuvėlius su CTAB ekstrakcijos buferiu. Mėgintuvėliai su mišiniu kelis kartus pavartomi ranka ir inkubuojami 25 min. termostate Thermomixer Comfort (Eppendorf, Vokietija) esant +60 °C. Į kiekvieną mėgintuvėlį, jiems atvėsus, buvo įpilama po 1 ml chloroformo, mėgintuvėliai švelniai pavartomi ir centrifuguojami centrifugoje Centrifuge 5415 R (Eppendorf, Vokietija) 3 min. esant 12000 x g. Viršutinė vandeninga fazė buvo nusiurbama į naujus 2 ml mėgintuvėlius, tuomet vėl įpilama po 1 ml chloroformo, švelniai pavartoma ir centrifuguojama 3 min. esant 12000 x g. Po to viršutinė vandeninga fazė (400 µl) vėl nusiurbama į naujus 1,5 ml mėgintuvėlius, įpilama po 200 µl 5M NaCl ir po 800 µl 95 % šalto etilo alkoholio. Mėgintuvėliai švelniai pavartomi ranka ir inkubuojami 20 min. -20 °C temperatūroje. Po inkubacijos mėgintuvėliai buvo centrifuguojami 6 min. esant +4 °C temperatūrai, 12000 x g. Po centrifugavimo skystoji fazė iš mėgintuvėlių atsargiai nupilama ir nuosėdos praplaunamos 200 µl, 70 % etilo alkoholio (-20 °C) ir mėginiai vėl centrifuguojami 6 min. esant +4 °C temperatūrai, 12000 x g. Po centrifugavimo skystoji fazė vėl nupilama, o išskirta DNR džiovinama steriliame bokse kambario temperatūroje. Išdžiūvusi DNR ištirpinama 100 µl sterilaus dejonizuoto vandens (~ 18,3 Ω). Ištirpusi DNR laikoma -20 °C temperatūroje.

2.7. DNR koncentracijos ir kokybės nustatymas

Išskirtos DNR kokybė ir koncentracija buvo matuojama bekiuvečiu spektrofotometru ND-2000 (NanoDrop[®], Thermo Fisher Scientific, Vilmingtonas, JAV). Kiekvieno pavyzdžio DNR koncentracija buvo nustatoma

esant 260 nm bangos ilgiui. Išskirtos augalų DNR švarumą parodo A260/A280 santykis. Jis turėtų būti apie 1,8-2,0. Jei šis santykis būna daugiau nei 2,0, tikėtina, kad gali būti RNR priemaišų, o jei santykis mažesnis nei 1,8, tai gali būti, kad DNR yra užteršta įvairiais organiniais junginiais. PGR (polimerazinei grandininei reakcijai) vykdyti buvo naudojama 5 ng/μl koncentracijos DNR.

2.8. PGR vykdymas

2.8.1. ISSR-PGR vykdymas

PGR reakcijos mišinys (2 lentelė) buvo ruošiamas laminariniame bokse SAFE 2020 (Thermo Scientific, Vokietija) prieš pat amplifikaciją. Į 0,2 ml sterilius mėgintuvėlius išpilstoma DNR ir pilama po 6 μl PGR reakcijos mišinio.

2 lentelė. PGR reakcijos mišinio reagentų kiekiai vienam pavyzdžiui

Reagentas	Kiekis
10× <i>Taq</i> KCl buferis	1 μl
dNTP (2 mM)	1 μl
MgCl ₂ (25 mM)	1,2 μl
Pradmuo (1 OV)	0,4 μl
<i>Taq</i> DNR polimerazė (5 U/μl)	0,08 μl
DNR (5 ng/μl)	4 μl
Dejonizuotas H ₂ O (~ 18,3Ω)	2,32 μl

DNR amplifikacija, kurios vykdymo sąlygos pateiktos 3-ioje lentelėje, buvo atliekama termocikleriu Mastercycler Personal (Eppendorf, Vokietija).

3 lentelė. DNR amplifikacijos vykdymo sąlygos

PGR parametras	ISSR-PGR pradmenys		
	I-39, I-50a	I-28, I-34, O	C
Pradinė DNR denatūracijos T ir laikas	94 °C / 7 min.	94 °C / 7 min.	94 °C / 7 min.
DNR denatūracijos T ir laikas	94 °C / 30 s	94 °C / 30 s	94 °C / 30 s
Pradmenų prisijungimo T ir laikas	46 °C / 45 s	44 °C / 45 s	51 °C / 45 s
DNR sintezės T ir laikas	72 °C / 2 min.	72 °C / 2 min.	72 °C / 2 min.
Amplifikacijos ciklų skaičius	32×		
DNR sintezės baigiamojo etapo	72 °C / 7 min.	72 °C / 7 min.	72 °C / 7 min.

laikas ir T
DNR laikymo T

+4 °C

Tiriant *Batrachium* genties upinių rūšių genetinę įvairovę, ISSR analizei buvo naudojami šie oligonukleotidiniai pradmenys: ISSR-O – 5'GAG(CAA)₅3', ISSR-C – 5'(AG)₈CG3', ISSR-I-28 – 5'(GT)₆CG3', ISSR – I-39 – 5'(AGC)₄AC3', ISSR-I-34 – 5'(AGC)₄GG3', ISSR-I-50a – 5'CCA(GCT)₄3'.

2.8.2. Chloroplastų DNR *trnH-psbA* ir branduolio ribosominės DNR *ITS* regionų sekų pagausinimas

Batrachium genties augalų tyrimuose buvo pasirinktas vienas chloroplastų DNR regionas (*trnH-psbA*), kuris yra apie 500 bp ilgio tarpiklis tarp *trnH* ir *psbA* genų. Šio regiono pagausinimui buvo panaudoti *psbA* (5'-GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3') ir *trnH*^{GUG} (5'-CGCGCATGGTGGATTCACAATCC-3') pradmenys. Šiam cpDNR regionui pagausinti PGR metodu buvo panaudota 5 ng/μl koncentracijos DNR. PGR mišinys, kurio sudėtis pateikta 4-oje lentelėje, buvo ruošiamas prieš pat amplifikaciją.

Amplifikacija buvo vykdoma Mastercycler Pro (Eppendorf, Vokietija) termocikleryje. Pradinė DNR denatūracija truko 5 min. +80 °C temperatūroje. Vėliau vyko 35 ciklai, kurių kiekvienas sudarytas iš denatūracijos (30 s, 94 °C), pradmenų prisijungimo (30 s, 56 °C) ir DNR sintezės (1 min., 72 °C). Baigiamasis DNR sintezės etapas vyko 10 min. esant +72 °C temperatūrai.

4 lentelė. *trnH-psbA* ir *ITS* regionų sekų pagausinimo PGR mišinio sudėtis

Reagentas	Kiekis
10× <i>Taq</i> (NH ₄) ₂ SO ₄ buferis	5 μl
dNTP (2 mM)	5 μl
MgCl ₂ (25 mM)	6 μl
Pradmenys (tiesioginis ir atvirkštinis) (1 OV)	2 μl + 2 μl
<i>Taq</i> DNR polimerazė (5 U/μl)	0,25 μl
DNR (5 ng/μl)	2 μl
Dejonizuotas H ₂ O (~ 18,3Ω)	27,8 μl

Taip pat buvo pasirinktas ir vienas *18S-5.8S-26S* ribosominės DNR *ITS* regionas (*ITS1 – ITS2*), kurio dydis yra apie 870 bp. Šio regiono pagausinimui buvo naudoti pradmenys *ITS1* (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') ir *ITS4* (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). PGR mišinys, kurio sudėtis pateikta 4-oje lentelėje, buvo ruošiamas prieš pat amplifikaciją. Amplifikacija buvo vykdoma Mastercycler Pro (Eppendorf, Vokietija) termocikleryje. Pradinė DNR denatūracija buvo vykdoma 4 min. +94 °C temperatūroje. Vėliau vyko 35 ciklai, kurių kiekvienas sudarytas iš denatūracijos (45 s, 94 °C), pradmenų prisijungimo (45 s, 55 °C), DNR sintezės (1 min., 72 °C). Baigiamasis DNR sintezės etapas vyko 10 min. esant +72 °C temperatūrai.

2.9. ISSR-PGR produktų frakcionavimas agarozės gelyje

ISSR-PGR produktai buvo frakcionuojami 1,2 % agarozės gelyje (5 lentelė) 10× TBE buferiniame tirpale.

5 lentelė. Agarozės gelio (1,2 %) mišinio sudėtis

Reagentas	Kiekis
10× TBE buferis	20 ml
Agarozė	2,4 g
Etidžio bromidas (5 mg/ml)	20 µl
Distiliuotas vanduo	iki 200 ml

Prieš elektroforezę kiekvieno pavyzdžio PGR produktai buvo sumaišomi su 0,20 tūrio 5× bromfenolio mėlio tirpalu. Elektroforezė buvo atliekama horizontalioje elektroforezės kameroje MS Maxi (Cleaver Scientific Ltd, Jungtinė Karalystė), naudojant srovės šaltinį Power Supply EPS 601 (Amersham Pharmacia Biotech Inc., JAV). PGR produktų frakcionavimas buvo vykdomas 4 val. esant 4 V/cm. Jų ilgiui nustatyti buvo naudojamas GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific Baltics, Vilnius, Lietuva) DNR fragmentų dydžio standartas. Elektroforezės rezultatų registravimui ir analizei

buvo naudojama gelių dokumentavimo BioDocAnalyze (Biometra, Vokietija) sistema.

2.10. Pagausintų cpDNR ir rDNR sekų klonavimas

Pagausinti cpDNR ir rDNR regionų fragmentai buvo analizuojami 1 % agarozės (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Karlsbadas, JAV) gelyje 1× TAE buferiniame tirpale. Gautų fragmentų dydžiams nustatyti buvo panaudotas DNR fragmentų dydžio standartas (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Thermo Fisher Scientific Baltics, Vilnius, Lietuva). DNR fragmentai buvo išpjaujami iš gelio ir valomi naudojant DNR skyrimo iš gelio rinkinį „GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific Baltics, Vilnius, Lietuva) pagal gamintojo pateiktą protokolą. Naudojant rinkinį InsTAclone PCR Cloning Kit iš gelio išskirti ir išvalyti DNR fragmentai, buvo klonuoti į pTZ57R/T vektorių (Thermo Fisher Scientific Baltics, Vilnius, Lietuva).

2.11. *Escherichia coli* transformacija ir transformantų analizė

Imliosioms *Escherichia coli* ląstelėms gauti buvo panaudotas rinkinys „TransformAid™ Bacterial Transformation Kit“ (Thermo Fisher Scientific Baltics, Vilnius, Lietuva). Buvo panaudotas *E. coli* JM107 (genotipas F' *traD36 lacI^q Δ(lacZ)M15 proA⁺B⁺/e14⁻(McrA⁻) Δ(lac-proAB) thi gyrA96 (Nal^r) endA1 hsdR17 (r_K⁻ m_K⁺) relA1 glnV44*) kamienas (Thermo Fisher Scientific Baltics, Vilnius, Lietuva). Gautos imliosios bakterijos ląstelės buvo transformuojamos pTZ57R/T vektoriumi su klonuotais cpDNR ar rDNR regionų fragmentais naudojant rinkinį „InsTAclone PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific Baltics, Vilnius, Lietuva) pagal gamintojo pateiktas rekomendacijas. Transformuotų kolonijų atranka buvo atliekama Petri lėkštelėse ant agarizuotos LB terpės (Agar, Miller, Fluka, Switzerland) su ampicilinu (50 mg/ml), X-Gal ir IPTG. Transformacijos mišinys ant pašildytų +37 °C Petri lėkštelių išsėjamas steriliomis sąlygomis laminariniame bokse

SAFE 2020 (Thermo Fisher Scientific, Vilmingtonas, JAV). Petri lėkštelės su transformuotomis *E. coli* ląstelėmis buvo inkubuojamos apie 15 val. +37 °C temperatūroje „Memmert IN 55“ termostate. Išaugusios baltos *E. coli* 3-6 kolonijos buvo persėjamos ant agarizuotos terpės, turinčios 50 mg/ml ampicilino.

Plazmidinės DNR išskyrimui iš *E. coli* klonų, turinčių rekombinantines plazmides, buvo panaudotas rinkinys „GeneJET Plasmid Miniprep Kit“ (Thermo Fisher Scientific Baltics, Vilnius, Lietuva). *E. coli* klonas, turintis rekombinantinę plazmidę, buvo sėjamas į 5 ml LB-Broth terpę su 50 mg/ml ampicilino. Ląstelės 14-16 val. buvo auginamos INFORS HT Ecotron (Infors Ag, Botminenas, Šveicarija) purtyklėje (esant +37 °C ir 200 rpm/min.). Užaugusi *E. coli* ląstelių kultūra buvo centrifuguojama Hettich Universal 320 R (Merck, Darmstadtas, Vokietija) centrifugoje 2 min. (esant +4 °C ir 4000 rpm/min.). Plazmidinė DNR buvo skiriama pagal DNR skyrimo rinkinio gamintojų pateiktą protokolą. Išskirtos plazmidinės DNR koncentracija buvo nustatoma bekiuvečiu spektrofotometru ND-2000. Norint gauti patikimus klonuoto DNR fragmento sekoskaitos rezultatus, buvo atliekama *E. coli* 2-jų arba 3-jų klonų plazmidinės DNR fragmentų sekoskaita.

2.12. Klonuotų DNR fragmentų sekoskaita

Klonuotų cpDNR ir rDNR fragmentų sekoskaita buvo atlikta BaseClear (Nyderlandai) sekvenavimo centre Sanger'io sekoskaitos metodu naudojant ABI3730XL sekvenatorių. Buvo panaudoti du pradmenys: M13/pUC (-46), 22-mer 10 pmol/μL 5'-d(GCCAGGGTTTTCCCAGTCACGA)-3' ir atvirkštinis sekoskaitos pradmuo – M13/pUC (-46), 24-mer 5'-d(GAGCGGATAACAATTTTCACACAGG)-3'.

Gautos sekos buvo apkarpytos ir analizuojamos naudojant „Sequencer 5.4.1“ (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, JAV) kompiuterinę programą. Sekų palyginimas ir filogenetinė analizė atlikta naudojant „MEGA 7.0.26“ (Kumar ir kt., 2016) programą.

Nustatytos cpDNR ir rDNR fragmentų sekos buvo palygintos su tarptautinėse duomenų bazėse esančiomis sekomis. Sekų paieška NCBI duomenų bazėje buvo atlikta naudojant BLASTN v2.2.29 paieškos įrankį.

2.13. Statistinė duomenų analizė

Visų tirtų *Batrachium* pavyzdžių DNR amplifikacija buvo pakartojama 2-3 kartus. Buvo palyginami gauti ISSR spektrai ir toliau analizuojami tik aiškūs, atsikartojantys DNR fragmentai ir jų profiliai. DNR fragmento buvimas / nebuvimas tiriamuose pavyzdžiuose buvo įvertinamas atitinkamai „1“ arba „0“. Gauti duomenys buvo suvedami į lentelę. Genotipavimo paklaida buvo įvertinta atsižvelgiant į Bonin ir kt. (2004) rekomendacijas.

Naudojant POPGENE programą buvo apskaičiuota polimorfinių lokusų skaičius, polimorfinių lokusų nuošimtis, Shanon'o indeksas. PCoA atlikta naudojant GenAlEx v. 6.5 programą (Peakall, Smouse, 2012). *Batrachium* genties augalų populiacijų, įsikūrusių skirtingose upėse, genetinei diferenciacijai palyginti, remiantis ISSR analizės duomenimis, buvo naudojama AFLP-SURV v. 1.0 kompiuterinė programa (Vekemans ir kt., 2002): buvo apskaičiuotas tikėtinas heterozigotiškumas (H_j) ir genetinė diferenciacija (F_{ST}) tarp populiacijų (Lynch, Milligan 1994). F_{ST} testui buvo naudota 1000 permutacijų. Alelių gausumas lokuse (angl. *band richness* – Br), polimorfinių lokusų proporcija (PLP, 5 % lygmenyje) standartizuotam imties dydžiui (8 individai populiacijoje) buvo apskaičiuoti pagal Petit ir kt. (1998) naudojant AFLPdiv v. 1.1 programą (Coart ir kt., 2005). ISSR polimorfizmo pasiskirstymo populiacijose ir tarp populiacijų dėsningumai nustatyti AMOVA metodu naudojant GenAlEx 6.5 programą (Peakall, Smouse, 2012).

Norint nustatyti labiausiai tikėtiną *Batrachium* genetiškai skirtingų augalų grupių skaičių ir įvertinti, ar populiacijų grupavimasis į klasterius atitinka individų rūšinį pasiskirstymą, buvo naudotas Bayeso grupavimosi algoritmas ir STRUCTURE v. 2.3.4 programa (Pritchard ir kt., 2000). Atliekant skaičiavimus, daryta prielaida, kad galimų grupių skaičius gali būti nuo 1 iki

20 ($K = 1-20$), kiekvienos grupės tikimybę skaičiuojant 10 kartų. Skaičiavimai atlikti pradžioje kartojant 500 000 kartų ir baigiant 1 000 000 MCMC (Markov Chain Monte Carlo) pakartojimų. Labiausiai tikėtina K reikšmė (Delta K) buvo nustatyta pagal Evanno ir kt. (2005). Rezultatai buvo pavaizduoti naudojant DISTRUCT v 1.1 programą (Rosenberg, 2004).

Devyniasdešimt aštuoni fitocenologiniai aprašymai su *Batrachium* rūšimis buvo suvesti į TURBOVEG duomenų bazę. Augalijos klasifikacija iki asociacijų lygmens buvo atlikta naudojant JUICE 5.1 programą (Tichy, 2002).

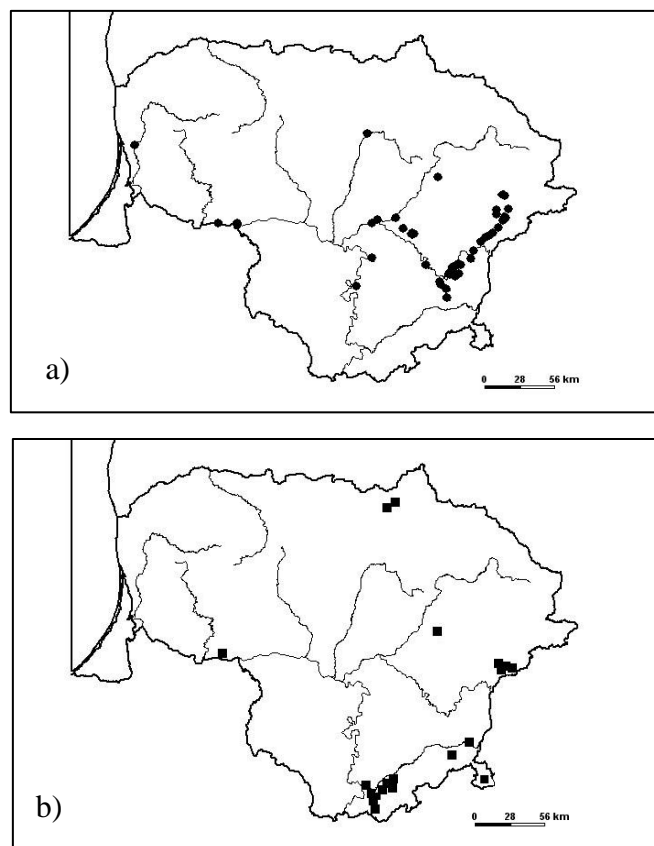
PAST v 2.17 programa (Hammer ir kt., 2001) buvo panaudota atlikti Shapiro-Wilk W normalumo testą. Duomenys nebuvo pasiskirstę pagal normalųjį skirstinį, todėl buvo naudojami neparametriniai statistiniai metodai. NMDS (Non-metric Multidimensional Scaling) analizė ir neparametrinė MANOVA buvo panaudota patikrinti, ar išskirtos grupės skiriasi statistiškai reikšmingai. Gower atstumo matas buvo naudotas atliekant abi analizes. Norint išsiaiškinti, ar yra statistiškai reikšmingi skirtumai tarp dviejų palyginamų grupių morfologinių požymių, buvo panaudota STATISTICA v. 12.0 programa (StatSoft, 2014) ir atliktas porinis Mann-Whitney U testas.

III. REZULTATAI

3.1. Vilniaus universiteto ir Gamtos tyrimo centro Botanikos instituto herbariumų *Batrachium* pavyzdžių peržiūra

Buvo atlikta Vilniaus universiteto ir Gamtos tyrimų centro Botanikos instituto herbariumuose (atitinkamai WI ir BILAS) esančių upinių *Batrachium* genties rūšių pavyzdžių analizė. Iš viso buvo peržiūrėta 119 Botanikos instituto herbariume esančių pavyzdžių, surinktų 1933–2009 metais ir 11 Vilniaus universiteto herbariumo pavyzdžių, surinktų 1921–1993 metais.

21-ame paveiksle pateiktuose žemėlapiuose matyti, kad didžioji dalis herbariumuose esančių *Batrachium fluitans* pavyzdžių buvo surinkti pietrytinėje šalies dalyje esančiose upėse, tik keletas pavyzdžių – kitose šalies upėse (21 pav. a).



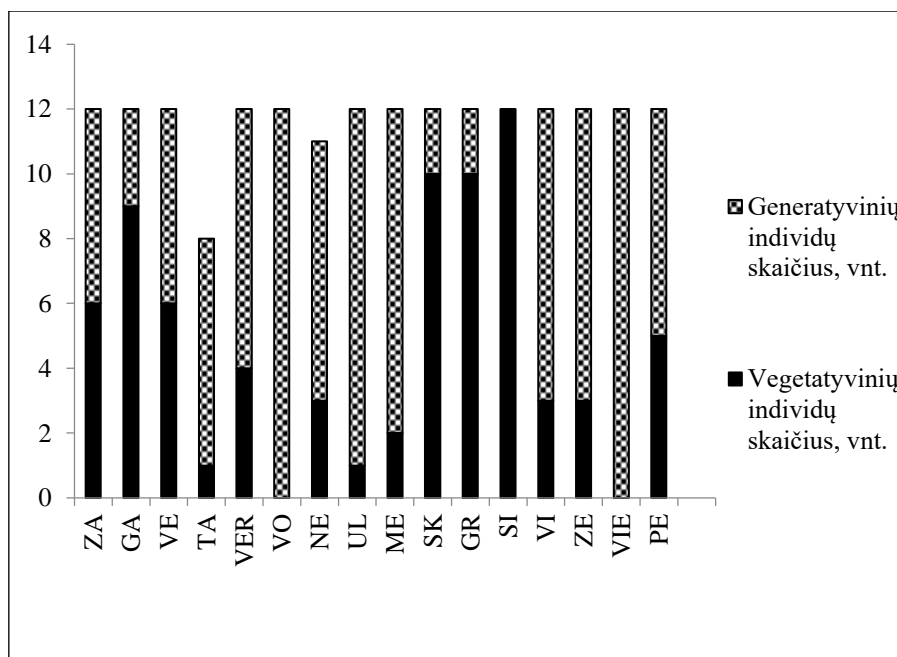
21 pav. *Batrachium* genties upinių rūšių paplitimas, nustatytas remiantis BILAS ir WI esančiais pavyzdžiais: a) *B. fluitans*; b) *B. penicillatum* s.l.

Batrachium penicillatum s.l. pavyzdžiai buvo surinkti taip pat pietinės ir rytinės Lietuvos upėse, tik keletas pavyzdžių šiaurės Lietuvoje Tatulos ir vakarų Lietuvoje Viešvilės upėse (21 pav. b). Lėtai tekančiuose vandenyse – ištiesintose upių vagose, grioviuose, paplitę *B. trichophyllum* augalai.

Remiantis herbariumo pavyzdžių analize peržiūrėtos 56-ios vietos, tačiau *Batrachium* rasta tik 16-oje, kurios ir buvo pasirinktos tyrimams.

3.2. *Batrachium* surinktų pavyzdžių morfologiniai tyrimai

Šio tyrimo metu buvo išanalizuoti *Batrachium* genties 185-ių individų morfologiniai požymiai. Kadangi ne visi augalai turėjo generatyvinius organus, todėl kiekvienoje populiacijoje generatyviniai ir vegetatyviniai individai buvo suskirstyti į atskiras grupes (22 pav.).

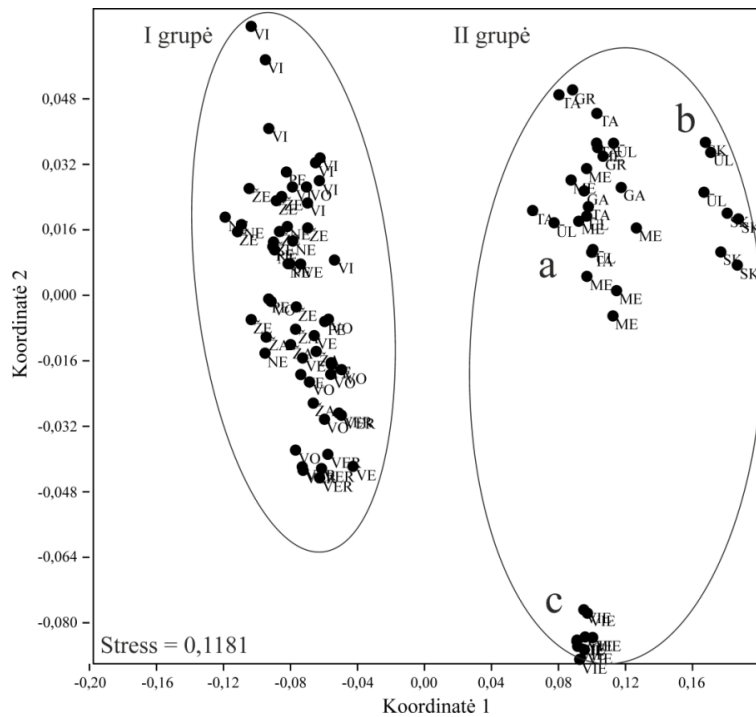


22 pav. *Batrachium* genties vegetatyvinių ir generatyvinių individų skaičiaus santykis tirtose populiacijose (ZA – Žalesa, GA – Gauja, VE – Veržuva, TA – Tatula, VER – Verknė, VO – Vokė, NE – Neris, UL – Ūla, ME – Merkys, SK – Skroblus, GR – Grūda, SI – Širvinta, VI – Vilnia, ZE – Žeimena, VIE – Viešvilė, PE – Peršokšna)

Penkių populiacijų (Tatulos, Ūlos, Grūdos ir Viešvilės) 41 generatyvinis individas turėjo pilnai išsivysčiusius vaisius, kitų populiacijų – žiedus arba ir žiedus, ir „mumifikuotus“ vaisius.

NMDS analizė taip pat parodė, kad visi *Batrachium* individai pagal jų morfologinius požymius susiskirsto į dvi pagrindines grupes (23 pav.).

Pirmąją grupę (I) sudarė devynių populiacijų (NE, PE, SI, VE, VER, VI, VO, ZA ir ZE) homofiliniai augalai, kurie buvo apibūdinti kaip *B. fluitans*, antrąją grupę (II) – septynių populiacijų (GA, GR, ME, SK, TA, UL ir VIE) augalai, kurie buvo identifikuoti kaip *B. penicillatum* s.l. ir galimai *B. trichophyllum*.



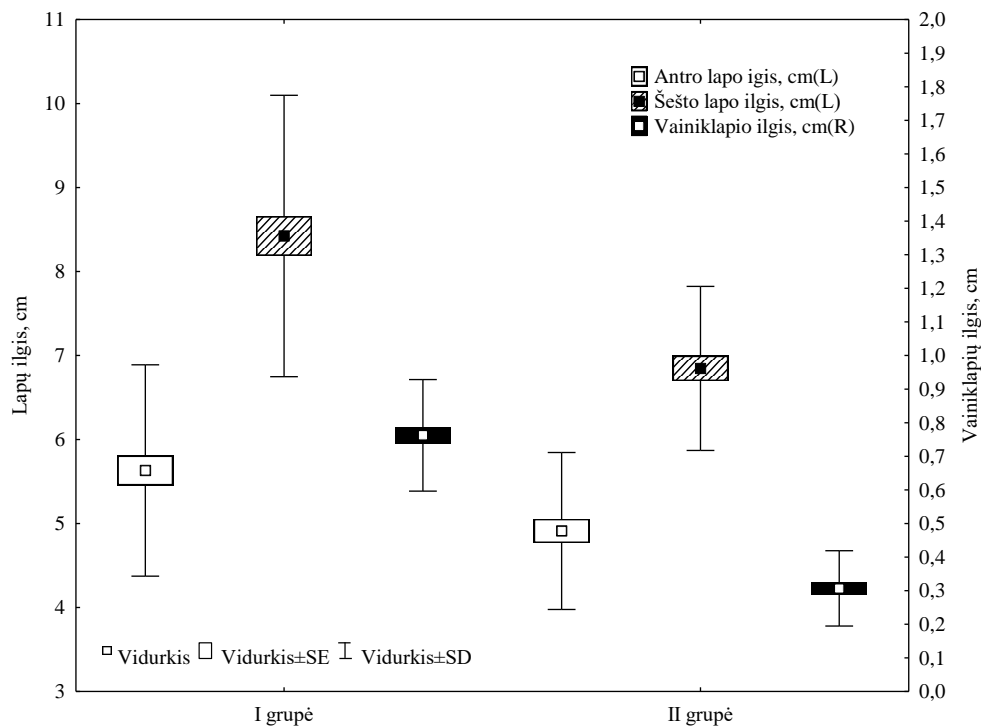
23 pav. *Batrachium* augalų morfologinių požymių NMDS analizė. Dvi pagrindinės grupės (I ir II) apvestos apskritimais

I grupės augalams buvo būdingi pliki ar su pavieniais plaukeliais žiedsosčiai, 5-8 vainiklapiai, kurių ilgis buvo nuo 0,4 cm iki 1,1 cm (6 lentelė, 24 pav., 25 pav.). II grupei priskirtiems augalams buvo būdingas tankiai plaukuotas žiedsostis, 5 vainiklapiai, kurių ilgis svyravo nuo 0,2 cm iki 0,5 cm (24 pav., 25 pav.). Mann-Whitney *U* testas parodė statistiškai reikšmingus skirtumus ($U = 21,50$; $p < 0,001$) tarp šių dviejų grupių augalų vainiklapių ilgių (24 pav.).

6 lentelė. *Batrachium* genties individų pagrindiniai morfologiniai požymiai

Požymis	I grupė	II grupė
Žiedsosčio plaukuotumas	Plikas ar su pavieniais plaukeliais	Gausiai plaukuotas
Vainiklapių skaičius	5-8 (dažniausiai 6)	5
Vainiklapių ilgis	0,4-1,1 cm	0,2-0,5 cm
Žiedo skersmuo	> 1 cm	< 1 cm
Lapo ilgis iš antro bamblio	4,0-9,0 cm	3,0-7,0 cm
Lapo ilgis iš šešto bamblio	6,0-12,0 cm	5,0-8,0
Kiek kartų skeltas lapas	4-5 kartus	>5 kartus
Bendras augalo plaukuotumas	Augalai pliki	Kai kurie augalai nežymiai plaukuoti (ypač galinės lapų skiltys ir prielapiai)
Rūšis	<i>B. fluitans</i>	<i>B. penicillatum</i> s.l. <i>B. trichophyllum</i>

Palyginus šių grupių augalų antrojo ir šeštojo lapų ilgius, taip pat buvo nustatyti reikšmingi skirtumai (atitinkamai $U = 273,0$, $p < 0,001$ ir $U = 201,0$, $p < 0,001$) (24 pav.).



24 pav. *B. fluitans* (I grupė), *B. penicillatum* s.l. ir *B. trichophyllum* (II grupė) augalų antrojo, šeštojo lapų ilgiai (Mann-Whitney U testas: atitinkamai $U = 273,0$; $p < 0,001$ ir $U = 201,0$; $p < 0,001$) ir vainiklapio ilgis (Mann-Whitney U testas: $U = 21,50$; $p < 0,001$)

I grupei priskirtų augalų antrojo kapiliarinio lapo ilgis buvo nuo 4 cm iki 9 cm, šeštojo – nuo 6 cm iki 12 cm, II grupės augalų – atitinkamai nuo 3 cm iki 7 cm ir nuo 5 cm iki 8 cm (24 pav.). Morfologinių požymių statistinė analizė parodė, kad ne visi požymiai buvo vienodai svarbūs *Batrachium* rūšių identifikavimui.



25 pav. *B. fluitans* (I grupė) (a), *B. penicillatum* s.l. ir *B. trichophyllum* (II grupė) (b) augalų žiedsosčio plaukuotumas

Kadangi II grupės augalai morfologiškai buvo labai heterogeniški, tai jie ir buvo sugrupuoti į tris mažesnius pogrupius (23 pav. a, b ir c). Didžiausias **a** pogrupis apjungė šešių populiacijų (GA, GR, ME, TA, UL, VIE) homofilinius augalus. Į **b** pogrupį pateko heterofiliniai augalai iš UL ir SK populiacijų, į mažiausią **c** – homofiliniai augalai iš VIE populiacijos. Atlikta neparimetrė MANOVA parodė statistiškai reikšmingą ($p < 0,05$) šių trijų pogrupių atsiskyrimą. Būtina pastebėti, kad tik vienas požymis – tarpiniai lapai – atskyrė **a** ir **b** pogrupių augalus. Spėjama, kad augalai su tarpiniais lapais gali būti *B. penicillatum* s.str. Augalai iš **c** pogrupio skyrėsi nuo minėtų dviejų pogrupių tik prielapių plaukuotumu. Padidėjęs prielapių ir bendras augalo plaukuotumas leistų manyti, kad Viešvilės upėje yra paplitusi *B. trichophyllum* rūšis.

3.3. Bendrijų su *Batrachium* rūšimis tyrimai

Tirtose upėse aprašytos bendrijos su *Batrachium* rūšimis buvo priskirtos klasei *Potamogetonetea* Klika in Klika, Novak 1941, eilei *Callitricho*

hamulatae-Ranunculetalia aquatilis Passarge ex Theurillat ir kt. 2015, sąjungai *Batrachion fluitantis* Neuhausl 1959 (Mucina ir kt., 2016).

Daugiausiai (85) fitocenotiniai aprašymai buvo priskirti *Ranunculetum fluitantis* (Allorge 1922) Koch 1926 asociacijai (7 lentelė).

7 lentelė. Bendrijų su *B. fluitans* ir *B. pseudofluitans* rūšių įvairovė, jų pastovumas (%) ir gausumas (pagal Braun-Blanquet)

Bendrijos	<i>Ranunculetum fluitantis</i>	<i>Ranunculetum pseudofluitantis</i>
Aprašymų skaičius	85	12
Bendras rūšių skaičius	26	17
Charakteringos rūšys:		
<i>Batrachium fluitans</i>	100 (3-5)	
<i>Batrachium pseudofluitans</i>		100 (2-3)
Ch. Batrachion fluitantis		
<i>Sparganium erectum*</i>	11	58 (1-3)
<i>Schoenoplectus lacustris*</i>	2	50 (1-3)
<i>Agrostis stolonifera*</i>	6	33 (+-1)
<i>Stuckenia pectinata*</i>	37 (1-3)	8
<i>Berula erecta*</i>	7	17
<i>Veronica anagallis-aquatica*</i>	9	17
<i>Callitriche cophocarpa*</i>	4	8
<i>Sagittaria sagittifolia*</i>	13	
<i>Butomus umbellatus*</i>	7	
<i>Sparganium emersum*</i>	7	
<i>Glyceria fluitans*</i>		25
<i>Hippuris vulgaris*</i>		17
<i>Myosotis scorpioides*</i>		8
Ch. Potamogetonion		
<i>Potamogeton × nitens</i>	1	42 (+-2)
<i>Elodea canadensis</i>	19	
<i>Potamogeton crispus</i>	15	
<i>Myriophyllum spicatum</i>	9	
<i>Potamogeton perfoliatus</i>	11	
<i>Potamogeton lucens</i>	5	
<i>Potamogeton × nerviger</i>	2	
Ch. Lemnetea		
<i>Lemna trisulca</i>	21 (+-2)	25 (+-1)
<i>Lemna minor</i>	8	
<i>Spirodela polyrhiza</i>	5	
Lydinčios rūšys		
<i>Cladophora sp.</i>	14	33 (1-2)
<i>Fontinalis antipyretica</i>	27 (+-2)	17
<i>Ranunculus lingua</i>	1	
<i>Rorippa amphibia</i>	2	
<i>Rumex aquaticus</i>		8
<i>Sium latifolium</i>		8

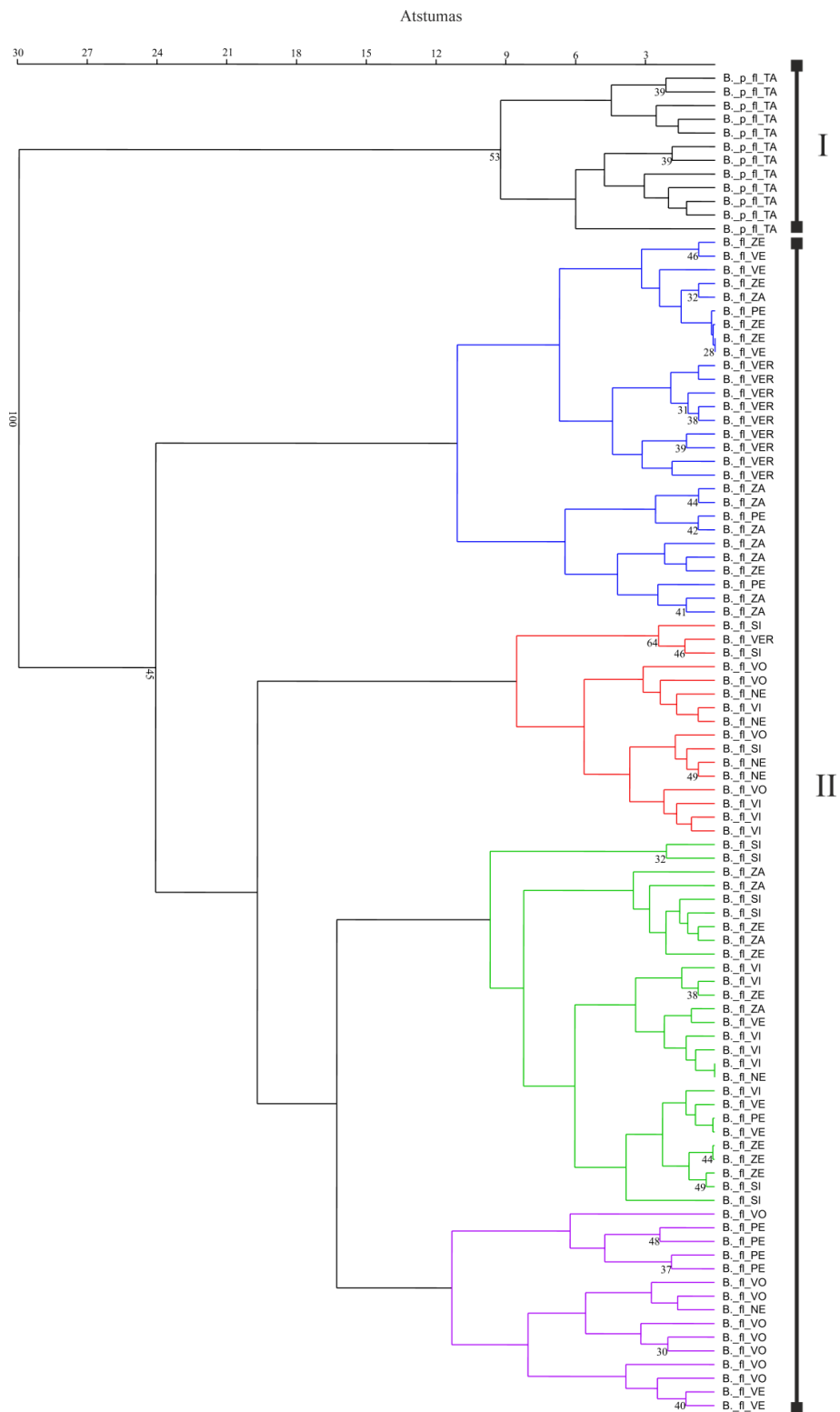
* vandeninės formos

Batrachium fluitans padengimas aprašymo laukeliuose kito nuo 40 % iki 95 %. Iš viso, kartu su *B. fluitans*, buvo inventorizuotos 26 kitų makrofitų rūšys, kurių skaičius aprašymo laukelyje svyravo nuo 1 iki 8, jų pastovumas buvo santykinai mažas. Pastoviausios asociacijos rūšys, kaip *Stuckenia pectinata* f. *interrupta*, *Fontinalis antipyretica* ir *Lemna trisulca*, buvo priskirtos tik II-ajai, o likusios – tik I-ajai pastovumo klasei.

Klasterinės analizės rezultatai parodė, kad išsiskiria keturios pagrindinės *Ranunculetum fluitantis* (II klasteris) grupės, kurios gali būti laikomos šios asociacijos variantais (26 pav.).

Mėlyna spalva pažymėtas klasteris sugrupuoja bendrijų aprašus, kuriuose buvo aptiktos tokios augalų rūšys kaip *Elodea canadensis*, *Stuckenia pectinata* ir *Sparganium erectum*, į raudoną klasterį patenka aprašai su vandens samana *Fontinalis antipyretica*, į žalią – su *Potamogeton crispus* ir *Cladophora* sp., o į purpurinį – su *Callitriche cophocarpa*.

Bendrija su vyraujančia *Batrachium pseudofluitans* (12 fitocenotinių aprašymų) rūšimi, tik preliminariai buvo pavadinta *Ranunculetum pseudofluitantis*, nes šių bendrijų nebuvo galima priskirti kitoms asociacijoms, . Pagal rūšių sudėtį kitose šalyse aprašytos bendrijos su šia rūšimi skiriasi nuo mūsų aprašytų. Mūsų aprašyta bendrija pasižymi santykinai dideliu pastovumu (II-III klasės) ir srovėje augančiomis helofitų formomis (*Agrostis stolonifera*, *Glyceria fluitans*, *Sparganium erectum*, *Schoenoplectus lacustris*), kurios yra būdingos sąjungai *Batrachion fluitantis* (7 lentelė).



26 pav. Bendrijų su *B. fluitans* ir *B. pseudofluitans* klasterinė analizė (panaudotas *Ward's* atstumas ir *Neighbour* jungimo metodas). Įkėlų vertės (%) gautos atlikus 1000 iteracijų

Kitos šiai sąjungai būdingos augalų rūšys (*Berula erecta*, *Veronica anagallis-aquatica* ir *Callitriche cophocarpa*) neviršijo I klasės pastovumo. *Potamogeton* × *nitens* buvo viena rūšis, būdinga *Potamogetonion* sąjungai. Pastaroji rūšis buvo priskirta III pastovumo klasei. Pastovi šarminiams vandenims būdinga rūšis *Hippuris vulgaris* atskyrė bendrijas su *Ranunculetum pseudofluitantis* nuo bendrijų su *Ranunculetum fluitantis*. Tačiau reikia paminėti, kad ši rūšis buvo aptikta nedidelėje aprašų dalyje (7 lentelė). Iš viso šiai asociacijai priskirtose bendrijose buvo inventorizuota 17 makrofitų rūšių, kurių skaičius tyrimo laukelyje yra nuo 2 iki 5. Klasterinė analizė parodė, kad išsiskiria du šių bendrijų variantai (26 pav.). Vienas *Ranunculetum pseudofluitantis* bendrijų variantas buvo išskirtas dėl vyravusių virš vandens iškilusių *Sparganium erectum* ir *Berula erecta* formų. Ši bendrija buvo aptikta upių atkarpose, su santykinai lėta srove ir priemolio nuosėdomis padengtu dugnu. Antrasis variantas buvo išskirtas dėl vyraujančių *Schoenoplectus lacustris* ir *Potamogeton* × *nitens* povandeninių formų. Šios bendrijos paplitusios upių atkarpose, kuriose greitesnė srovė ir kietas, žvirgždėtas dugnas.

Bendrijos aprašytos tik vienoje Tautos upėje (šiaurinė Lietuvos dalis), tačiau gali būti paplitusios kiek plačiau panašiose ekologinėse sąlygose.

Pagal rūšių sudėtį bendrijos su *Batrachium pseudofluitans* skiriasi nuo *Ranunculetum fluitantis* bendrijų tik didesne *Potamogetonion* sąjungos rūšių įvairove, tačiau pastarųjų pastovumas, kaip ir kitų diferencinių rūšių iš *Batrachion* sąjungos ar *Lemnetea* klasės, dažniausiai neviršijo I-sios pastovumo klasės ribų.

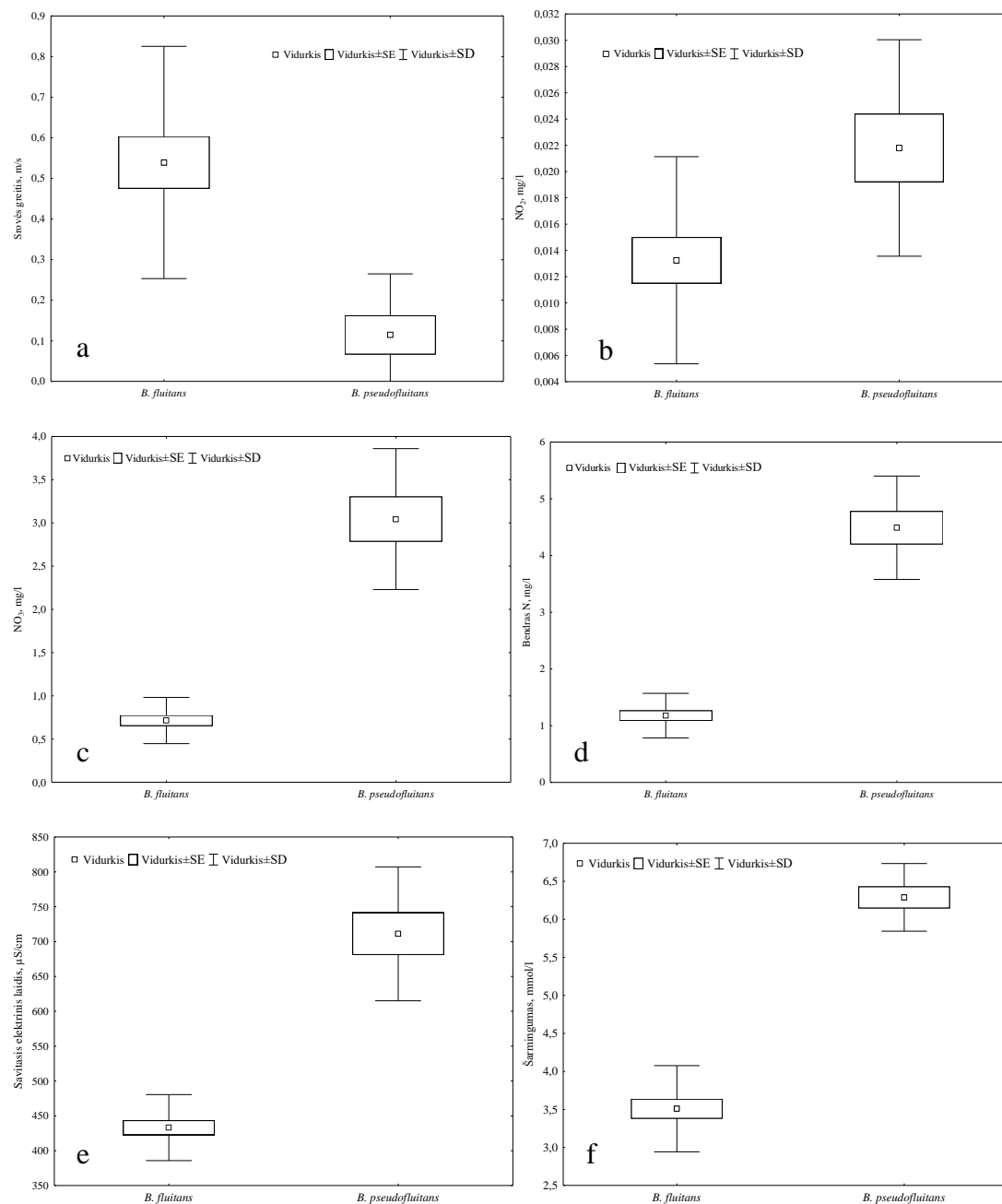
Bendrija su *Ranunculetum pseudofluitantis* buvo aprašyta Tautos upėje, esančioje gipso karsto regione. Šioje upėje vyrauja mišrus molio / žvirgždo sluoksniu padengtas dugnas, kartais su įvairaus dydžio rieduliais.

Ranunculetum fluitantis bendrijos buvo aptinkamos didelėse, vidutinėse ir mažose Neris baseino upėse, kurių atkarpose dugnas dažniausiai buvo padengtas mišriu smėlio / žvirgždo sluoksniu, kartais su įvairaus dydžio rieduliais (8 lentelė).

8 lentelė. Upių atkarpų, kuriose aprašytos bendrijos su *B. fluitans* ir *B. pseudofluitans*, vandens fizikiniai ir hidrocheminiai rodikliai

	<i>B. fluitans</i> n=20	<i>B. pseudofluitans</i> n=10
Srovės greitis, m/s	0,54 ± 0,06	0,11 ± 0,04
Savitasis elektrinis laidis, μS/cm	433,21 ± 10,58	711,20 ± 30,36
Šarmingumas, mmol/l	3,50 ± 0,126	6,28 ± 0,14
pH	8,1 ± 0,138	7,8 ± 0,098
Ca ²⁺ , mg/l	31,39 ± 7,266	157,58 ± 24,20
NH ₄ ⁺ , mg/l	0,07 ± 0,01	0,05 ± 0,01
NO ₂ ⁻ , mg/l	0,01 ± 0,001	0,02 ± 0,002
NO ₃ ⁻ , mg/l	0,71 ± 0,05	3,04 ± 0,25
PO ₄ ³⁻ , mg/l	0,04 ± 0,006	0,06 ± 0,01
Bendras N mg/l	1,18 ± 0,08	4,49 ± 0,28
Bendras P, mg/l	0,08 ± 0,006	0,08 ± 0,01
Gylis, m	0,64 ± 0,05	0,61 ± 0,09
Substratas	smėlis/žvirgždas (rieduliai)	molis/žvirgždas (rieduliai)

Abiejų tipų bendrijos buvo aptinkamos panašiam gylyje, kuris vidutiniškai neviršijo 1 m. Iš 11-os analizuotų hidrocheminių rodiklių tik šešiams – srovės greičiui, bendram azoto kiekiui (bendras N), nitritams (NO₂⁻), nitratams (NO₃⁻), savitajam elektriniam laidžiui ir šarmingumui (27 pav.) buvo nustatyti statistiškai reikšmingi skirtumai (Mann-Whitney *U* testas, $p < 0,05$) (8 lentelė). Srovės greitis upių atkarpose, kuriose aptiktos bendrijos su *B. fluitans*, buvo žymiai didesnis palyginti su atkarpomis, kuriose įsikūrę bendrijos su *B. pseudofluitans* (8 lentelė, 27 pav. a).

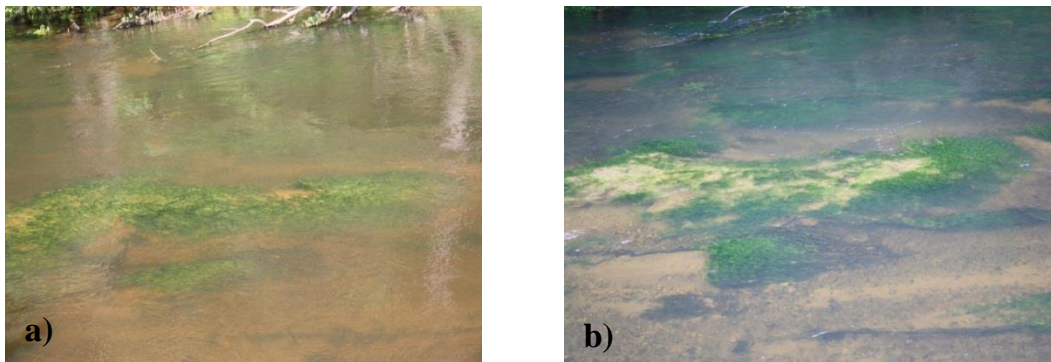


27 pav. Upių atkarpų, kuriose įsikūrę bendrijos su *B. fluitans* ir *B. pseudofluitans* rūšimis, fizikinių ir hidrocheminių rodiklių palyginimas

Tatulos upės atkarpose, kuriose vyraavo bendrijos su *B. pseudofluitans*, buvo nustatytas didesnis savitasis elektrinis laidis, šarmingumas, didesnės nitritų (NO_2^-), nitratų (NO_3^-) ir bendro azoto (N) koncentracijos, palyginti su atkarpomis, kuriose buvo bendrijos su *B. fluitans* (8 lentelė, 27 pav. b, c, d, e, f). Bendro fosforo (P) koncentracija upių vandenyje, kuriame paplitusios bendrijos su viena ar kita rūšimi, buvo panaši (8 lentelė).

3.4. Vandens turizmo poveikis *Batrachium* genties augalams ir jų bendrijoms

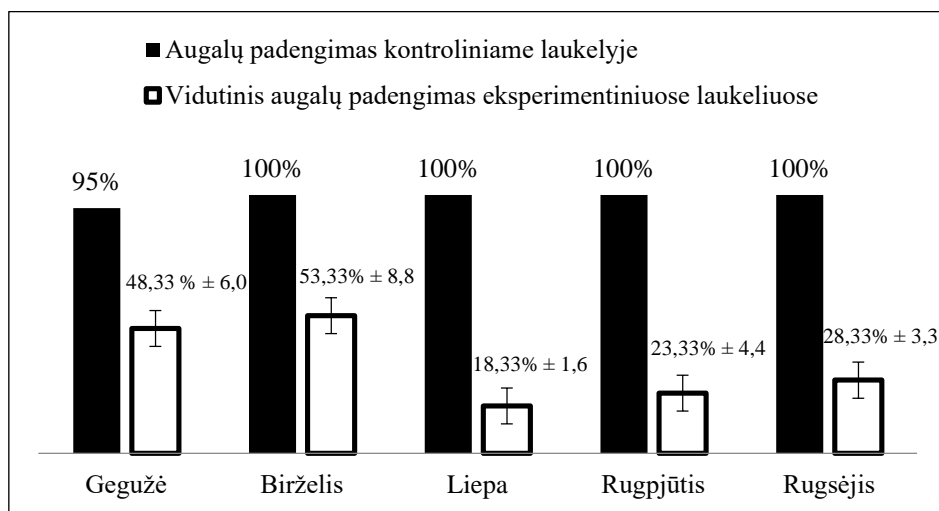
Vertinant vandens turizmo poveikį *Batrachium* augalams buvo pastebėta, kad nei viename iš tiriamųjų laukelių *Batrachium* augalai nežydėjo ir nebuvo suformavę vaisių (28 pav.), o kontroliniame laukelyje birželio ir liepos mėnesiais kai kurie augalai buvo suformavę žiedus ir vaisius.



28 pav. *Batrachium* augalų tyrimo laukeliai: a) gegužės mėnesį; b) liepos mėnesį

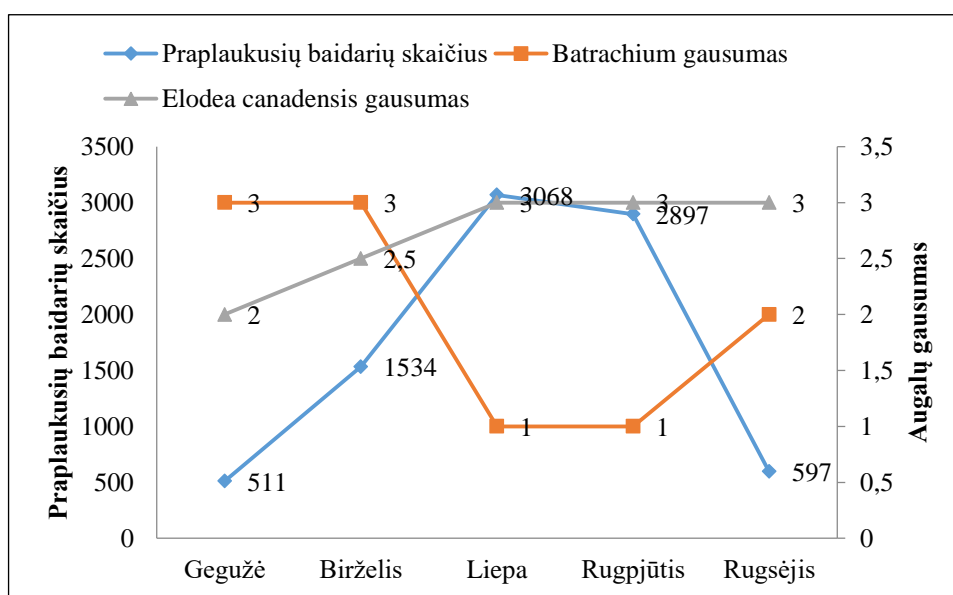
Bendras augalų padengimas kontroliniame laukelyje buvo mažiausias (95 %) gegužės mėnesį, vėliau, birželio-rugsėjo mėnesiais buvo pastovus ir siekė 100 % (29 pav.). *Batrachium* augalų gausumas (kiekvieną tyrimo mėnesį) buvo įvertintas 4 balais. Kartu su *Batrachium* augo *Stuckenia pectinata*, *Potamogeton perfoliatus* ir *P. crispus*.

Eksperimentiniuose laukeliuose kartu su *Batrachium* augo tokios rūšys kaip *S. pectinata*, *P. perfoliatus*, *P. crispus*, *Veronica anagalis-aquatica* ir *Elodea canadensis*. Bendras augalų padengimas juose buvo daug mažesnis palyginti su kontroliniame laukelyje nustatytu padengimu (29 pav.).



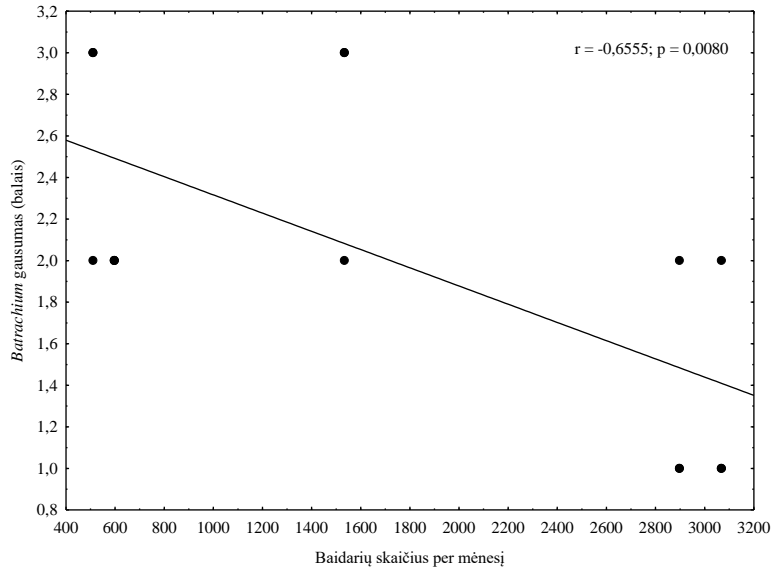
29 pav. Bendras augalų gausumas (% ± SE) tyrimo laukeliuose skirtingais tyrimo mėnesiais

Reikia pastebėti, kad bendras augalų padengimas laukeliuose ypač sumažėjo liepos mėnesį, būtent tuo metu, kai upėse yra didžiausi baidarių srautai (31 pav.). Sumažėjo ne tik bendras augalų padengimas laukelyje, bet ir *Batrachium* gausumas. Gegužės ir birželio mėnesiais vidutinis *Batrachium* gausumas buvo įvertintas 3 balais, o liepos mėnesį jis sumažėjo iki 1 balo (30 pav.). Tuo tarpu invazinės rūšies *E. canadensis* gausumas liepos ir rugpjūčio mėnesiais nemažėjo ir buvo įvertintas 3 balais (30 pav.).



30 pav. Praplaukusių baidarių skaičius ir *Batrachium* gausumas (pagal Braun-Blanquet skalę) skirtingais tyrimo mėnesiais

31-ame paveiksle matyti neigiama koreliacija tarp praplaukusių baidarių skaičiaus ir *Batrachium* augalų gausumo visuose tirtuose laukeliuose.



31 pav. Koreliacija tarp *Batrachium* gausumo (pagal Braun-Blanquet skalę) ir praplaukusių baidarių skaičiaus

3.5. *Batrachium* augalų tyrimai naudojant DNR žymenų metodus

Pirmajame darbo etape buvo atrinkti ISSR žymenų nustatymui tinkantys pradmenys. Iš viso buvo išbandyta 16 oligonukleotidinių pradmenų (ISSR-E; ISSR-O; ISSR-A; ISSR-D; ISSR-B; ISSR-C; ISSR-G; ISSR-F; ISSR-H; ISSR-18; ISSR-32; ISSR-34; ISSR-28; ISSR-29; ISSR-39a; ISSR-50a), iš kurių šeši buvo atrinkti tyrimui (9 lentelė).

9 lentelė. ISSR pradmenys, kurie buvo naudojami *Batrachium* augalų tyrimui ir identifikuotų lokusų skaičius

Pradmuo	Pradmens seka 5'→3'	DNR fragmentų dydis (bp)	DNR lokusų skaičius		Polimorfiniai lokusai, %
			polimorfiniai	monomorfiniai	
ISSR-28	(GT) ₆ CG	440-1500	16	3	84
ISSR-39a	(AGC) ₄ AC	340-1400	15	3	83
ISSR-34	(AGC) ₄ GG	510-1100	17	1	94
ISSR-50a	CCA(GCT) ₄	200-1500	7	10	41
ISSR-O	GAG(CAA) ₅	420-1400	6	6	50
ISSR-C	(AG) ₈ TG	410-1100	14	6	70
Suma			75	29	
Vidurkis ± SE			12,5±4,76	4,83±3,18	70±20,88

ISSR-PGR reakcijose su šiais pradmenimis buvo gaunami aiškūs ir pakartotiniuose reakcijose pastoviai matomi DNR fragmentai / DNR juostos, atitinkantys tam tikrus genomo lokusus. Su šiais pradmenimis buvo ištirta 16 *Batrachium* populiacijų esančių Lietuvos tekančiuose vandenyse.

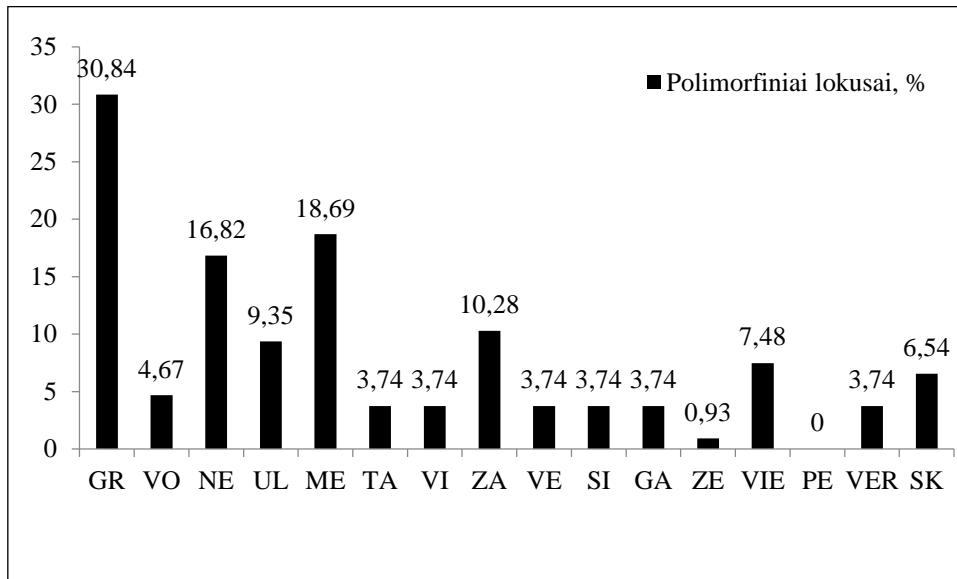
Buvo nustatyta, kad su atrinktais pradmenimis pagausintų DNR fragmentų, tinkamų tolesniems tyrimams, dydis svyruoja nuo 200 bp iki 1500 bp. Vidutiniškai su vienu pradmeniu nustatyti 12,5 polimorfinių ir 4,83 monomorfiniai lokusai. Didžiausias polimorfinių lokusų nuošimtis (94 %) buvo nustatytas su ISSR-34 pradmeniu, kiek mažesnis – su ISSR-39a ir ISSR-28 (atitinkamai 83 % ir 84 %), o mažiausias (41 %) – su ISSR-50a pradmeniu (9 lentelė).

3.5.1. *Batrachium* populiacijų genetinės sandaros tyrimai naudojant ISSR metodą

ISSR analizės rezultatai parodė, kad 15 populiacijų yra polimorfinės ir viena (Peršokšnos upės) – monomorfinė. Iš viso buvo nustatyti 106 aiškūs, patikimi DNR fragmentai (DNR žymenys), iš kurių 79,2 % buvo polimorfiniai ir 20,8 % – monomorfiniai.

Reikia pastebėti, kad nors didžioji dalis populiacijų yra polimorfinės, tačiau polimorfinių lokusų procentas nedidelis (32 pav.) ir vidutiniškai sudarė $8,0 \pm 2,57$ %.

Didžiausiu DNR polimorfizmu pasižymėjo trys populiacijos: Grūdos (30,84 %), Merkio (18,69 %) ir Neries (16,82 %) (33 pav.). Kiek mažesnis polimorfizmas buvo Žalesos, Ūlos, Viešvilės ir Skroblaus populiacijose (33 pav.). Vokės, Tatulos, Gaujos, Veržuvos, Širvintos, Vilnios, Verknės ir Žeimenos upėse esančioms *Batrachium* populiacijoms buvo būdingas mažiausias polimorfizmas (32 pav.).



32 pav. *Batrachium* populiacijų polimorfinių lokusų nuošimtis, nustatytas naudojant ISSR žymenis. GR – Grūda, VO – Vokė, NE – Neris, UL – Ūla, ME – Merkys, TA – Tatula, VI – Vilnia, ZA – Žalesa, VE – Veržuva, SI – Širvinta, GA – Gauja, ZE – Žeimena, VIE – Viešvilė, PE – Peršokšna, VER – Verknė, SK – Skroblus

Mažiausi polimorfinių populiacijų genetinės įvairovės rodikliai (h , H_j , Br , $PLP5$ % [8]) buvo nustatyti Žeimenos populiacijoje, didžiausi – Grūdų (10 lentelė). Didžiausia polimorfinių populiacijų genotipinė įvairovė (i) nustatyta Merkių ir Skroblaus populiacijose (0,8), mažiausia – Žeimenos populiacijoje (0,167). Peršokšnos populiacijoje visi individai buvo vieno genotipo.

Remdamiesi morfologinės įvairovės tyrimų duomenimis, molekulinės genetinės įvairovės tyrimo (AMOVA) metodu nustatėme genetinės įvairovės pasiskirstymą tarp nustatytų rūšių, tarp populiacijų rūšies viduje ir populiacijų viduje.

10 lentelė. *Batrachium* populiacijų genetinio polimorfizmo rodikliai, nustatyti naudojant ISSR žymenis. h – Šanon'o indeksas, I – Nei genų įvairovė; i – genotipinė įvairovė; Hj – tikėtinas heterozigotiškumas; Br[8] – lokusų gausumas populiacijoje, sudarytoje iš 8-ių individų; PLP5 % [8] – polimorfinių lokusų, kurių dažnis yra nuo 0,05 iki 0,95, dažnis populiacijoje, sudarytoje iš 8-ių individų. Populiacijos: GR – Grūda, ME – Merkys, NE – Neris, ZA – Žalesa, UL – Ūla, VIE – Viešvilė, SK – Skroblus, VO – Vokė, TA – Tatula, GA – Gauja, VE – Veržuva, SI – Širvinta, VI – Vilnia, VER – Verknė, ZE – Žeimena, PE – Peršokšna

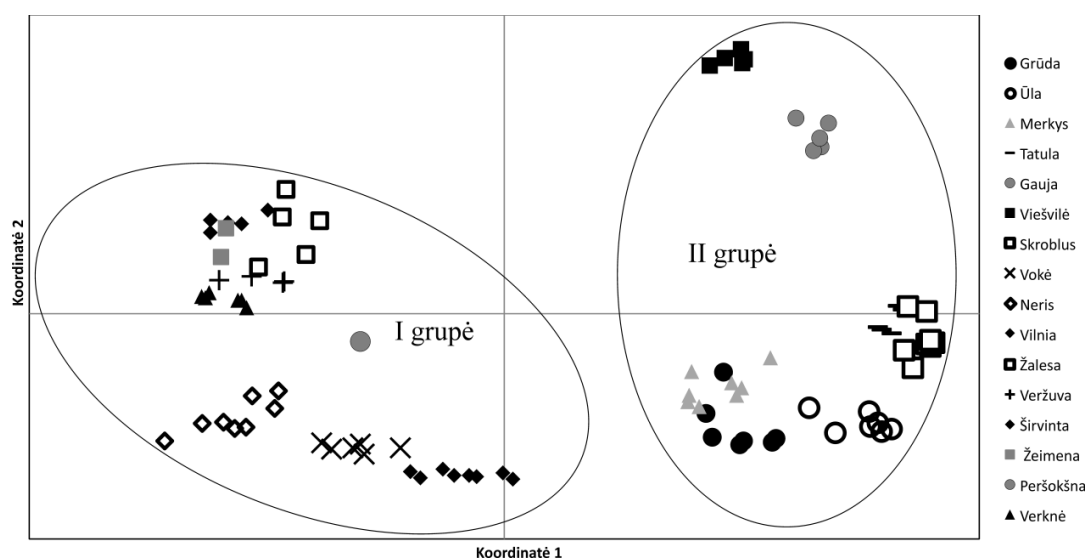
Populiacija	h	I	i	Hj	Br[8]	PLP5 % [8]
GR	0,09	0,139	0,583	0,059	1,21	0,308
ME	0,08	0,110	0,8	0,060	1,16	0,178
NE	0,05	0,080	0,727	0,046	1,14	0,168
ZA	0,02	0,033	0,5	0,021	1,08	0,103
UL	0,04	0,056	0,583	0,024	1,07	0,093
VIE	0,02	0,025	0,417	0,017	1,06	0,075
SK	0,03	0,040	0,8	0,022	1,06	0,065
VO	0,02	0,023	0,5	0,012	1,04	0,047
TA	0,01	0,020	0,625	0,015	1,04	0,037
GA	0,01	0,012	0,417	0,012	1,03	0,037
VE	0,01	0,016	0,333	0,007	1,03	0,037
SI	0,01	0,009	0,417	0,009	1,03	0,037
VI	0,01	0,018	0,667	0,017	1,04	0,037
VER	0,01	0,010	0,5	0,013	1,03	0,037
ZE	0,001	0,003	0,167	0,003	1,01	0,009
PE	0	0	0,083	0,0	1,0	0,000

Didžiausia genetinė įvairovė (58 %) buvo nustatyta tarp skirtingų populiacijų rūšių viduje; mažesnė (33 %) – tarp skirtingų *Batrachium* rūšių, mažiausia (9 %) – populiacijų viduje (11 lentelė). AFLP-SURV v.1.0 atlikta ISSR žymenų analizė parodė panašią labai didelę populiacijų diferenciaciją ($F_{ST} = 0,9$). *B. fluitans* populiacijų diferenciacija buvo 91 %, o *B. penicillatum* s.l. – 84 %.

11 lentelė. *Batrachium* populiacijų hierarchinė molekulinės genetinės įvairovės analizė (AMOVA). df – laisvės laipsniai; SS – kvadratų suma; MS – vidutinis kvadratinis nuokrypis; Est. Var. – variacijos komponentas; % – bendra genetinė įvairovė procentais

	df	SS	MS	Est. Var.	%	p
Tarp rūšių	1	443,140	443,140	4,003	33 %	< 0,001
Tarp populiacijų	14	1225,878	87,563	7,566	58 %	< 0,001
Viduje populiacijų	167	177,758	1,064	1,064	9 %	< 0,001
Bendras	182	1846,776		12,634	100 %	

Norėdami įvertinti populiacijų genetinį giminingumą bei įvairovę atlikome ir principinių koordinatų analizę (PCoA). Šiuo metodu buvo nustatyta, kad 39,53 % genetinės įvairovės aprašo pirmosios dvi koordinatės (koordinatė 1 paaiškina 26,57 % genetinės įvairovės, koordinatė 2 – 12,96 %). PCoA rezultatai parodė, kad visos tirtos populiacijos grupuojasi į dvi pagrindines grupes (33 pav.). I grupė apima visus 9-ių populiacijų (SI, ZE, ZA, VER, VI, VO, NE, PE, VE) individus. Pagal morfologinius požymius šiose populiacijose augantys individai buvo apibūdinti kaip *B. fluitans*.



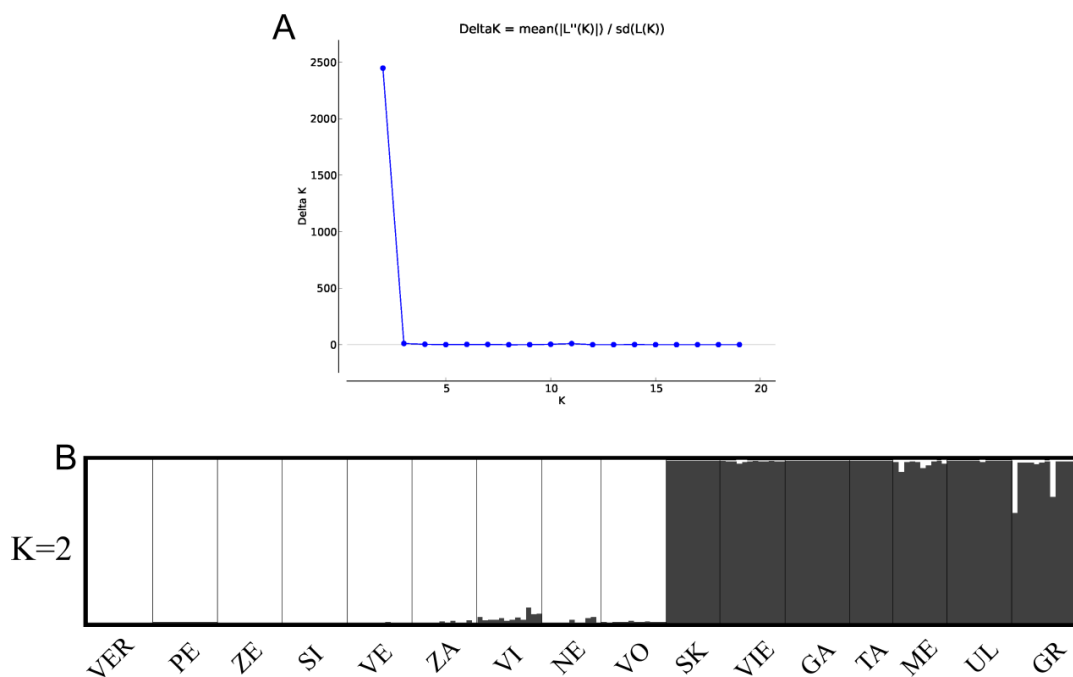
33 pav. *Batrachium* populiacijų genetinės įvairovės principinių koordinatų analizė, atlikta naudojant genetinių atstumų matricą

Į II grupę pateko 7-ios populiacijos (GA, SK, TA, ME, UL, VIE ir GR) (33 pav.). Pagal morfologinius rodiklius šiose populiacijose augantys individai yra priskiriami *B. penicillatum* s.l. ir *B. trichophyllum*. PCoA taip pat parodė, kad kai kurios populiacijos (NE, UL, VIE, VO, VI ir GA) yra genetiškai labiau savitos ir dviejų koordinatų sistemoje nepersidengia su kitomis. Būtent šioms populiacijoms yra būdingi labiau saviti genotipai.

Panašius genetinės įvairovės pasiskirstymo dėsningumus patvirtino ir Bayeso klasterių analizės rezultatai gauti naudojant STRUCTURE programą. Didžiausia Evann'o DeltaK reikšmė buvo nustatyta, kai $K = 2$ (34 pav. A). Tai

rodo, kad optimalus klasterių skaičius, analizuojant *Batrachium* populiacijų genetinę struktūrą, yra lygus dviems.

Bayeso klasterių analizė rodo, kad visos tirtos populiacijos grupuojasi į du klasterius (34 pav. B). Mažesnis klasteris, kuris pažymėtas tamsiai pilka spalva, sudarytas iš 7-ių populiacijų (GR, UL, ME, TA, GA, VIE ir SK), o didesnį, balta spalva pažymėtą, klasterį sudaro 9-ios populiacijos (VO, NE, VI, ZA, VE, SI, ZE, PE ir VER). Šių tyrimų rezultatai taip pat rodo didelį kiekvienos *Batrachium* populiacijos augalų genetinį panašumą (34 pav. B).

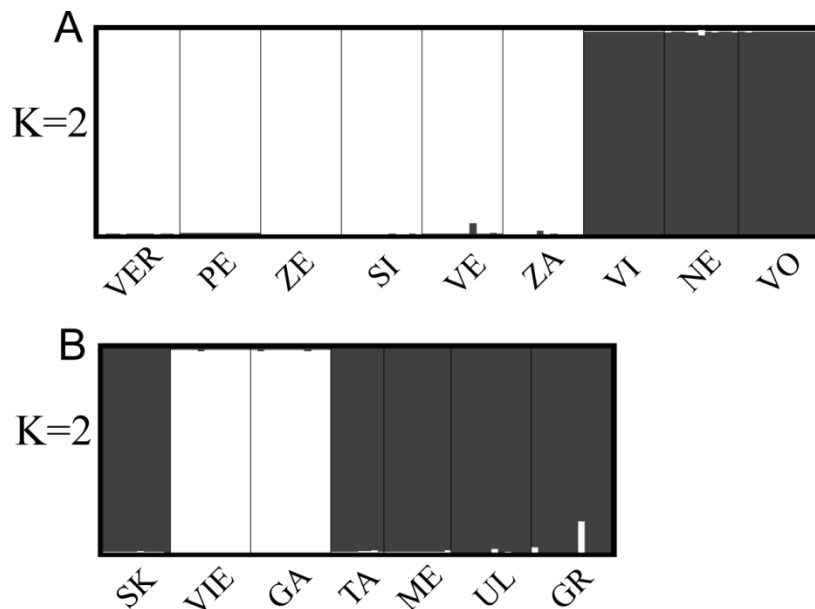


34 pav. *Batrachium* populiacijų geninės sandaros tyrimas Bayeso klasterių metodu naudojant STRUCTURE programą. A. Evanno ir kt. (2005) metodu nustatyta optimali K reikšmė. DeltaK pikas stebimas, kai $K = 2$ (A); *Barachium* populiacijų suskirstymas į grupes Bayeso klasterių analizės metodu, kai $K = 2$ (B). Populiacijos: VER – Verknė, PE – Peršokšna, ZE – Žeimena, SI – Širvinta, VE – Veržuva, ZA – Žalesa, VI – Vilnia, NE – Neris, VO – Vokė, SK – Skroblus, VIE – Viešvilė, GA – Gauja, TA – Tatula, ME – Merkys, UL – Ūla, GR – Grūda

Kai kuriose populiacijose (GR, NE, ME ir VI) buvo nustatytas nedidelis genetiškai maišytų individų skaičius. Tačiau genetinio maišymosi tarp skirtingiems klasteriams priklausančių populiacijų laipsnis yra nedidelis, todėl

galima teigti, kad skirtingų *Batrachium* rūšių populiacijos buvo gana homogeniškos (34 pav. B).

Kadangi Bayeso klasterių analizė STRUCTURE programoje parodo tik aukščiausią populiacijų hierarchijos lygmenį, pakartojome Bayeso analizę atskirai dvejose populiacijų grupėse, t. y. nustatėme, ar atskiri klasteriai neturi savo vidinės struktūros (Durka ir kt., 2017). Šis tyrimas parodė, kad balta spalva pažymėtas klasteris (*B. fluitans*, I grupė) skyla į du pogrupius – baltą, kuriame yra šešios populiacijos (VER, PE, ZE, SI, VE ir ZA) ir tamsiai pilką, kuriame yra trys populiacijos (VI, NE, VO) (35 pav. A).



35 pav. *Batrachium* populiacijų atskirų grupių, atitinkančių I (*B. fluitans*) ir II (*B. penicillatum* s.l. ir *B. trichophyllum*) grupes, STRUCTURE analizė. **A** – *Batrachium fluitans* grupės populiacijų genetinė struktūra; **B** – *Batrachium penicillatum* s.l. ir *B. trichophyllum*. Populiacijos: VER – Verknė, PE – Peršokšna, ZE – Žeimena, SI – Širvinta, VE – Veržuva, ZA – Žalesa, VI – Vilnia, NE – Neris, VO – Vokė, SK – Skroblus, VIE – Viešvilė, GA – Gauja, TA – Tatula, ME – Merkys, UL – Ūla, GR – Grūda

II grupėje (*B. penicillatum* s.l. ir *B. trichophyllum*) (35 pav. B) taip pat buvo nustatyti du klasteriai. Didesnysis (tamsiai pilkas) apėmė 5 populiacijas (SK, TA, ME, UL, GR), o mažesnįjį (baltą) sudarė tik dvi (VIE ir GA), populiacijos (35 pav. B).

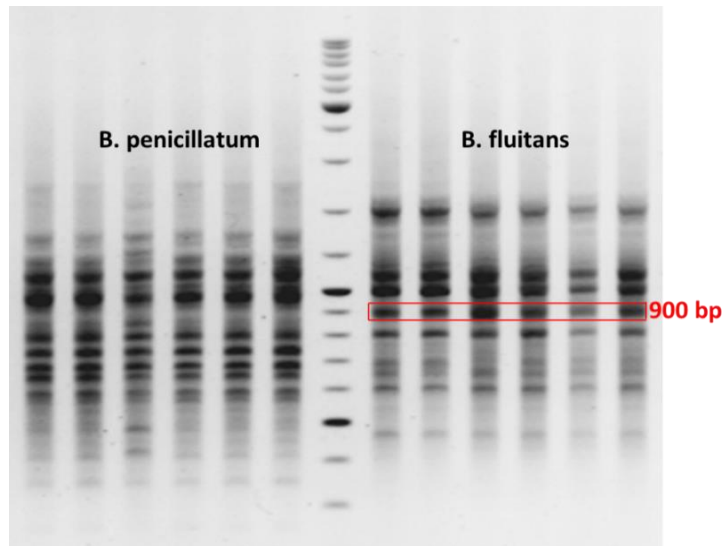
3.5.2. I grupės (*Batrachium fluitans*) ir II grupės (*Batrachium penicillatum* s.l. ir *B. trichophyllum*) augalų genetinės ir genotipinės įvairovės palyginimas

Išanalizavus genotipinę įvairovę *Batrachium* rūšių viduje, paaiškėjo, kad didesne genotipine (klonų) įvairove pasižymėjo II grupės populiacijos (12 lentelė). Vidutinė šios grupės augalų genotipinė įvairovė buvo $0,604 \pm 0,06$, o I grupės – $0,433 \pm 0,07$.

12 lentelė. *B. penicillatum* s.l., *B. trichophyllum* ir *B. fluitans* genetinės bei genotipinės įvairovės rodikliai. PL – polimorfiniai lokusai; SL – specifiniai lokusai; i – vidutinė genotipinė (klonų) įvairovė populiacijoje; Hj – vidutinis tikėtinas heterozigotiškumas populiacijoje; Br[8] – vidutinis lokusų gausumas populiacijoje, sudarytoje iš 8-ių individų; PLP5 % [8] – vidutinis polimorfinių lokusų, kurių dažnis yra nuo 0,05 iki 0,95, dažnis populiacijoje, sudarytoje iš 8-ių individų

Rūšys	PL	SL	i ± SE	P %	Hj ± SE	Br[8] SE	±	PLP5 % [8] ± SE	±
II grupė (<i>Batrachium penicillatum</i> s.l. ir <i>B. trichophyllum</i>)	71	1	0,604 ± 0,06	11,5	0,029 ± 0,008	1,09	±	0,113 ± 0,037	±
I grupė (<i>Batrachium fluitans</i>)	59	2	0,433 ± 0,07	5,3	0,014 ± 0,004	1,04	±	0,053 ± 0,017	±

II grupės augalai, palyginus su I grupės, turėjo didesnes polimorfinių lokusų skaičius (atitinkamai 71 ir 59), polimorfinių lokusų nuošimčio (atitinkamai 11,5 ir 5,3), vidutinio ISSR lokusų gausumo (atitinkamai 1,09 ir 1,04), vidutinio tikėtino heterozigotiškumo (atitinkamai 0,029 ir 0,014) ir vidutinio polimorfinių lokusų dažnio (atitinkamai 0,113 ir 0,053) reikšmes. Atlikus ISSR žymenų pasiskirstymo populiacijose analizę buvo identifikuotos trys rūšiai savitos ISSR juostos: dvi turėjo I grupės augalai ir vieną – II grupės. ISSR-28₉₀₀ juosta buvo identifikuota visuose *B. fluitans* individuose, tačiau jos neturėjo nė vienas II grupės individas (36 pav.).



36 pav. *B. fluitans* augalams būdingas I-28₉₀₀ lokusas

ISSR-C₇₇₀ juosta buvo nustatyta 89 % *B. fluitans* individų. ISSR-28₉₅₀ juosta buvo būdinga tik II grupės individams, tačiau ją turėjo ne visi augalai, o tik 86 %. Viena nustatyta juosta buvo būdinga tik Viešvilės populiacijos augalams, o Grūdų populiacija buvo išskirtinė, nes turėjo didžiausią retų juostų skaičių.

3.5.3. Chloroplastų ir branduolio DNR specifinių sekų tyrimas sekoskaitos metodu

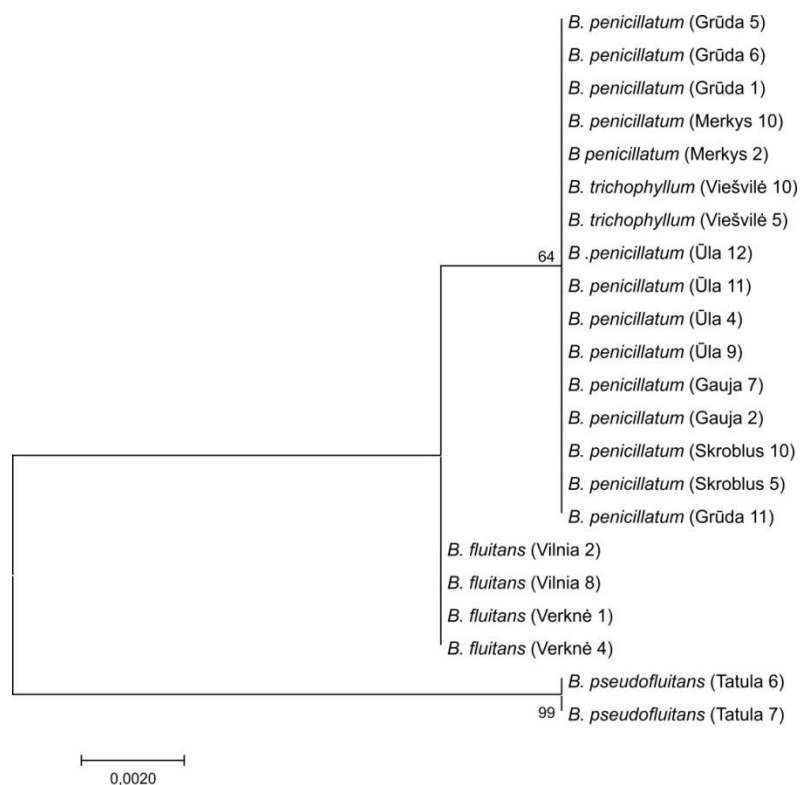
Siekiant tiksliau apibūdinti tiriamas *Batrachium* genties rūšis, o taip pat įvertinti tą pačią medžiagą keliais skirtingais DNR žymenų metodais, buvo atlikta 24 *Batrachium* pavyzdžių cpDNR (*trnH-psbA* regiono) ir tų pačių pavyzdžių rDNR (*ITS1-5.8S-ITS2* regiono) sekoskaita.

Nustatytas cpDNR nekoduojančio *trnH-psbA* regiono dydis *Batrachium* genties augaluose buvo 440 bp. Iš jų 431 nukleotidas buvo konservatyvūs, o 9 – kintantys. Nustatytos 9-ios parsimoniškai informatyvios sekų vietos. Dvi vietos pasižymėjo iškritomis / intarpais (13 lentelė).

13 lentelė. *Batrachium* augalų cpDNR *trnH-psbA* regiono haplotipai (TA – Tatula; SK – Skroblus; GA – Gauja; UL – Ūla; RO – Rospuda; VIE – Viešvilė; ME – Merkys; GR – Grūda; VI – Vilnia; VER – Verknė; ZE – Žeimena)

Rūšis	<i>trnH-psbA</i> regiono kintančios vietos																		
	115	266	268	269	270	271	272	274	281	282	283	284	291	294	295	296	297	298	299
<i>B. pseudofluitans</i> _TA	C	C	-	-	-	-	-	T	T	C	A	G	G	A	T	T	A	T	A
<i>B. pseudofluitans</i> _TA																			
<i>B. penicillatum</i> s.str._SK	A	T	T	A	A	T	A	C	C	T	G	A	A	G	-	-	-	-	-
<i>B. penicillatum</i> s.str._SK	A	T	T	A	A	T	A	C	C	T	G	A	A	G	-	-	-	-	-
<i>B. penicillatum</i> gr._GA	A	T	T	A	A	T	A	C	C	T	G	A	A	G	-	-	-	-	-
<i>B. penicillatum</i> gr._GA	A	T	T	A	A	T	A	C	C	T	G	A	A	G	-	-	-	-	-
<i>B. penicillatum</i> s.str._UL	A	T	T	A	A	T	A	C	C	T	G	A	A	G	-	-	-	-	-
<i>B. penicillatum</i> s.str._UL	A	T	T	A	A	T	A	C	C	T	G	A	A	G	-	-	-	-	-
<i>B. penicillatum</i> gr._UL	A	T	T	A	A	T	A	C	C	T	G	A	A	G	-	-	-	-	-
<i>B. penicillatum</i> gr._UL	A	T	T	A	A	T	A	C	C	T	G	A	A	G	-	-	-	-	-
<i>B. trichophyllum</i> _RO	A	T	T	A	A	T	A	C	C	T	G	A	A	G	-	-	-	-	-
<i>B. trichophyllum</i> _RO	A	T	T	A	A	T	A	C	C	T	G	A	A	G	-	-	-	-	-
<i>B. trichophyllum</i> _VIE	A	T	T	A	A	T	A	C	C	T	G	A	A	G	-	-	-	-	-
<i>B. trichophyllum</i> _VIE	A	T	T	A	A	T	A	C	C	T	G	A	A	G	-	-	-	-	-
<i>B. penicillatum</i> gr._ME	A	T	T	A	A	T	A	C	C	T	G	A	A	G	-	-	-	-	-
<i>B. penicillatum</i> gr._GR	A	T	T	A	A	T	A	C	C	T	G	A	A	G	-	-	-	-	-
<i>B. penicillatum</i> gr._GR	A	T	T	A	A	T	A	C	C	T	G	A	A	G	-	-	-	-	-
<i>B. penicillatum</i> gr._ME	A	T	T	A	A	T	A	C	C	T	G	A	A	G	-	-	-	-	-
<i>B. penicillatum</i> gr._GR	A	T	T	A	A	T	A	C	C	T	G	A	A	G	-	-	-	-	-
<i>B. penicillatum</i> gr._GR	A	T	T	A	A	T	A	C	C	T	G	A	A	G	-	-	-	-	-
<i>B. fluitans</i> _VI		T	T	A	A	T	A	C	C	T	G	A	A	G	-	-	-	-	-
<i>B. fluitans</i> _VI		T	T	A	A	T	A	C	C	T	G	A	A	G	-	-	-	-	-
<i>B. fluitans</i> _VER		T	T	A	A	T	A	C	C	T	G	A	A	G	-	-	-	-	-
<i>B. fluitans</i> _ZE		T	T	A	A	T	A	C	C	T	G	A	A	G	-	-	-	-	-

Šio regiono sekoskaitos rezultatai parodė, kad II grupėje (*B. penicillatum* s.l. ir *B. trichophyllum*) yra du skirtingi *trnH-psbA* regiono haplotipai. Vienas iš jų yra paplitęs Tatulos upėje, o kitas – Skroblaus, Gaujos, Ūlos, Rospudos, Viešvilės, Merkio, Grūdų upėse. *B. fluitans* rūšies individų cpDNR sekoskaitos rezultatai parodė tik vieną *trnH-psbA* regiono haplotipą. Filogenetinis *trnH-psbA* haplotipų palyginimas rodo, kad Tatulos upėje paplitęs haplotipas yra labiau nutolęs ir patikimai atsiskiria nuo *B. fluitans*, *B. penicillatum* s.l. ir *B. trichophyllum* haplotipų (36 pav.). Sekoskaitos metodu nustatytos *trnH-psbA* regiono sekos buvo užregistruotos GenBank® duomenų bazėje (DB GenBank® kodai MF167609 – MF167632).



36 pav. *Batrachium* rūšių dendrograma sudaryta naudojant cpDNR *trnH-psbA* regiono sekoskaitos rezultatus. Taikytas ML analizės metodas, Tamura-Nei pagalbinis modelis. Įkėlų vertės (%) gautos atlikus 1000 iteracijų

rDNR *ITS1-ITS4* nuskaityto regiono dydis buvo 699 bp. Iš jų 664 nukleotidai buvo konservatyvūs ir 35 – kintantys. 35-ios sekų vietos buvo parsimoniškai informatyvios. Iš viso buvo nustatyta 9 *Batrachium* rDNR haplotipai (ribotipai). Toje pačioje upėje jų buvo randama vienas ir daugiau. Pavyzdžiui, vienas *Batrachium* haplotipas buvo nustatytas Vilnioje, Rospudoje (Lenkija), Ūloje, Skrobluje, du – Gaujoje, Merkyje, Tatuloje, o Grūdoje – net trys haplotipai. Ūloje ir Gaujoje nustatytas vienas bendras *Batrachium* rDNR haplotipas. Vienas iš Grūdoje paplitusių haplotipų rastas ir Vilnioje (14 lentelė).

14 lentelė. *Batrachium* augalų rDNR ITS1-ITS4 regiono haplotipai įvairiose upėse (TA – Tatula; SK – Skroblus; GA – Gauja; UL – Ūla; RO – Rospuda; VIE – Viešvilė; ME – Merkys; GR – Grūda; VI – Vilnia; VER – Verknė; ZE – Žeimena)

Rūšis	ITS1-ITS4 regiono kintančios vietos																																			
	55	63	80	82	85	93	96	99	110	113	114	117	122	126	128	135	147	148	153	158	162	174	219	241	251	252	463	464	495	510	526	557	574	604	631	
	C	T	-	G	T	G	T	G	C	T	T	T	C	T	G	T	T	T	T	T	C	G	C	C	G	T	G	C	T	T	G	T	A	C	G	
<i>B. pseudofluitans</i> _TA6	-																																			
<i>B. pseudofluitans</i> _TA7	-																																			
<i>B. trichophyllum</i> _RO1			-	A				A		C	C					C						T	T						C	C	A					
<i>B. trichophyllum</i> _RO2			-	A				A		C	C					C						T	T						C	C	A					
<i>B. trichophyllum</i> _VIE10	T		-					A		C	C	C				C						A							C	C	A					
<i>B. trichophyllum</i> _VIE5	T		-					A		C	C	C				C						A							C	C	A					
<i>B. penicillatum</i> s.str._SK10			-							C	C					C	A	C	C					T	A	C	A	T		C		A				
<i>B. penicillatum</i> s.str._SK5			-							C	C					C	A	C	C					T	A	C	A	T		C		A				
<i>B. penicillatum</i> gr._GA7			-							C	C					C	A	C	C					T	A	C	A	T		C		A				
<i>B. penicillatum</i> gr._GA2			-					A		C	C	T				C													C	C	A				A	
<i>B. penicillatum</i> s.str._UL12			-					A		C	C	T				C													C	C	A				A	
<i>B. penicillatum</i> s.str._UL11			-					A		C	C	T				C													C	C	A				A	
<i>B. penicillatum</i> gr._UL4			-					A		C	C	T				C													C	C	A				A	
<i>B. penicillatum</i> gr._UL9			-					A		C	C	T				C													C	C	A				A	
<i>B. penicillatum</i> gr._ME2	C	G			C	A	C	A	T			C	C		A	A								A	C				C							
<i>B. penicillatum</i> gr._GR5			-					A		C	C					C														C	A					
<i>B. penicillatum</i> gr._GR6			-							C	C					C	A	C						T		C	A	T		C		A				
<i>B. penicillatum</i> gr._ME10	C	G			C	A	C	A	T			C	C		A	A								A	C				C				G	T		
<i>B. penicillatum</i> gr._GR1	C	G			C	A	C	A	T			C	C		A	A								A	C				C				G	T		
<i>B. penicillatum</i> gr._GR11	C	G			C	A	C	A	T			C	C		A	A								A	C				C				G	T		
<i>B. fluitans</i> _VI2	C	G			C	A	C	A	T			C	C		A	A								A	C				C				G	T		
<i>B. fluitans</i> _VI8	C	G			C	A	C	A	T			C	C		A	A								A	C				C				G	T		
<i>B. fluitans</i> _VER4	C	G			C	A	C	A	T			C	C		A	A								A	C				C				G	T		
<i>B. fluitans</i> _ZE	C	G			C	A	C	A	T			C	C		A	A								A	C				C				G	T		

3.5.4. *Batrachium* augalų chloroplastų bei branduolio DNR specifinių regionų originalių sekų ir NCBI, GenBank® registruotų *Batrachium* taksonų sekų palyginimas

Batrachium genties augalų cpDNR ir rDNR regionų haplotipų sekos buvo palygintos su NCBI GenBank® duomenų bazėje užregistruotomis sekomis. Buvo ieškoma sekų, kurios būtų identiškios konkrečiai *Batrachium* rūšiai, kuriai, remiantis morfologine analize, šis haplotipas turėtų priklausyti. Neradus tokių, buvo ieškoma rūšių, kurių konkretaus regiono nuskaitytos sekos būtų kuo panašesnės į mūsų nustatytąsias.

Palyginus cpDNR nekoduojančio *trnH-psbA* regiono sekas su NCBI GenBank® esančiomis sekomis paaiškėjo, kad identiškų arba panašių sekų ilgis buvo įvairus, t. y. nuo 339 nt iki 404 nt. Daugiausia buvo 339 nt ilgio sekų.

Nustatyta *B. fluitans* cpDNR *trnH-psbA* haplotipo seka buvo identiška *B. fluitans* (*R. fluitans*) (Telford ir kt., 2011) ir *B. aquatile* (*R. aquatilis*) (Lumbreras ir kt., 2011) sekoms, kurių ilgis, atitinkamai, buvo 339 nt ar 379 nt

(15 lentelė). Mūsų tirti *B. fluitans* augalai fenotipiškai nėra panašūs į *B. aquatile*. Pastarosios rūšies atstovai turi gerai išreikštus tikruosius plūduriuojančius lapus, kurių mūsų tirti pavyzdžiai neturėjo. Be to, skiriasi ir šių rūšių augavietės. *B. aquatile* aptinkama stovinčiuose arba lėtai tekančiuose, eutrofiniuose vandenyse, o *B. fluitans* – didelėse ir srauniose upėse.

Individų, morfologiškai apibūdintų kaip *B. trichophyllum*, *trnH-psbA* haplotipo seka, palyginus ją su NCBI duomenų bazėje esančiomis, 100 % sutapo su *B. trichophyllum* (*R. trichophyllum*) seka (Telford ir kt., 2011). Panašumas į kitų *Batrachium* rūšių sekas buvo mažesnis (15 lentelė).

15 lentelė. *Batrachium* skirtingų rūšių cpDNR *trnH-psbA* regiono sekų ir panašių, NCBI GenBank® duomenų bazėje registruotų, sekų palyginimas

cpDNR seka	Rūšis	DB GeneBank kodas	Panašios rūšys	Sekos ilgis (nt)	Atitikimas
<i>trnH-psbA</i>	<i>B. fluitans</i>	HQ894440.1	<i>R. fluitans</i>	339	100 %
		KC620498.1	<i>R. aquatilis</i>	379	100 %
		HQ894441.1	<i>R. trichophyllum</i>	339	99 %
	<i>B. trichophyllum</i>	HQ894441.1	<i>R. trichophyllum</i>	339	100 %
		KC620498.1	<i>R. aquatilis</i>	379	99 %
		HQ894440.1	<i>R. fluitans</i>	339	99 %
	<i>B. pseudofluitans</i>	HQ894439.1	<i>R. penicillatus</i> subsp. <i>pseudofluitans</i>	340	99 %
		HQ894442.1	<i>R. circinatus</i>	339	99 %
		HQ894438.1	<i>R. peltatus</i>	340	99 %
		KC620498.1	<i>R. aquatilis</i>	379	96 %
		HQ894440.1	<i>R. fluitans</i>	339	95 %
	<i>B. penicillatum</i> gr.	HQ894441.1	<i>R. trichophyllum</i>	339	100 %
		KC620498.1	<i>R. aquatilis</i>	379	99 %
		HQ894442.1	<i>R. circinatus</i>	339	95 %
		HQ894440.1	<i>R. fluitans</i>	339	94 %
KC620495.1		<i>R. trichophyllum</i>	404	94 %	

Tatulos upėje augančių kurklių cpDNR *trnH-psbA* haplotipo nuskaityta seka, palyginus ją su duomenų bazėje esančiomis, rodė 99 % panašumą į *R. penicillatus* subsp. *pseudofluitans* (Telford ir kt., 2011). Dar dviejų *Batrachium* rūšių (*B. circinatum* ir *B. peltatum*) sekos 99 % sutapo su *B. pseudofluitans* *trnH-psbA* haplotipo seka (15 lentelė), tačiau tirtas pavyzdys fenotipiškai visiškai nepanašus nei į *B. circinatum* (*R. circinatus*), kuri turi visiškai kitokio tipo suskaldytus lapus ir dažniausiai aptinkama stovinčio vandens telkiniuose, nei į *B. peltatum* (*R. peltatus*), kuri turi gerai išreikštus tikruosius plūduriuojančius lapus ir buvo aptikta tik viename kanale vakarų Lietuvoje. Panašumas į *R. aquatilis* ir *R. fluitans* rūšis buvo dar mažesnis (15 lentelė).

Palyginus *B. penicillatum* grupės *trnH-psbA* haplotipo sekas su NCBI GenBank[®] esančiomis sekomis, paaiškėjo, kad mūsų tirtų individų sekos yra identiškos *B. trichophyllum* sekai (Telford ir kt., 2011). Tačiau remdamiesi morfologinių požymių analizės rezultatais, manome, kad tirti augalai nėra *B. trichophyllum*. Šiek tiek mažesnis *B. penicillatum* gr. sekų panašumas buvo nustatytas dar į keturias rūšis (15 lentelė).

Palyginus tirtų pavyzdžių rDNR *ITS1-ITS4* srities sekas ir NCBI GenBank[®] duomenų bazėje registruotas paaiškėjo, kad šio regiono dydis registruotose sekose įvairus, t. y. nuo 514 nt iki 698 nt. Dažniausiai pasitaikantis sekos ilgis buvo 572 nt. Septynių, 14-oje lentelėje mėlyna spalva pažymėtų, pavyzdžių sekos buvo vienodos, nepriklausomai nuo to, kad dalis augalų buvo identifikuoti kaip *B. fluitans*, o kita dalis – kaip *B. penicillatum* grupės. Palyginus šių individų sekas su duomenų bazėje esančiomis paaiškėjo, kad šių individų nuskaitytos sekos 100 % sutampa su *R. fluitans* (Hörandl ir kt., 2012; Zalewska-Gałosz ir kt., 2013) ir 99 % su likusių keturių *Batrachium* rūšių sekomis (16 lentelė).

Ūlos ir Gaujos upėse surinktų penkių *Batrachium* individų *ITS1-ITS4* regiono nuskaitytų sekų (14 lentelėje pažymėta rožine spalva) palyginimas su sekomis, esančiomis NCBI, GenBank[®] duomenų bazėje, neparodė 100 % panašumo nei į vieną *Batrachium* rūšį. Šių individų sekos 99 % buvo panašios į kitų devynių *Batrachium* rūšių sekas, tarp kurių yra ir *R. penicillatus* (Zalewska-Gałosz, 2013, Bobrov ir kt., 2015). Tačiau Zalewska-Gałosz (2013) yra užregistravusi *R. fluitans* × *R. peltatus* *ITS1-ITS4* regiono seką, kuri taip pat 99 % sutampa su mūsų tirtų *Batrachium* pavyzdžių sekomis. Todėl, atsižvelgdami į šių tyrimų rezultatus, manome, kad mūsų tirtos Ūlos ir Gaujos upių kurklės gali būti *B. penicillatum* s.str. arba jai artimų rūšių hibridai.

Palyginus dviejų individų iš Skroblaus ir vieno iš Gaujos upės *ITS1-ITS4* regiono nuskaitytas sekas (14 lentelė, geltona spalva) su duomenų bazėje registruotomis, buvo rastas 100 % panašumas (16 lentelė) į *R. trichophyllum* (*B. trichophyllum*) sekas (Zalewska-Gałosz, 2013). Tačiau buvo pastebėta, kad Skroblaus upėje augantys *Batrachium* augalai, tarp jų ir tie, kurių buvo

nuskaitytas *ITS1-ITS4* regionas, turėjo išaugusius tarpinius lapus, o tai nebūdingas *B. trichophyllum* požymis. Taip pat pagal morfologinius požymius tirti augalai tikrai negali būti priskirti *R. circinatus* ar *R. aquatilis* rūšims.

Rospudos ir Viešvilės upių augalų nuskaitytų sekų palyginimas su NCBI, GenBank[®] užregistruotomis, sekomis parodė, kad jos 100 % panašios į *B. trichophyllum* sekas (Zalewska-Gałosz, 2013) (16 lentelė). Šių upių augalų *ITS1-ITS4* regiono nuskaitytos sekos nebuvo identiškios, tačiau šį polimorfizmą galima paaiškinti tuo, kad Rospudos upėje augantys individai, atsižvelgiant į anksčiau paskelbtus Zalewska-Gałosz (2013) tyrimų rezultatus, yra haplotipo 1, o Viešvilės – haplotipo 2.

Dėl haplotipų skirtumų, nustatytų *ITS1-ITS4* sekoje, Tatuloje augančių kurklių sekos buvo palygintos su duomenų bazėje esančiomis sekomis nepriklausomai viena nuo kitos. 16-oje lentelėje matyti, kad *B. pseudofluitans_TA6* individo seka 100 % sutapo su *R. aquatilis* (Zalewska-Gałosz, 2013), tačiau tirtas pavyzdys neturėjo *R. aquatilis* būdingų tikrųjų plūduriuojančių lapų. Mūsų nustatytų sekų panašumas į kitų *Batrachium* rūšių sekas buvo mažesnis.

B. pseudofluitans_TA6 ir *B. pseudofluitans_TA7* individai 98 % buvo panašūs į *R. penicillatus* subsp. *pseudofluitans* (Hoerandl ir kt., 2009) (16 lentelė).

Trijų likusių (*B. penicillatum* gr._ME2, *B. penicillatum* gr._GR5, *B. penicillatum* gr._GR6) individų *ITS1-ITS4* regiono nuskaitytos sekos buvo unikalios ir vertintinos kaip saviti haplotipai (14 lentelė). Palyginus šias sekas su NCBI, GenBank[®] duomenų bazėje registruotomis, paaiškėjo, kad jos 99 % sutampa ne su vienos rūšies sekomis (16 lentelė).

16 lentelė. Skirtingų *Batrachium* rūšių branduolio DNR ITS1-ITS4 regiono sekų ir panašių, NCBI GenBank® duomenų bazėje registruotų, sekų palyginimas

cpDNR seka	Rūšis	DB GeneBank kodas	Panašios rūšys	Sekos ilgis (nt)	Atitikimas	
ITS1-ITS4	<i>B. fluitans</i> _ZE	AY680069.1	<i>R. fluitans</i>	599	100 %	
	<i>B. fluitans</i> _VER4	AY680070.1	<i>R. penicillatus</i> subsp. <i>pseudofluitans</i>	599	99 %	
	<i>B. fluitans</i> _VI2	KF719065.1	<i>R. fluitans</i>	573	100 %	
	<i>B. fluitans</i> _VI8	FM242858.1	<i>R. baudotii</i>	599	99 %	
	<i>B. penicillatum</i> gr._GR1	AY680068.1	<i>R. peltatus</i>	597	99 %	
	<i>B. penicillatum</i> gr._ME10	KR996525.1	<i>R. fluitans</i>	573	99 %	
	<i>B. penicillatum</i> gr._GA2	KC620484.1	<i>R. aquatilis</i>	599	99 %	
		KF719068.1	<i>R. peltatus</i>	572	99 %	
		KR996567.1	<i>R. trichophyllus</i>	572	99 %	
		KR996528.1	<i>R. penicillatus</i>	572	99 %	
		KR996538.1	<i>R. schmalhauseni</i>	572	99 %	
		KF190720.1	<i>R. trichophyllus</i>	572	99 %	
		KF719090.1	<i>R. fluitans</i> × <i>R. peltatus</i>	572	99 %	
		KF719087.1	<i>R. penicillatus</i> subsp. <i>penicillatus</i>	698	99 %	
		<i>B. penicillatum</i> s.str._SK10	AF323321.1	<i>R. circinatus</i>	598	99 %
		<i>B. penicillatum</i> s.str._SK5	KC620479.1	<i>R. trichophyllus</i>	598	99 %
	<i>B. penicillatum</i> gr._GA7	FM242843.1	<i>R. aquatilis</i>	598	99 %	
		KF719077.1	<i>R. trichophyllus</i>	572	100 %	
	<i>B. trichophyllum</i> _RO1	KF719078.1	<i>R. trichophyllus</i>	572	100 %	
		KR996560.1	<i>R. schmalhauseni</i>	572	99 %	
	<i>B. trichophyllum</i> _RO2	KR996528.1	<i>R. penicillatus</i>	572	99 %	
		KF719072.1	<i>R. trichophyllus</i>	572	100 %	
	<i>B. trichophyllum</i> _VIE10	KC620484.1	<i>R. aquatilis</i>	599	99 %	
		KF719068.1	<i>R. peltatus</i>	572	99 %	
	<i>B. trichophyllum</i> _VIE5	KR996528.1	<i>R. penicillatus</i>	572	99 %	
		KF719055.1	<i>R. aquatilis</i>	572	100 %	
	<i>B. pseudofluitans</i> _TA6	KC620484.1	<i>R. aquatilis</i>	599	98 %	
		HQ894455.1	<i>R. penicillatus</i> subsp. <i>pseudofluitans</i>	514	98 %	
	<i>B. pseudofluitans</i> _TA7	AY680070.1	<i>R. penicillatus</i> subsp. <i>pseudofluitans</i>	599	97 %	
		KF719055.1	<i>R. aquatilis</i>	572	99 %	
	<i>B. pseudofluitans</i> _TA7	KC620484.1	<i>R. aquatilis</i>	599	98 %	
		HQ894455.1	<i>R. penicillatus</i> subsp. <i>pseudofluitans</i>	514	98 %	
	<i>B. penicillatum</i> gr._ME2	AY680070.1	<i>R. penicillatus</i> subsp. <i>pseudofluitans</i>	599	97 %	
FM242858.1		<i>R. baudotii</i>	599	99 %		
<i>B. penicillatum</i> gr._GR5	AY680068.1	<i>R. peltatus</i>	597	99 %		
	KC620484.1	<i>R. aquatilis</i>	599	99 %		
<i>B. penicillatum</i> gr._GR5	KR996567.1	<i>R. trichophyllus</i>	572	99 %		
	KF719068.1	<i>R. peltatus</i>	572	99 %		
<i>B. penicillatum</i> gr._GR5	KR996528.1	<i>R. penicillatus</i>	572	99 %		
	KF719087.1	<i>R. penicillatus</i> subsp. <i>penicillatus</i>	573	99 %		
<i>B. penicillatum</i> gr._GR6	KF719086.1	<i>R. fluitans</i> × <i>R. peltatus</i>	572	99 %		
	KR996523.1	<i>R. circinatus</i>	572	100 %		
<i>B. penicillatum</i> gr._GR6	KC620479.1	<i>R. trichophyllus</i>	598	99 %		
	FM242843.1	<i>R. aquatilis</i>	598	99 %		

IV. REZULTATŲ APTARIMAS

4.1. Morfologinių požymių svarba *Batrachium* taksonomijai

Batrachium genties augalai pasižymi dideliu morfologinių požymių kintamumu, kuris apsunkina šių augalų tyrimus ir rūšių nustatymą (Cook, 1990; Bobrov ir kt., 2015). Didžiausią rūpestį kelia tai, kad kai kurie morfologiniai požymiai labai priklauso nuo aplinkos sąlygų ir jų veikiami gali kisti plačiose ribose. Dėl prisitaikymo gyventi vandenyje supanašėja kurklių morfologija ir fiziologija, todėl kokybinių požymių, pagal kuriuos būtų galima atskirti šias rūšis, skaičius yra ribotas. Ypač tai pasireiškia vegetatyvinėje augalų stadijoje. Dažna hibridizacija ir vaisingų hibridų susidarymas dar labiau apsunkina rūšių nustatymą (Bobrov ir kt., 2015). Nepaisant to, morfologiniai požymiai taksonominiu požiūriu yra svarbūs ir turi būti analizuojami, o nesant kitų techninių galimybių, juos kruopščiai tiriant, galima atskirti kai kurias *Batrachium* rūšis.

Šiame darbe buvo analizuojama *Batrachium* augalų morfologinė įvairovė ir nustatyta, kad pagal tam tikrus morfologinius požymius galima išskirti dvi *Batrachium* augalų grupes. Žiedsosčio plaukuotumas, vainiklapių skaičius, vainiklapių ilgis, žiedo skersmuo, antro ir šešto lapų ilgio skirtumai, padėjo atskirti *B. fluitans* rūšį nuo taksonomiškai sudėtingos ir nevienalytės *B. penicillatum* s.l. grupės. Šios grupės augalų morfologiniai požymiai varijuoja didelėse ribose (Cook, 1966). Manoma, kad tam įtakos gali turėti skirtingo tipo vandens telkiniai (tiek daug maisto medžiagų turinčios upės su būdingu mažu pH, tiek mažai maisto medžiagų turintys upeliai ir kanalai), kuriuose aptinkami augalai (Holmes, 1979; Wiegleb, Herr, 1983; Lansdown, 2007). Mūsų gauti rezultatai sutampa su kitų autorių (Bobrov, 2015; Englmaier, 2016) pastebėjimais, kad *B. fluitans* būdingas plikas arba su retais pavieniais plaukeliais žiedsostis, penki ar daugiau vainiklapių, kurių ilgis varijuoja. Įvairūs autoriai pateikia nevienodus duomenis apie *B. fluitans* vainiklapių ilgį, pavyzdžiui Cook (1966) nurodo nuo 0,7 cm iki 1,3 cm, Rich ir Jarmy (1998) –

nuo 1,1 cm iki 2,2 cm, Englmaier (2016) – nuo 0,6 cm iki 1,1 cm. Mūsų gauti rezultatai buvo panašūs į Englmaier (2016) ir Cook (1966) pateiktus rezultatus, nes Lietuvos upėse augančių *B. fluitans* augalų vidutinis vainiklapio ilgis buvo nuo 0,4 cm iki 1,1 cm. Likę augalai, kurie nebuvo priskirti *B. fluitans*, turėjo penkis vainiklapius, kurių ilgis buvo tik nuo 0,2 cm iki 0,5 cm. Šie augalai gali būti priskiriami arba *B. trichophyllum* rūšiai, kuriai būdingi 5 vainiklapiai, jų ilgis pagal Rich ir Jarmy (1998) bei Bobrov (2003) svyruoja nuo 0,3 cm iki 0,5 cm, pagal Cook (1966) – nuo 0,3 cm iki 0,4 cm, o pagal Englmaier (2016) – nuo 0,4 cm iki 0,6 cm, arba *B. penicillatum* grupės augalams, kuriems taip pat būdingi penki, tačiau ilgesni, vainiklapiai: nuo 0,5 cm iki 2,2 cm (Rich, Jarmy, 1998), 0,5-2,0 (Cook, 1966), 0,6-1,6 (Bobrov, 2003), 0,6-1,2 (Englmaier, 2016). Yra žinoma, kad trumpesni vainiklapiai gali išsivystyti ir dėl tam tikrų aplinkos sąlygų (užpavėsinimo arba labai stiprios vandens srovės) poveikio (Englmaier, 2016).

Mūsų tirtų *B. fluitans* augalų povandeninių suskaldytų lapų ilgis buvo nuo 4,0 cm iki 12,0 cm, o pagal kitų autorių parengtuose augalų apibūdinimo raktuose pateikiamą informaciją šios rūšies lapų ilgis retai kada būna mažesnis nei 8 cm (Cook, 1966; Rich, Jarmy, 1998), nors Englmaier (2016) nurodo šiek tiek kitokias ribas – nuo 7,0 cm iki 20,0 cm. Kitų, *B. fluitans* nepriskirtų, tirtų augalų lapų ilgis buvo nuo 3,0 cm iki 8,0 cm. Pagal Englmaier (2016) *B. trichophyllum* povandeninių suskaldytų lapų ilgis būna nuo 2,0 cm iki 5,0 cm, o *B. penicillatum* s.str. – nuo 6,0 cm iki 12,0 cm. Rich ir Jarmy (1998) tik pamini, kad *B. penicillatum* s.str. augalų povandeniniai suskaldyti lapai yra ilgesni nei 2,5 cm. Taigi, mūsų darbe analizuoti augalai (be *B. fluitans*) pagal šiuos morfologinius požymius gali būti priskiriami arba *B. trichophyllum* rūšiai, arba *B. penicillatum* s.str. Manome, kad šioje heterogeniškoje grupėje gali būti ir hibridų, todėl tikrųjų plūduriuojančių lapų arba tarpinių lapų nebuvimas negali būti naudojamas kaip pagrindinis požymis hipotezei, jog tai yra *B. penicillatum* s.str., atmesti. Ypač atsižvelgiant į tai, kad kai kurie mūsų tirti augalai turėjo *B. penicillatum* s.str. būdingus tarpinius lapus, kurių

buvimas dar labiau patvirtina tai, kad dalis augalų gali atstovauti *B. penicillatum* s.str. rūšiai.

Įvairiuose *Batrachium* apibūdinimo raktuose (Cook, 1966; Webster, 1988; Webster, Rich, 1998; Bobrov, 2015; Englmaier, 2016), išskiriama ir daugiau kurklių morfologinių požymių, kurie yra labai informatyvūs. Tačiau analizuojant mūsų surinktus augalus, buvo pastebėta, kad skirtumai tarp atskiroms grupėms priklausančių augalų morfologinių požymių ne visada yra statistiškai reikšmingi. Be to, ne visi Lietuvos upėse augančių *Batrachium* genties augalų požymiai buvo gerai išreikšti. Vienas iš tokių požymių yra vaisiai, kurie gali būti informatyvus požymis atskiriant *B. fluitans* nuo *B. trichophyllum*, ar net nuo *B. penicillatum* s.l. (Rich, Jarmy, 1998; Englmaier, 2016). Tačiau mūsų klimato sąlygomis *B. fluitans* nesubrandina vaisių, jie „mumifikuojasi“. Todėl nustatyti vaisių skaičių, formą, plaukuotumą ir kitus požymius yra neįmanoma. Dar vienas svarbus požymis – kuokelių skaičius. Tačiau, dėl to, kad žiedus upėse dažnai pažeidžia vandens srovė, gyvūnai ir kiti veiksniai, būna sudėtinga įvertinti ne tik herbarizuotų, bet ir „šviežių“ augalų kuokelių skaičių (Webster, Rich, 1998). Kadangi dažniausiai buvo analizuojami herbarizuoti augalai, tai buvo gana sudėtinga įvertinti ir prielapių bei nektarinės formą, kuri gali padėti apibūdinti *B. trichophyllum*. Šiai rūšiai būdinga pusmėnulio formos nektarinė, o *B. fluitans* ir *B. penicillatum* s.l. – kriaušės formos (Webster, Rich, 1998; Englmaier, 2016). Svarbu atkreipti dėmesį į tai, kad šis „gyvų“ augalų požymis taip pat būna ne visada gerai išreikštas (Cook, 1966). Prielapių forma gali būti svarbus požymis *B. fluitans* augalams, kurių prielapiai apvalūs, atskirti nuo *B. penicillatum* s.l., turinčių širdiškus prielapius (Webster, Rich, 1998).

Atlikus tyrimus paaiškėjo, kad informatyviais požymiais galima laikyti ir lapų skilčių skaičių, ir augalo bendrą plaukuotumą. Šių požymių vertinimas gali padėti atskirti *B. penicillatum* s.l. nuo *B. trichophyllum*. Manoma, kad, būtent, padidėjęs bendras plaukuotumas yra būdingas *B. trichophyllum* augalams. Tačiau reikia pastebėti, kad šis požymis gali priklausyti ir nuo aplinkos sąlygų. Pavyzdžiui, yra žinoma, kad stiprioje srovėje augančių augalų

plaukuotumas sumažėja (Englmaier, 2016). Kaip rodo literatūros šaltiniai, atskirti *B. penicillatum* s.str. ir *B. pseudofluitans* yra gana sudėtinga. Pagrindinis diagnostinis požymis yra tikrieji plūduriuojantieji *B. penicillatum* s.str. augalų lapai (Webster, Rich, 1998). Tačiau mūsų tyrimo metu tokių augalų neradome. Skroblaus, Ūlos ir Merkio (1 individas) upėse esančių tyrimo vietų augalai turėjo tarpinius lapus, tačiau tikrųjų plūduriuojančių lapų nebuvo išauginę. Neatmetama galimybė, kad šie augalai gali būti hibridai, nes dažna hibridizacija tarp šios genties augalų apsunkina ir konkrečių rūšių identifikaciją pagal morfologinius požymius (Zalewska-Gałosz ir kt., 2014).

Apibendrinus gautus rezultatus galima teigti, kad morfologiniai požymiai yra svarbūs atskiriant kai kurias *Batrachium* rūšis. Tačiau šie požymiai gali pakisti veikiami nepalankių / neįprastų aplinkos sąlygų, dėl to tampa dar sunkiau nustatyti rūšį. Galima manyti, kad, remiantis anksčiau minėtais morfologiniais požymiais (vidutiniu vainiklapių ilgiu, antrojo ir šeštojo lapo ilgiu, žiedsosčio plaukuotumu) Lietuvos klimato sąlygomis, galima atskirti *B. fluitans* rūšį nuo heterogeniškos taksonominės kurklių grupės, kuri šiame darbe buvo įvardinta kaip *B. penicillatum* s.l.

4.2. *Batrachium* genetinė įvairovė ir skirtingų rūšių identifikavimas

Ribota *Batrachium* genties rūšių identifikacija pagal morfologinius požymius paskatino panaudoti ir molekulinis tyrimo metodus. Vienas iš populiariausių DNR žymenų metodų augalų populiacijų struktūrai ir genetinei įvairovei tirti yra ISSR (Archibald ir kt., 2006; Bhagwat ir kt., 2014; Fajardo ir kt., 2014; Kupcinskiene ir kt., 2015; Vyšniauskienė ir kt., 2015). Mūsų gauti kurklių genominės DNR ISSR tyrimų rezultatai patvirtino kitų autorių nuomonę, kad šis metodas yra tinkamas šių augalų populiacijoms tirti (Wang ir kt., 2010; Coppi ir kt., 2015). Panaudojus ISSR žymenis buvo patvirtinti upėse augančių kurklių morfologinių tyrimų rezultatai, kurie, rodo kad *B. fluitans* augalai skiriasi nuo *B. penicillatum* s.l. ir *B. trichophyllum* augalų ne tik fenotipiškai, bet ir genetiškai. Analizės metu buvo nustatyti 106 ISSR žymenys

(DNR juostos), kurių pasiskirstymas tirtų augalų DNR profiliuose leido diferencijuoti dvi kurklių grupes. Įvairių autorių tyrimais nustatyta, kad genetiniam giminingumui rūšies viduje arba tarp rūšių nustatyti pakanka 50-100 DNR žymenų (Colombo ir kt., 2000; Fajardo ir kt., 2014). ISSR polimorfizmo tyrimai parodė, kad *Batrachium* rūšių populiacijoms būdinga nedidelė genetinė įvairovė (10 lentelė). Tai leidžia manyti, kad sąlygos kai kurioms populiacijoms egzistuoti yra nepalankios ir pasireiškia genų dreifo pasekmės (Durka ir kt., 2017), ypač tuomet, kai daugelis šių populiacijų yra mažos ir fragmentuotos (Fahrig, 2003). II grupės augalų (*Batrachium penicillatum* s.l. ir *B. trichophyllum*) populiacijos pasižymėjo didesniu vidutiniu tikėtiniu heterozigotiškumu (Hj) ir polimorfinių lokusų nuošimčiu, palyginti su I grupės (*B. fluitans*) populiacijomis. Mann-Whitney *U* testas parodė, kad skirtumai tarp Hj reikšmių abiejose išskirtose grupėse buvo statistiškai reikšmingi. Tačiau reikia pastebėti, kad tirtų *Batrachium* Lietuvos populiacijų vidutinės tikėtino heterozigotiškumo ir polimorfinių lokusų procentinės dalies reikšmės buvo daug mažesnės palyginti su Bradley ir kt. (2013) aprašytomis *B. fluitans* populiacijomis Airijoje. Kadangi mažose populiacijose genų dreifas sukelia alelių, ypač retų praradimą, o po ilgesnio laiko ir vidutinio heterozigotiškumo (alelių įvairovės) sumažėjimą (Frankham, 1996; Shrestha ir kt., 2002), tai mūsų tyrime gautos žemos Hj ir kt. rodiklių reikšmės rodo galimą šio proceso įtaką *B. fluitans* populiacijoms Lietuvoje. Bradley ir kt. (2013) teigia nenustatę jokių vegetatyvinio dauginimosi požymių *B. fluitans* populiacijose (Bradley ir kt., 2013). Tačiau mūsų gauti *B. fluitans* populiacijų tyrimo rezultatai buvo kitokie. Genotipų įvairovė populiacijose, ypač Veržuvos ir Žeimenos, buvo maža (10, 12 lentelės). Veržuvos populiacijoje buvo aptikti 4 genotipai, Žeimenos – tik 2. Klonų paplitimas buvo nustatytas visose tirtose populiacijose, o Peršokšnos upėje esanti populiacija buvo monokloninė. Galima manyti, kad mažas genotipinės įvairovės vertės mūsų tirtose *B. fluitans* populiacijose galėjo nulemti šios genties augalams būdingas vegetatyvinis dauginimasis (Cook, 1966; Bobrov ir kt., 2015). Įprastai kurklės dauginasi lytiškai ir nelytiškai. Sumažėjusį lytinio

dauginimosi ir genetinės įvairovės lygį Beatty ir kt. (2008) paaiškina tuo, kad populiacijos egzistuoja neoptimaliomis tam tikrai rūšiai sąlygomis. *B. fluitans* rūšis Lietuvoje yra savo paplitimo arealo šiaurės rytiniame pakraštyje (Jalas, Suominen, 1989) ir tikėtina, kad šios rūšies augalai mūsų šalyje dauginasi išimtinai vegetatyviniu būdu. Nors *B. fluitans* suformuoja žiedus, tačiau vaisių nesunokina, jie, kaip minėta anksčiau, „mumifikuojasi“ nesubrendę (Butkuvienė ir kt., 2014). Molekulinės genetinės įvairovės analizė taip pat parodė, kad *Batrachium* populiacijoms būdinga labai maža vidupopuliacinė įvairovė (11 lentelė), kurią taip pat galima būtų paaiškinti vyraujančiu kloniniu (nelytiniu) dauginimusi (Triest ir kt., 2010) ir genetinėmis procesais, kurie vyksta populiacijose (Nei ir kt., 1975; Durka ir kt., 2017). Apibendrinus gautus rezultatus galima teigti, kad *B. fluitans* Lietuvos upių populiacijose dominuoja vegetatyvinis dauginimasis.

Remiantis ISSR analizės rezultatais taip pat buvo nustatyta, kad *B. fluitans* genotipinė įvairovė mažesnė ($i = 0,433 \pm 0,07$), palyginti su *B. penicillatum* s.l. bei *B. trichophyllum* ($0,604 \pm 0,06$). Tirtose *Batrachium penicillatum* s.l ir *B. trichophyllum* populiacijose stebimas ir lytinis dauginimasis, tačiau genetinės įvairovės tyrimų rezultatai taip pat atskleidė, kad šių rūšių populiacijose yra ir identiškų genotipų. Tai rodo, kad sėklų sudygimas ir daigų įsitvirtinimas upės substrate yra gana ribotas. Reikia paminėti, kad daugumai *Batrachium* rūšių yra būdinga kleistogamija, kuri, kaip pastebi kai kurie kiti autoriai, dažnai priklauso nuo aplinkos sąlygų (Zalewska-Gałosz ir kt., 2014). Be to, tirtos *Batrachium* genties Lietuvos upių populiacijos yra gana fragmentiškos ir mažos. Pagal herbariumuose esančių *Batrachium* pavyzdžių augaviečių nuorodas patikrinus 56 vietas, tik 16-oje iš jų buvo rasti *Batrachium* augalai. Tai rodo galimą šių rūšių nykimo tendenciją. Todėl galima manyti, kad nedidelę genetinę įvairovę lemia, būtent, inbrydingas ir genetiškai artimų individų kryžminimasis *B. penicillatum* s.l ir *B. trichophyllum* mažose populiacijose.

Hierarchinės molekulinės genetinės įvairovės analizės rezultatai parodė, kad didžiausia genetinė įvairovė yra tarp populiacijų dviejų nustatytų

Batrachium grupių viduje, daug mažesnė – tarp rūšių, ir ypač maža populiacijų viduje (11 lentelė). Taigi, gauti rezultatai patvirtina, kad tirtos *Batrachium* populiacijos yra genetiškai diferencijuotos (Triest ir kt., 2010). Yra paskelbta nemažai tyrimų rezultatų, kuriais remiantis daroma prielaida, kad periferinės populiacijos yra mažesnės ir labiau izoliuotos nei centrinės arealo dalies (apibendrinta Eckert ir kt., 2008). Mažas ir izoliuotas populiacijas dažnai veikia genų dreifas ir sumažėjęs genų srautas, dėl to didėja populiacijų genetinė diferenciacija (Nei ir kt., 1975). Didelės genetinės diferenciacijos (F_{ST}) reikšmės rodo, kad genų dreifas nusveria genų srauto poveikį ir sukelia populiacijų izoliaciją (Joyce, Pullin, 2003; Durka ir kt., 2017). Genetinę diferenciaciją didina ir taksonominis *Batrachium* heterogeniškumas (Wiegleb ir kt., 2017). Didelis genetinės diferenciacijos laipsnis buvo nustatytas ir tarp *Batrachium bungei* populiacijų, augančių Kinijos Hengduan kalnų upėse (Wang ir kt., 2010). Genų dreifas veikia visą augalo genomą, t. y. ne tik fenotipiškai neutralius ISSR lokusus, bet ir genus, darančius įtaką individų vaisingumui ir prisitaikomumui. Todėl molekulinį žymenų įvairovės sumažėjimas gali rodyti ir ekologiškai svarbių požymių kintamumo praradimą.

PCoA ir STRUCTURE analizės rezultatai taip pat koreliuoja su morfologinių tyrimų rezultatais. Naudojant šiuos abu metodus buvo stebimas tų pačių populiacijų suskirstymas į dvi grupes (34 pav., 35 pav.), kurios atitinka skirtingas *Batrachium* rūšis. STRUCTURE, kaip ir PCoA bei NMDS analizės rezultatai, taip pat parodė susiskirstymą į mažesnius klasterius šių dviejų grupių viduje (36 pav.). Tai dar kartą patvirtino *Batrachium* taksonominį sudėtingumą. Reikia pažymėti, kad STRUCTURE analizė neparodė rūšių aiškių tarpusavio hibridizacijos požymių, išskyrus keletą, galimai hibridinės kilmės, Grūdos, Merkio, Neries ir Vilnios populiacijų individų (35 pav., 36 pav.). Tokių individų minėtose populiacijose buvimas gali būti laikomas genų srauto tarp rūšių rezultatu (Tovar-Sánchez ir kt., 2012). Ankstesni morfologinių ir DNR žymenų tyrimų rezultatai patvirtina, kad hibridizacija tarp skirtingų *Batrachium* rūšių yra gana dažna (Cook, 1966; Zalewska-Gałosz ir kt., 2014, Bobrov ir kt., 2015), tačiau Bradley ir kt. (2013)

Airijoje atliktų tyrimų metu nenustatė tiesioginių *B. fluitans* ir *B. penicillatum* s.l. hibridizacijos požymių. Kaip minėta anksčiau, mūsų gauti molekuliniai tyrimų rezultatai taip pat neparodė akivaizdžių hibridinių populiacijų Lietuvos upėse įrodymų.

Kadangi *B. penicillatum* s.l. yra heterogeniška ir taksonomiškai sudėtinga grupė (Zalewska-Gałosz ir kt., 2014), jos taksonominis identifikavimas reikalauja įvairių metodų panaudojimo. Dėl šios priežasties buvo atlikta dviejų DNR regionų (*trnH-psbA* ir *ITS1-ITS4*) sekoskaita. Vienas iš informatyviausių *Batrachium* rūšies brūkšninių kodų yra cpDNR *trnH-psbA* regionas (Telford ir kt., 2011). Ši chloroplastų genomo seka yra dažnai naudojama ir kitų augalų rūšių molekuliniam taksonominiam tyrimams (Fazekas ir kt., 2008; Nithaniyai, Parani, 2016; Wang ir kt., 2016; Abubakar ir kt., 2017). Atlikę mūsų apibūdintų *B. fluitans* individų *trnH-psbA* regiono sekoskaitą, nustatėme, kad ši seka visiškai sutampa su GenBank® esančia *Ranunculus fluitans* (GenBank® Nr. HQ894440.1) seka. *B. fluitans* taip pat buvo identifikuota atlikus *ITS* regiono sekoskaitą. Tiriant *B. penicillatum* s.l. grupės individų cpDNR buvo aptikti du skirtingi šio regiono haplotipai. Vienas haplotipas buvo panašus į *R. trichophyllus* (Telford ir kt., 2011), o kitas – labai panašus į *R. penicillatus* subsp. *pseudofluitans* (Telford ir kt., 2011). Kadangi *Batrachium trnH-psbA* regiono informatyvumas taksonominiu požiūriu yra ribotas, t. y. negali diferencijuoti visų rūšių (Telford ir kt., 2011), tai gautus rezultatus nereikėtų vertinti kaip galutinius. Kita vertus, cpDNR regiono sekoskaita taip pat patvirtina *B. penicillatum* s.l. taksonominį sudėtingumą. Dar sudėtingesnė situacija yra analizuojant šios augalų grupės rDNR *ITS1-ITS4* regiono sekoskaitos rezultatus. Remiantis *ITS1-ITS4* regiono sekoskaitos rezultatais galima atskirti *B. pseudofluitans*, tačiau kitų rūšių rDNR sekoskaita nedavė tokių vienareikšmių atsakymų. Buvo nustatyti du *B. trichophyllum* rūšies ribotipai, iš kurių vienas būdingas Rospudos upės augalams, o kitas – Viešvilės. Šiuos skirtumus nulėmė keletas nukleotidų pakaitos. Viešvilės upėje surinktiems augalams buvo būdingas padidėjęs bendras augalo plaukuotumas, kuris yra svarbus *B. trichophyllum* požymis. Reikia atkreipti dėmesį į tai, kad

Bobrov ir kt. (2015) nustatė *R. trichophyllus* ribotipų įvairovę. Šie autoriai, atlikę tyrimus Skandinavijoje ir greta esančiuose Rusijos rajonuose, aprašė net penkis šios rūšies augalų *ITS* rajono ribotipus. Likusiems *B. penicillatum* grupės individams nustatyti šeši ribotipai, iš kurių trys buvo unikalūs. Šie sekoskaitos duomenys patvirtina PCoA ir NMDS rezultatus, kurie rodo, kad minėta kurklių grupė yra heterogeniška ir taksonomiškai nevienalytė. Be to, kaip ir *B. trichophyllum* (*R. trichophyllus*) atveju, galimas vidurūšinis polimorfizmas. Jį gali nulemti, ypač kurklių atveju, ne tik mutacijos ar vidurūšinė divergencija, bet ir tarprūšinė hibridizacija (Zalewska-Gałosz ir kt., 2014; Wiegleb ir kt., 2017). Panašius rezultatus gavo Bobrov ir kt. (2015), kurie taip pat atliko *Batrachium* genties augalų minėto regiono sekoskaitą. Ypač polimorfiška buvo šių autorių ištirta *R. schmalhausonii* rūšis, kurioje buvo nustatyti net 28 ribotipai. Aptarti rezultatai rodo, kad *B. penicillatum* s.l. yra labai heterogeniškas taksonas, kuris apjungia ne tik kelis vidurūšinius taksonus, bet ir galimus tarprūšinius hibridus. Manoma, kad morfologinių požymių kintamumas (arba kai kurių požymių nebuvimas), tinkamų filogenetinių žymenų trūkumas ir kitos priežastys apsunkina šio taksono identifikaciją, todėl, galbūt, nepakanka kelių regionų sekoskaitos norint identifikuoti *B. penicillatum* s.str. (Telford ir kt., 2011).

Vienas iš svarbiausių biologinės įvairovės išlikimą lemiančių veiksnių yra organizmų genetinė įvairovė, kuri sudaro jiems galimybę prisitaikyti prie besikeičiančių aplinkos sąlygų. Mūsų nustatyta maža daugumos tirtų *Batrachium* populiacijų genetinė įvairovė kelia grėsmę šių augalų išlikimui, nes santykinai mažose populiacijose gali pasireikšti ir žalingi aleliai, dėl kurių sumažėja populiacijos individų galimybė prisitaikyti prie besikeičiančių aplinkos sąlygų ir padidėja išnykimo rizika (Reed, Frankham, 2003). Tačiau, iš kitos pusės, yra sunku nustatyti atskaitos tašką, nuo kurio būtų galima vertinti populiacijų įvairovės pokyčius (Taylor ir kt., 1994; Steinber, Jordan, 1998). Nėra pakankamai informacijos apie tai, kokia kurklių genetinė įvairovė buvo Lietuvoje prieš 100, 50 ar net 20 metų. Maža genetinė įvairovė, aukštas genetinės diferenciacijos laipsnis ir mažas genų srautas tarp skirtingose

Lietuvos upėse esančių *Batrachium* rūšių populiacijų, vis dėlto, rodo, kad turėtų būti kreipiamas didesnis dėmesys į šiuos augalus ir siūlomi būdai šioms rūšims išsaugoti, jų populiacijų tvarumui užtikrinti. Nors buveinės su *Batrachium* genties rūšimis yra saugomos visoje Europoje, ypatingas dėmesys turėtų būti skiriamas būtent *Batrachium* rūšims, kurios yra šių bendrijų pagrindinis komponentas. Deja, buveinių apsauga negarantuoja rūšių genetinės įvairovės išsaugojimo gal tą įvairovės konvenciją pacituoti. Dėl šios priežasties, remdamiesi tyrimų rezultatais parengėme rekomendacijas *Batrachium* genties rūšims išsaugoti ir pateikėme jas Aplinkos ministerijai. Buvo padaryta išvada, kad *B. fluitans* turėtų būti įtraukta į saugomų rūšių sąrašą ir kai kurios upių atkarpos su minėtos rūšies augalais turėtų būti saugomos reglamentuojant veiklos apribojimus jose.

4.3. Bendrijų su *Batrachium* rūšimis floristinė sandara, aplinkos sąlygos ir antropogeninio poveikio joms įtaka

Sunkumai, kurie iškyla identifikuojant upines *Batrachium* genties rūšis, yra glaudžiai susiję su sunkumais, nustatant augalų bendrijas su skirtingomis šios genties rūšimis. Kalbant apie aukštesnio lygio sintaksonominę priklausomybę, bendrijos su *Batrachium* genties rūšimis yra priskirtos sąjungai *Batrachion fluitantis* Neuhausl 1959, eilei *Callitricho hamulatae-Ranunculetalia aquatilis* Passarge ex Theurillat ir kt. 2015, klasei *Potamogetonetea* Klika in Klika, Novak 1941 (Mucina ir kt., 2016). Tačiau identifikuoti bendrijas su *Batrachium* rūšimis pagrindinio rango – asociacijos, lygmenyje yra gana sudėtinga (Wiegleb, Herr, 1985). Pagal senesnius duomenis *Ranunculetum fluitantis* asociacija apima bendrijas ir su *B. fluitans*, ir su *B. penicillatum* s.l. rūšimis (Oberdorfer, 1977). Tačiau vėliau buvo išskirtos atskiros asociacijos su *B. penicillatum* s.str. bei *B. pseudofluitans* (Dethioux, Noirfalise, 1985).

Batrachion fluitantis sąjungai priklausančiose bendrijose dažniausiai vyrauja *Batrachium* genties augalai. Šios bendrijos įsikuria tose vietose,

kuriose stipri vandens srovė. Dėl atitinkamų aplinkos sąlygų (stiprios srovės, dažno užpavėsinimo), šios bendrijos nepasižymi rūšių gausa, augalai dažniausiai dauginasi vegetatyviškai (Spink ir kt., 1997; Lumbreras ir kt., 2014). Greita srovė daro įtaką ne tik *Batrachium*, bet ir kitų augalų morfologijai. Šie augalai išaugina pailgus, siaurus povandeninius lapus (pvz.: *Stuckenia pectinata* f. *interrupta*, *Potamogeton perfoliatus* f. *cordato-lanceolatus*); upės vagoje pasitaiko panirusios amfibinių augalų formos (pvz.: *Berula erecta*, *Callitriche cophocarpa*, *Veronica anagallis-aquatica*) ir upinės helofitų formos (*Agrostis stolonifera* f. *submersa*, *Butomus umbellatus* f. *vallisneriifolius*, *Sagittaria sagittifolia* f. *valisneriifolia*, *Schoenoplectus lacustris* f. *fluitans*, *Sparganium emersum* f. *fluitans*, *S. erectum* f. *fluitans*). Dažnai *Batrachion fluitantis* sąjungai priklausančių augalų bendrijų rūšinė sudėtis įvairiose skirtingų šalių upėse yra labai panaši (Rich, Jermy, 1998; Hatton-Ellis, Grieve, 2003; Haslam, 2006), tačiau mūsų tyrimai parodė, kad Lietuvoje esančios bendrijos skiriasi nuo kitų autorių aprašytų tuo, kad jose negausu *Callitriche* genties rūšių. Šios genties rūšių paplitimo arealai nepasiekia Lietuvos teritorijos. Vienintelė rūšis, kuri buvo aptikta tirtose upėse, buvo *C. cophocarpa*. Didelį *Sparganium* genties augalų ir *Cladophora* genties dumblių gausumą bendrijose su *Batrachium* rūšimis galima paaiškinti žemu upės vandens lygiu arba maisto medžiagų kiekio padidėjimu upės vandenyje. Remiantis mūsų tyrimais ir herbariumo pavyzdžių analizės rezultatais galima teigti, kad *Ranunculetum fluitantis* asociacija yra labiausiai paplitusi Lietuvos upėse, ypač Neryje ir jos intakuose. Reikia pastebėti, kad šiai asociacijai priklausančios bendrijos savo rūšine sudėtimi labiausiai skiriasi nuo kitose Europos vietose aprašytų bendrijų (Oberdorfer, 1977; Dethioux, Noirfalise, 1985; Šumberová, 2011), kadangi jose neaptiktos kitos *Batrachium* rūšys (*B. penicillatum*, *B. trichophyllum* ir kt.). *Stuckenia pectinata* ir *Potamogeton* genties rūšys kartu su *B. fluitans* dažniausiai buvo aptinkamos didelėse upėse įsikūrusiose bendrijose, o tokios rūšys kaip *Callitriche cophocarpa*, *Fontinalis antipyretica*, *Lemna trisulca* ir *Elodea canadensis* – mažose ir vidutinėse upėse. Kai kuriose upėse *Ranunculetum fluitantis* asociacijai priklausančios

bendrijos vyravo visoje upės vagoje, tačiau dažniausiai jos sudarė mozaiką su bendrijomis, kurias formuoja kiti augalai.

Ranunculetum pseudofluitantis priskirtos bendrijos buvo aptiktos tik vienoje, Tatulos, upėje. Šią bendriją preliminariai pavadinome *Ranunculetum pseudofluitantis*, tačiau validžiai neaprašome kaip asociacijos, nes manome, kad jos rūšių sudėtis turėtų būti nustatyta, remiantis aprašymais iš mažiau antropogenizuotų augimviečių. Šių bendrijų nebuvo galima priskirti kitoms asociacijoms, nes, pavyzdžiui, aprašytos Pirėnų pusiasalyje esančios *Callitricho brutiae-Ranunculetum pseudofluitantis* Pizarro & Rivas-Martínez 2002, *Callitricho lusitanicae-Ranunculetum pseudofluitantis* Melendo, Cano & Valle 2003 asociacijos pagal rūšių sudėtį skiriasi nuo mūsų aprašytų. Pirmiausia, kaip jau buvo minėta, Lietuvos upėse tirtose bendrijose aptinkama tik viena praujėnių rūšis *Callitriche cophocarpa*, kai tuo tarpu – *C. lusitanica* ir *C. brutia*, dažnos bendrijose su *B. pseudofluitans* piečiau Lietuvos (Rivas-Martínez, ir kt., 2002; Melendo ir kt., 2003). Be to, *Callitricho brutiae-Ranunculetum pseudofluitantis* priklausančios bendrijos yra paplitusios oligotrofiniuose tekančio vandens telkiniuose, kuriems būdingas neutralus ar rūgštinis pH (Rivas-Martínez ir kt., 2001, 2002), o Didžiojoje Britanijoje *Ranunculus penicillatus* ssp. *pseudofluitans* bendrijos paplitusios mezotrofiniuose ir eutrofiniuose vandens telkiniuose (Rodwell, 1995). Būtent dėl ekologinių sąlygų panašumo Lietuvos ir Didžiosios Britanijos *Ranunculus penicillatus* ssp. *pseudofluitans* bendrijose aptinkamos tos pačios augalų rūšys (*Stuckenia pectinata*, *Berula erecta* ir *Elodea canadensis*) (Rodwell, 1995). Lietuvoje šio tipo bendrijose vyraujanti po vandeniu panirusių helofitų gausa rodo žemą upių vandens lygį augalų vegetacijos laikotarpiu ir organinių nuosėdų kaupimąsi, ypač upių vingiuose. Manoma, kad šiauriau Lietuvos esančios augalų bendrijos su *B. pseudofluitans* turi būti priskiriamos kitai asociacijai nei paplitusios piečiau Lietuvos. Tačiau tiksliam bendrijos tipo iki smulkesnio sintaksonominio vieneto apibūdinimui būtina atlikti išsamesnius tyrimus tose vietose, kuriose antropogeninis poveikis yra minimalus.

Kaip jau buvo minėta anksčiau, vienas iš svarbiausių aplinkos veiksnių, lemiančių *Batrachium* genties augalais turtingų bendrijų formavimąsi, yra vandens srovė. Wade ir kt. (2002) pabrėžė, kad srovė gali tiesiogiai (išplauti augalus) ir netiesiogiai (pašalinti epifitus) veikti upėje augančius, ypač panirusius, augalus. *Ranunculetum fluitantis* bendrijos būdingos didesnėms upėms (Cook, 1962; Rodwell, 1995), tačiau jas taip pat galima rasti ir mažuose srauniuose upeliuose (Pott, 1995). Lietuvoje šios bendrijos buvo aptinkamos įvairaus dydžio upėse. Manoma, kad *Batrachium fluitans* bendrijų įsikūrimui būtina stipri srovė. *Ranunculetum pseudofluitantis* bendrijos buvo aptiktos Tatulos upėje, esančioje moreninėje lygumoje (gipso karsto regione), todėl augalų vegetacijos laikotarpiu šiai upei būdingi dideli vandens lygio svyravimai. Upių atkarpose, kuriose įsikūrę *Ranunculetum pseudofluitantis* bendrijos, srovė buvo mažesnė palyginti su upių atkarpomis, kuriose vyravo *Ranunculetum fluitantis* bendrijos. Cook (1966) nurodė, kad substrato fizinė sudėtis, bet ne vandens hidrochemija, yra *Batrachium fluitans* bendrijas limituojantis veiksnys. Lietuvoje *Ranunculetum fluitantis* bendrijos aptinkamos upėse su patvariu (smėlio, žvyro, akmenuotu) substratu, o *Ranunculetum pseudofluitantis* bendrijos įsikūrę upėse, kur vyrauja minkštos molio nuosėdos, susimaišiusios su akmenimis. Litologija yra labai svarbi upių klasifikavimui (Lumbreras ir kt., 2009), o tuo pačiu ir skirtingų augalų rūšių bei jų formuojamų bendrijų paplitimui. Aplinkos sąlygų įvertinimas leido atskirti bendrijas su dviem skirtingomis *Batrachium* rūšimis. *Ranunculetum pseudofluitantis* bendrijos buvo aptinkamos tik vienoje kalkingoje šiaurės Lietuvos upėje, kurioje buvo nustatytos aukštos savitojo elektrinio laidžio ir šarmingumo vertės. Taip pat, reikia pastebėti, kad šios upės vandenyje buvo nustatyta didesnė azoto junginių koncentracija. Tai galima būtų paaiškinti tuo, kad šiaurės Lietuvoje yra nemažai šalia upių vagų esančių intensyvios žemdirbystės plotų. Didžiojoje Britanijoje *B. pseudofluitans* bendrijos taip pat yra aptinkamos tik kalkingose upėse, kurių vanduo pasižymi aukštomis savitojo elektrinio laidžio ir šarmingumo vertėmis (Rodwell, 1995; Spink ir kt., 1997; Hatton-Ellis, Grieve, 2003; Poynter, 2014). Danijoje *B. pseudofluitans*

aptinkama srauniose upėse su moreniniu molingu substratu (Dahlgren, Jonsell, 2001).

Ranunculetum fluitantis bendrijos dažniausiai buvo aptinkamos pietryčių Lietuvos upėse, kurių vandens šarmingumas buvo dvigubai mažesnis ir daug mažesnė azoto junginių koncentracija palyginti su upėmis, kuriose įsikūrusios *Ranunculetum pseudofluitantis* bendrijos. Pagal Rodwell (1995), *Ranunculetum fluitantis* asociacija dažniausiai aptinkama vidutinį maisto medžiagų kiekį turinčiose upėse. Tačiau Pott (1995) nurodė žymiai didesnius upių su *Ranunculetum fluitantis* bendrijomis kalkingumo ir trofiškumo intervalus, nuo kalkingų iki nekalkingų, nuo mezotrofinių iki eutrofinių. Cook (1966) pabrėžė, kad *R. fluitans* yra pakankamai tolerantiška taršai tol, kol vanduo išlieka skaidrus. Manoma, kad maistinių medžiagų padidėjimas upės vandenyje tiesiogiai ar netiesiogiai daro įtaką *Batrachium* rūšių gausumui ir makrofitų bendrijų floristinei sandarai.

Batrachium bendrijoms įtakos turi ir kiti veiksniai, pavyzdžiui, rekreacija. Populiarėjant vandens turizmui, kyla pavojus *Batrachium* formuojamoms bendrijoms, nes didžiausi baidarių srautai praplaukia žydėjimo ir vaisių brandinimo metu. Rekreacijos, ypač plaukimo įvairaus tipo priemonėmis, poveikis upių augalijai netiriamas ne tik Lietuvoje, bet, sprendžiant pagal tokių duomenų publikavimą, mažai tiriamas ir kitose šalyse. Šis poveikis dažnai vertinamas pagal išrautų ar nuplėštų augalų kiekį arba padidėjusį vandens drumstumą (Hilton, Phillips, 1982). Įvertinus baidarių daromą poveikį *Batrachium* augalams Ūlos upėje, buvo pastebėta, kad neigiamas rekreacijos, konkrečiai plaukimo baidarėmis, poveikis aiškiausiai pasireiškia dėl mechaninio poveikio augalams. *Batrachium* augalų žydėjimo ir sėklų brandinimo metu liepos ir rugpjūčio mėnesiais vyksta intensyvus plaukimas, todėl sėklų subrendimas gali būti sutrikdytas, ypač tuomet, kai antropogeninis poveikis sutampa su šviesos trūkumu. Kurklės sėkmingai dauginasi vegetatyviniu būdu, todėl atrodytų, kad mechaninis augalų susmulkinimas tik padeda atitrūkusioms augalų dalims plačiau pasklisti ir įsitvirtinti kitose upės vagos vietose. Tačiau pastebėta, kad lengviausiai išsirauna ir pasklinda ne

Batrachium augalai ar jų dalys, o svetimžemė rūšis *Elodea canadensis*. Ji lengvai užima ir labai užpavėsintas upės vagos dalis, kuriose *Batrachium* augalai sunkiai auga, o atneštos ir užsilaikiusios *Batrachium* bendrijose *Elodea canadensis* įsivysta ir nustelbia kurkles. Siauroje ir sekloje upės vagoje iškylautojai irkluodami, aplenkdami kliūtis, stodami pakrantėse gali išjudinti seklumą, priekrančių dugno nuosėdas. Vingiuotose atkarpose priekrantės zonos tampa dumblingų sąnašų kaupimosi, o taip pat ir augalų augimo vieta, tačiau tokiose vietose dažniausiai įsivysta nereiklios šviesai *Elodea canadensis*, *Potamogeton crispus* bei *Stuckenia pectinata*. Padidėjęs įvairios kilmės organinių medžiagų kiekis kaupiasi ir minėtose upių sraunuose su *Batrachium* bendrijomis. O tokių sankaupų vietose įsigali *Elodea canadensis*, *Potamogeton crispus* ir *Stuckenia pectinata*, kurios ilgainiui įsivysta ir nustelbia *Batrachium*.

Apibendrinus augalų bendrijų su *Batrachium* rūšimis tyrimų rezultatus galima teigti, kad šių bendrijų sintaksonominiai tyrimai turi būti tęsiami toliau, pirmiausia tiksliai identifikuojant bendrijose aptinkamas *Batrachium* rūšis. Visoje Europoje saugomos „Upių sraunumos su kurklių bendrijomis“ yra svarbios, tačiau jų saugojimas neteks prasmės, jeigu neliks pagrindinio šių bendrijų komponento. Remdamiesi mūsų tyrimo rezultatais rekomenduojame nedidinti plaukimo apkrovų vasaros laikotarpiu, o esant labai žemam vandens lygiui sumažinti baidarėmis ir kitomis priemonėmis plaukiančiųjų srautą liepos ir rugpjūčio mėnesiais upėse su kurklių bendrijomis.

IŠVADOS

1. Nustatyti statistiškai reikšmingi *Batrachium* genties augalų morfologiniai požymiai (vidutinis vainiklapių ilgis, antrojo ir šeštojo lapo ilgis, žiedsosčio plaukuotumas), kuriais remiantis *Batrachium fluitans* patikimai atsiskiria nuo taksonomiškai heterogeniškos grupės, kurią sudaro *B. penicillatum* s.l. ir *B. trichophyllum*.
2. *Batrachium* genties rūšių populiacijoms būdinga maža genetinė įvairovė ir didelė diferenciacija ($F_{ST} = 0,9$). Tai rodo didesnę genų dreifo poveikį populiacijoms palyginti su genų srauto įtaka ir dėl to didėjančią populiacijų izoliaciją.
3. Labai maža genetinė ir genotipinė įvairovė, nedidelis genotipų skaičius arba net vieno genotipo paplitimas *Batrachium fluitans* populiacijose ir sėklų nesubrandinimas rodo, kad šios rūšies populiacijose vyrauja nelytinis dauginimasis. Tai rodo, kad Lietuvoje *B. fluitans* auga nepalankiomis sąlygomis ir ją rekomenduojama įtraukti į saugomų rūšių sąrašą.
4. ISSR polimorfizmo tyrimų rezultatai rodo, kad kiekvienoje ištirtoje Lietuvos upėje yra savita *Batrachium* populiacijų genotipinė įvairovė, kurią galima vertinti kaip genų dreifo pasekmę.
5. *Batrachium* genties augalų morfologinių ir molekulinų žymenų (ISSR) analizės, chloroplastų DNR (*trnH-psbA* regiono) bei branduolio rDNR (*ITS1-ITS4* regiono) sekoskaitos rezultatai rodo, kad tirtose Lietuvos upėse paplitusios *B. fluitans*, *B. pseudofluitans*, *B. trichophyllum* ir galimai *B. penicillatum* s.str. rūšys bei hibridai.
6. Bendrijos su morfologiškai panašiomis rūšimis *Batrachium fluitans* (*Ranunculetum fluitantis*) ir *B. pseudofluitans* (*Ranunculetum pseudofluitantis*) skyrėsi pagal floristinę sandarą – *Ranunculetum fluitantis* pasižymėjo didesne *Potamogetonion* sąjungos rūšių įvairove ir

platesniu paplitimu. Regioniniu požiūriu abi bendrijos skyrėsi nuo kitose šalyse aprašytų mažesne *Callitriche* rūšių įvairovė.

7. Nustatyti statistiškai reikšmingi skirtumai tarp bendrijų su abejomis rūšimis. *B. pseudofluitans* ir bendrijos su šia rūšimi paplitusios vandenyse su žymiai mažesniu srovės greičiu, didesniu šarmingumu, savituoju elektriniu laidžiu ir didesne azoto junginių koncentracija, būdinga šiaurės Lietuvos regionui.
8. Vandens turizmas daro neigiamą poveikį *Batrachium* augalų gausumui Ūlos upėje, todėl rekomenduojama riboti vandens transporto srautą šioje upėje liepos ir rugpjūčio mėnesiais.

MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS

PUBLIKACIJOS

Mokslinės informacijos instituto duomenų bazėje *Clarivate Analytics Web of Science*:

Butkuvienė J., Sinkevičienė Z., Naugžemys D., Patamsytė J., Žvingila D., 2017: Genetic diversity of *Batrachium* (Ranunculaceae) species reveals the necessity of their protection in Lithuanian rivers. – *Aquatic Botany*, 142: 61–70.

Moksliniai straipsniai recenzuojamuose leidiniuose:

Butkuvienė J., Sinkevičienė Z., Žvingila D., 2014: *Batrachium* (Ranunculaceae) in the rivers of Lithuania. – *Botanica Lithuanica*, 20 (1): 46–56.

Butkuvienė J., Sinkevičienė Z., Naugžemys D., Patamsytė J., Žvingila D., 2017: Vandens turizmo poveikis kurklių (*Batrachium*) bendrijų stabilumui. – *Žmogaus ir gamtos sauga*, 2017: 122–124.

Mokslo populiarinimo straipsniai:

Butkuvienė J., Žvingila D., 2015: Kurklės (*Batrachium*) Lietuvos upėse: augalų likimas mūsų rankose. – *Žurnalas apie gamtą*, 5/6: 34–36.

KONFERENCIJOS

Butkuvienė J., Sinkevičienė Z., Žvingila D., 2014. Genetic diversity of water crowfoot species in some Lithuanian rivers. – *Vital Nature Sign* – Kaunas.

Butkuvienė J., Sinkevičienė Z., Žvingila D., 2014. Peculiarities of water crowfoot distribution in the rivers of Lithuania. – *Современное состояние*,

тенденции развития, рациональное использование и сохранение биологического разнообразия растительного мира – Minsk, Baltarusija.

Butkuvienė J., Sinkevičienė Z., Žvingila D., 2014. Morfologiniai požymiai *Batrachium* (DC.) Gray taksonomijoje. – Mokslas gamtos mokslų fakultete – Vilnius.

Butkuvienė J., Sinkevičienė Z., Naugžemys D., Žvingila D., 2016. *Batrachium* species in different trophical state rivers. – Ecological sustainability engineering change – Montpellier, Prancūzija.

Butkuvienė J., Sinkevičienė Z., Naugžemys D., Žvingila D., 2016. Morphological comparison of some riverine *Batrachium* species. – Vital Nature Sign – Vilnius.

KITA VEIKLA

2016 m. buvo perskaitytas pranešimas „Vandens turizmo įtaka Europinės svarbos kurklių bendrijų tvarumui“ Valstybinėje saugomų teritorijų tarnyboje.

2017 m. buvo skaitytas pranešimas „*Batrachium* formuojamų bendrijų svarba vandens ekosistemose. Saugokime tai, ką turime“ Žiežmarių mokykloje.

Pateiktos rekomendacijos Aplinkos ministerijai įtraukti *B. fluitans* į saugomų rūšių sąrašus ir parengti priemones *Batrachium* genties rūšių bendrijoms išsaugoti.

PADEKA

Nuoširdžiai dėkoju savo darbo vadovui prof. dr. Donatui Žvingilai už pasitikėjimą ir galimybę atlikti tyrimus, už pastovią pagalbą ir palaikymą visą doktorantūros laikotarpį.

Taip pat, nuoširdžiai dėkoju savo darbo konsultantui dr. Donatui Naugžemiui už pagalbą, pastangas ir neįkainojamas konsultacijas tyrimų bei disertacijos rengimo metu.

Ypatingai dėkoju dr. Zofijai Sinkevičienei už įskiepytą meilę vandens augalams, už patarimus, visokeriopą pagalbą ir vertingas konsultacijas, už tikėjimą manimi, palaikymą ir nuolatinį skatinimą žengti pirmyn.

Nuoširdžiai dėkoju darbo recenzentėms dr. Violetai Kleizaitei ir dr. Ilonai Jukonienei už skirtą laiką skaitant disertaciją, už išsamią darbo analizę, vertingas pastabas ir naudingus patarimus.

Dėkoju dr. Jolantai Patamsytei už jaukią atmosferą kabinete ir smagias išvykas gamtoje, už palaikymą kritinėmis valandomis, už patarimus ir pagalbą tyrimų metu, už nuoširdų ir šiltą bendravimą.

Taip pat, norėčiau padėkoti dr. Virginijai Tunaitienei už pagalbą laboratorijoje tyrimų metu; Domui Uogintui, Sigitui Juzėnui už nuoširdų bendravimą ir vertingas konsultacijas. Dėkoju dr. Eglei Čėsnienei, dr. Raimondui Šiukštai, Nijolei Gudavičienei ir visiems likusiems kurių nepaminėjau, tačiau kas dieną laboratorijoje mačiau Jūsų šypsenas, dėkui už tą atmosferą kurioje buvo gera dirbti.

Už vertingas konsultacijas ir geranorišką bendradarbiavimą dėkoju, Dzūkijos nacionalinio parko Gamtos skyriaus vedėjui, dr. Mindaugui Lapelei.

Galiausiai, dėkoju savo šeimai, be kurių paramos, paskatinimo ir besąlygiško palaikymo ši disertacija nebūtų išvydusi dienos šviesos.

Antropogeninio poveikio kai kurių Lietuvos upių ekosistemų augalijos komponento stabilumui tyrimus remia Lietuvos mokslo taryba (projekto nr. SIT-2/2015).

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Abraham M.E., Ganopoulos I., Giagourta P., Osathanunkul M., Bosmali I., Tsaftaris A., Papaioannou A., Madesis P., 2015. Genetic diversity of *Lotus corniculatus* in relation to habitat type, species composition and species diversity. *Biochemical Systematics and Ecology*, 63: 59–67.
- Abubakar B.M., Salleh B.M., Shasir O., Wagiran A., 2017. Review: DNA barcoding and chromatography fingerprints for the authentication of botanicals in herbal medicinal products. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017: ID 1352948, 28 pages <https://doi.org/10.1155/2017/1352948>.
- Apalia D., Lekavičius A., 1961. Kurklė – *Batrachium*. In: Lekavičius A. (red.), *Lietuvos TSR Flora*. Vilnius. 3: 409–414.
- Archak S., Gaikwad A.B., Gautam D., Rao E.V.V.B., Swamy K.R.M., Karihaloo J.L., 2003. Comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR and AFLP) for genetic analysis of cashew (*Anacardium occidentale* L.) accessions of India. *Genome*, 46: 362–369.
- Archibald J.K., Crawford D.J., Santos-Guerra A., Mort M.E., 2006. The utility of automated analysis of inter-simple sequence repeat (ISSR) loci for resolving relationships in the Canary Island species of *Tolpis* (Asteraceae). *American Journal of Botany*, 93(8): 1154–1162.
- Arnot D.E., Roper C., Bayoumi R.A.L., 1993. Digital codes from hypervariable tandemly repeated DNA sequences in the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite gene can genetically barcode isolates. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 61:15–24.
- Baldwin B.G., Sanderson M.J., Porter J.M., Wojciechowski M.F., Campbell C.S., Donoghue M.J., 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on Angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 82: 247–277.

- Beatty G.E., McEvoy P.M., Sweeney O., Provan J., 2008. Range-edge effects promote clonal growth in peripheral populations of the one-sided wintergreen *Orthilia secunda*. *Diversity and Distributions*, 14: 546–555.
- Bhagwat R.M., Banu S., Dholakia B.B., Kadoo N.Y., Lagu M.D., Gupta V.S., 2014. Evaluation of genetic variability in *Symplocos laurina* Wall. from two biodiversity hotspots of India. *Plant Systematics and Evolution*, 300(10): 2239–2247.
- Bobrov A.A., 2003. Šelkovniki (*Batrachium* (DC.) S.F. Gray, Ranunculaceae) evropeiskoj časti Rossii i ich sistematika. In: Papchenkov V.G., Bobrov A.A., Scherbakov A.V. Lisitsyna L.I. (eds.) *Gidrobotanika: metodologiya, metody: Materialy Shkoly po gidrobotanike*. Rybinsk, pp. 70–81.
- Bobrov A.A., Zalewska-Gałosz J., Jopek M., Movergoz E.A., 2015. *Ranunculus schmalhauseni* (section *Batrachium*, Ranunculaceae), a neglected water crowfoot endemic to Fennoscandia—a case of rapid hybrid speciation in postglacial environment of North Europe. *Phytotaxonomica*, 233: 101–138.
- Bonin A., Bellemain E., Bronken P., Pompanon F., Brochmann C., Taberlet P., 2004. How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Molecular Ecology*, 13: 3261–3273.
- Bradley C.R., Duignan C., Preston S.J., Provan J., 2013. Conservation genetics of Ireland's sole population of the River water crowfoot (*Ranunculus fluitans* Lam.). *Aquatic Botany*, 107: 54–58.
- Braun-Blanquet J., 1964. *Pflanzensoziologie: Grundzüge der Vegetationskunde*. 3rd ed. Wien: Springer.
- Butkuvienė J., Sinkevičienė Z., Žvingila D., 2014. *Batrachium* (Ranunculaceae) in the rivers of Lithuania. *Botanica Lithuanica*, 20(1): 46–56.
- Camacho F.J, Liston A., 2001. Population structure and genetics diversity of *Botrychium pumicola* (Ophioglossaceae) based on ISSR. *American Journal of Botany*, 88(6): 1065–1070.

- Campbell C.S., Wojciechowski M.F., Baldwin B.G., Alice L.A., Donoghue M.J., 1997. Persistent nuclear ribosomal DNA sequence polymorphism in the *Amelanchier* agamic complex (Rosaceae). *Molecular Biology and Evolution*, 14: 81–90.
- Celka Z., Szczecinska M., Shevera M.V., Sawicki J., 2012. Molecular studies did not support the distinctiveness of *Malva alcea* and *M. excisa* (Malvaceae) in Central and Eastern Europe. *Biologia*, 67(6): 1088–1098.
- Chen Y., Li X., Yin L., Cheng Y., Li W., 2009. Genetic diversity and migration patterns of the aquatic macrophyte *Potamogeton malaianus* in a potamo-lacustrine system. *Freshwater Biology*, 54(6): 1178–1188.
- Cheng T., Chao X., Li L., Changhao L., Yu Z., Zhou S., 2016. Barcoding the kingdom Plantae: new PCR primers for ITS regions of plants with improved universality and specificity. *Molecular Ecology Resources*, 16: 138–149.
- Coart E., Glabeke V.S.V., Petit R.J., Bockstaele V.E.V., Roldan-Ruiz I., 2005. Range wide versus local patterns of genetic diversity in hornbeam (*Carpinus betulus* L.). *Conservation Genetics*, 6: 259–273.
- Colombo C., Second G., Charrier A., 2000. Diversity within American cassava germplasm based on RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology*, 23: 189–199.
- Conner J.K., Hartl, D.L., 2004. A primer of ecological genetics. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Cook C.D.K., 1963. Studies in *Ranunculus* subgenus *Batrachium* (DC.)A.Gray. II. General morphological consideration in the taxonomy of the subgenus. *Watsonia*, 5: 294–303.
- Cook C.D.K., 1966. A monographic study of *Ranunculus* Subgenus *Batrachium* (DC.) A.Gray. *Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München*. 6, 47–237.
- Cook C.D.K., 1975. *Ranunculus* subgenus *Batrachium*. In: Stace, C.A. (Ed.), *Hybridisation and the Flora of the British Isles*. London.
- Cook C.D.K., 1990. *Aquatic plant book*. Dr. W. Junk Publishers, The Hague.

- Coppi A., Lastrucci L., Carta A., Foggi, B., 2015. Analysis of genetic structure of *Ranunculus baudotii* in a Mediterranean wetland. Implications for selection of seeds and seedlings for conservation. *Aquatic Botany*, 126: 25–31.
- Crawford D.J., Sang T., Stuessy T.F., Kim S.C., Silva O., 1998. *Dendroseris* (Asteraceae: Lactuceae) and *Robinsonia* (Asteraceae: Senecioneae) on the Juan Fernandez Islands: Similarities and differences in biology and phylogeny. In T. F. Stuessy and M. Ono [eds.], *Evolution and speciation in island plants*, 97–119. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Dahlgren G., 1992. *Ranunculus* subgenus *Batrachium* on the Aegean Islands and adjacent areas: nectary types and breeding system. *Norden Journal of Botany*, 12: 299–310.
- Dahlgren G., 1993. *Ranunculus penicillatus* in Norden. *Norden Journal of Botany*, 13: 593–605.
- Dahlgren G., 1995. Differentiation patterns in *Ranunculus* subgenus *Batrachium* (Ranunculaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 9: 305–317.
- Dahlgren G., Jonsell B., 2001. *Ranunculus* L. In: Jonsell, B. (Eds.), *Flora Nordica*. Stockholm, pp. 228–293.
- Data of river monitoring 2013–2014 –
<http://vanduo.gamta.lt/cms/index?rubricId=6adeeb1d-c902-49ab-81bb-d64b8bcceffd>.
- Dawson F.H., Robinson W.N., 1984. Submerged macrophytes and hydraulic roughness of a lowland chalkstream. *Limnology*, 22: 1944–1948.
- De Vere N., Rich T.C.G., Ford C.R., Trinder S.A., Long C., Moore C.W., 2012. DNA Barcoding the Native Flowering Plants and Conifers of Wales. *PLoS ONE* 7: e37945.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037945>.
- Dethioux M., Noirfalise A., 1985. Les groupements rheophiles a *Renoncules aquatiques* en moyenne et haute Belgique. *Tuexenia*, 5: 31–39.

- Doyle J.J., Doyle J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11–15.
- Durka W., Michalski S.G., Berendzen K.W., Bossdorf O., Bucharova A., Hermann J.M., Hölzel N., Kollmann J., 2017. Genetic differentiation within multiple common grassland plants supports seed transfer zones for ecological restoration. *Journal of Applied Ecology*, 54: 116–126.
- Eckert C.G., Samis K.E., Lougheed S.C., 2008. Genetic variation across species' geographic ranges: the central-marginal hypothesis and beyond. *Molecular Ecology*, 17: 1170–1188.
- Emadzade K., Lehnebach C., Lockhart P. & Hörandl E., 2010. A molecular phylogeny, biogeography and classification of genera of Ranunculeae (Ranunculaceae). *Taxon*, 59: 809–828.
- Englmaier P., 2016. *Ranunculus* sect. *Batrachium* (Ranunculaceae): Contribution to an excursion flora of Austria and the Eastern Alps. *Neulreichia*, 8: 97–125.
- European Commission, 2007. Interpretation manual of European Union habitats. <http://www.am.lt/VI/files/0.848804001201186746.pdf>.
- Evanno G., Regnault S., Goudet J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure. A simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2611–2620.
- Fahrig L., 2003. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 34: 487–515.
- Fajardo C.G, Vieira F.A, Molina W.F., 2014. Interspecific genetic analysis of orchids in Brazil using molecular markers. *Plant Systematics and Evolution*, 300: 1825–1832.
- Fazekas A.J., Burgess K.S., Kesanakurti P.R., Graham S.W., Newmaster S.G., Husband B.C., Percy D.M., Hajibabaei M., Barrett S.C.H., 2008. Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *PLoS ONE* 3: e2802. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002802>.

- Frankham R., 1996. Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conservation Biology* 66: 1500–1508.
- Gailiušis B., Jablonskis J., Kovalenkoviėnė M., 2001. Lietuvos upės. Hidrografija ir nuotėkis. Kaunas, Lietuvos energetikos institutas.
- Ge X.J., Yu Y., Yuan Y.M., Huang H.W., Yan C., 2005. Genetic diversity and geographic differentiation in endangered *Ammopiptanthus* (Leguminosae) populations in desert regions of northwest China as revealed by ISSR analysis. *Annals of Botany*, 95: 843–851.
- Gilibert J.E., 1782. *Flora Lithuanica inchoata seu enumeratio plantarum. Collectio quinta.* Wilnae, 261–262.
- Gudžinskas Z., 1999. Lietuvos induočiai augalai. 37, Botanikos instituto leidykla.
- Haslam S.M., 2006: River plants of western Europe. Forrest text, Cardigan.
- Hatton-Ellis T.W., Grieve N., 2003. Ecology of water courses characterised by *Ranunculion fluitantis* and *Callitriche-Batrachion* vegetation. Conserving Natura 2000 rivers ecology series No. 11. English Nature, Peterborough.
- Hebert P.D.N., Stoeckle M.Y., Zemplak T.S., Francis C.M., 2004. Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLoS Biol* 2(10): e312. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020312>.
- Henry C.J., 2013. Evolution of DNA marker technology in plants. In C.J. Henry (ed.), *Molecular markers in plants*, 3–19. Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
- Hilton J., Philips G.L., 1982. The effect of boat activity on turbidity in a shallow broadland river. *Journal of Applied Ecology*, 19 (1): 143–150.
- Holmes N.T.H., 1979. A guide to the identification *Batrachian Ranunculus* species of Britain. Chief Scientist's Team Notes 14. NCC, London.
- Hollingsworth P.M, Graham S.W., Little D.P., 2011. Choosing and using a plant DNA barcode. *PLoS ONE* 6(5): e19254. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019254>.
- Hörandl E., Paun O., Johansson J.T., Lehnebach C., Armstrong T., Chen L., Lockhart P., 2005. Phylogenetic relationships and evolutionary traits in

- Ranunculus* s.l. (Ranunculaceae) inferred from ITS sequence analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 36: 305–327.
- Hörandl E., Emadzade K., 2012. Evolutionary classification: A case study on the diverse plant genus *Ranunculus* L. (Ranunculaceae). *Evolution and Systematics*, 14: 310–324.
- Yukawa M., Tsudzuki T., Sugiura M., 2005. The 2005 version of the chloroplast DNA sequence from tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Plant Molecular Biology Reporter*, 23: 359–365.
- Jalas J., Suominen J., 1989. Atlas florae Europaeae, distribution of vascular plants in Europe. Nymphaeaceae to Ranunculaceae. Helsinki, pp. 214–221.
- Janzen D.H., Hallwachs W., Blandin P., Burns J.M., Cadiou J.M., 2009. Integration of DNA barcoding into an ongoing inventory of complex tropical biodiversity. *Molecular Ecology Resources*, 9: 1–26.
- Jopek M., Dąbrowska M., 2014. Searching for SCAR markers needed for diversification of three groups within *Ranunculus trichophyllus* (Ranunculaceae, subgen. *Batrachium*). *Modern Phytomorphology*, 6: 87–88.
- Joyce D.A., Pullin A.S., 2003. Conservation implications of the distribution of genetic diversity at different scales: A case study using the marsh fritillary butterfly (*Euphydryas aurinia*). *Biological Conservation*, 114: 453–461.
- Jundziłł J., 1830. Opisanie roślin w Litwie, na Wołyniu, Podolu i Ukrainie dziko rosnących, jako oswojonych. Wilno.
- Kadota Y., 1996. *Batrachium*. Asahi encyclopedia: The world of plants 93. Asahi Shinbun Company, Tokyo, 274 pp.
- Kelchner S. A., 2000. The evolution of non-coding chloroplast DNA and its application in plant systematics. *Annals of the Missouri Botanical Gardens*, 87: 499–527.
- Kilkus K., Stonevičius E., 2011: Lietuvos vandenų geografija. Vilnius.

- Koga K., Kadono Y., Setoguchi H., 2008. Phylogeography of Japanese water crowfoot based on chloroplast DNA haplotypes. *Aquatic Botany*, 89: 1–8.
- Kress W.J., Erickson D.L., 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *Public Library of Science ONE*, 2, e508.doi:10.1371/journal.pone.0000508.
- Ku Y.B., Oh H.K., Lee J.H., Kong H.Y., Kil J.H., Cho K.H., 2007. Distribution and genetic uniformity of an endangered aquatic plant, *Ranunculus kadzususensis*, in a South Korean rice paddy. *Weed Biology and Management*, 7: 120–123.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33: 1870–1874.
- Kupcinskiene E., Zybartaitė L., Paulauskas A., 2015. Comparison of genetic diversity of three *Impatiens* species from Central Europe and Baltic region. *Zemdirbyste-Agriculture*, 102: 87–94.
- Kuprevičius J. (eds.), 1934. *Vadovas Lietuvos augalams pažinti*. Kaunas.
- Laasimer L., Kuusk V., Tabaka L., Lekavičius A. (eds), 1993. *Flora of the Baltic Countries*. Tartu, 282–289.
- Lambertini C., Gustafsson M.H.G., Baattrup-Pedersen A., Riis T., 2017. Genetic structure of the submerged *Ranunculus baudotii* (sect. *Batrachium*) population in a lowland stream in Denmark. *Aquatic Botany*, 136: 186–196.
- Lansdown R.V., 2007: *The Identity of Ranunculus subgenus Batrachium in the River Itchen*. Environment Agency, Southern Region.
- Laurinavičiūtė L., 2007: *Batrachium* (DC.) Gray genties rūšys Lietuvos tekančiuose vandenyse. (Magistro darbas).
- Lekavičius A., 1989. *Vadovas augalams pažinti*. Vilnius.

- Li Y., Hu Y., Bao R., Shi L., Wang, J., Wang J., Wang L., 2016. Analysis of population structure of *Blysmus sinocompressus* in the Qilian Mountains by ISSR markers. *Aquatic Botany*, 134:54–60.
- Lilley J.H., Chinabut, S., 2000. DNA-based studies on *Aphanomyces invadans*, the fungal pathogen of epizootic ulcerative syndrome (EUS). In: Walker, P., Subasinghe, R. (Eds), *DNA-based molecular diagnostic techniques: research needs for standardization and validation of the detection of aquatic animal pathogens and diseases.*, Bangkok, Thailand pp. 83–87.
- Lynch M., Milligan B.G.M., 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*, 3: 91–99.
- Lumbreras A., Olives A., Quintana J.R., Pardo C., Molina A.J., 2009. Ecology of aquatic *Ranunculus* communities under the Mediterranean climate. *Aquatic Botany*, 90: 59–66.
- Lumbreras A., Navarro G., Pardo C., Molina J.A., 2011. Aquatic *Ranunculus* communities in the northern hemisphere: A global review. *Plant Biosystematics*, 145: 118–122.
- Lumbreras A., Molina J.A., Benavent A., Marticorena A., Pardo, C., 2014. Disentangling the taxonomy and ecology of South American *Ranunculus* subgen. *Batrachium*. *Aquatic Botany*, 114: 21–28.
- Matsuoka Y., Yamazaki Y., Ogihara Y., Tsunewaki K., 2002. Whole chloroplast genome comparison of rice, maize, and wheat: implications for chloroplast gene diversification and phylogeny of cereals. *Molecular Biology and Evolution*, 19: 2084–2091.
- Melendo M., Cano E., Valle F., 2003. Synopsis of aquatic plant-communities of the class *Potametea* in the southern Iberian Peninsula. *Acta Botanica Gallica*, 150(4): 429–444.
- Mowszowicz J., 1938: *Flora i respoly roślinne „Gor Ponarskich“ i ich najlolszych okolic. – Wilno.*
- Mowszowicz J., 1958: *Conspectus florum Vilenensis. Przegląd flory wileńskiej. Część II. – Łódź.*

- Mucina L., Bültmann H., Dierßen K., Theurillat J.P., Raus T., Čarni A., Šumberová K., Willner W., Dengler J., Tichý L., 2016. Vegetation of Europe: hierarchical floristic classification system of vascular plant, bryophyte, lichen and algal communities. *Applied Vegetation Science*, 19: 3–264.
- Nagamitsu T., Kawahara T., Kanazashi A., 2006b. Endemic dwarf birch, *Betula apoiensis* (Betulaceae), is a hybrid that originated from *B. ermanii* and *B. ovalifolia*. *Plant Species Biology*, 21: 19–29.
- Nei M., Maruyama T., Chakraborty R., 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*, 29, 1–10.
- Nithaniyai S., Parani M., 2016. Evaluation of chloroplast and nuclear DNA barcodes for species identification in *Terminalia* L. *Biochemical Systematics and Ecology*, 68: 223–229.
- Nybom H., 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*, 13: 1143–1155.
- Oberdorfer E. (ed.), 1977. *Süddeutsche Pflanzengesellschaften*, Teil I. 2. Aufl. Stuttgart.
- Pahlevani A.H., Feulner M., Weig A., Schumann L.S., 2017. Molecular and morphological studies disentangle species complex in *Euphorbia* sect. *Esula* (Euphorbiaceae) from Iran, including two new species. *Plant Systematics and Evolution*, 303: 139–164.
- Peakall R., Smouse P.E., 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*, 28: 2537–2539.
- Petit R.J., Mousadik A.E., Pons O., 1998. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology*, 12: 844–855.
- Pizarro J., 1995. Contribucion al estudio taxonomico de *Ranunculus* L. subgen. *Batrachium* (DC.) A. Gray (Ranunculaceae). *Lazaroa*, 15: 21–113.

- Poynter A.J.W., 2014: Impact of environmental stressors on the river itchen *Ranunculus* community. Doctorol thesis. University of Birmingham. pp. 1–278.
- Pott R., 1995: Die Pflanzengesellschaften Deutschlands. 2nd ed. Stuttgart: E. Ulmer.
- Preston C.D., Croft J.M., 1997. Aquatic plants in Britain and Ireland. Harley Books, Martins, 365 pp.
- Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945–959.
- Rašomavičius V. (red.), 2012. EB svarbos natūralių buveinių inventorizavimo vadovas. Vilnius.
- Raubeson L. A., Jansen R. K., 2005. Chloroplast genomes of plants. In: Plant diversity and evolution: genotypic and phenotypic variation in higher plants, R. J. Henry (ed), Cambridge, MA: CABI, pp. 45–68.
- Reed D.H., Frankham R., 2003. Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology*, 17: 230–237.
- Rich T.C.G., Jermy A.C., 1998. Plant Crib. Botanical society of the British Isles. 56(2): 392.
- Rivas-Martínez S., Diaz T.E., Fernández-González F., Izco J., Loidi J., Lousã M., Penas A.. 2002. Vascular plant communities of Spain and Portugal. Addenda to the syntaxonomical checklist of 2001. *Itinera Geobotanica*, 15(1–2): 5–922.
- Robinson W.A, Liston A., Doescher P.S., Svejcar T., 1997. Using ISSR markers to quantify clonal vs. sexual reproduction in *Festuca idahoensis* (Poaceae). *American Journal of Botany*, 54: 84–89.
- Rodwell J.S. (Ed.), 1995: British plant communities, 4. Aquatic communities, swamps and tall-fen herbs. Cambridge University Press, Cambridge, pp.283.
- Rosenberg N.A., 2004. DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology*, 4(1): 137–138.

- Scarcelli N., Barnaud A., Eiserhardt W., Treier U.A., Seveno M., D'Anfray A., 2011. A set of 100 chloroplast DNA primer pairs to study population genetics and phylogeny in monocotyledons. PLoS ONE 6(5): e19954. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019954>.
- Shaw J., Lickey E., Beck J. T., Farmer S. B., Liu, W., Miller J., Siripun K. C., Winder C. T., Schilling E. E., Small R. L., 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *Biodiversity Conservation*, 92: 142–166.
- Shrestha M.K., Golan-Goldhirsh A., Ward D., 2002. Population genetic structure and the conservation of isolated populations of *Acacia raddiana* in the Negev Desert. *Biological Conservation* 108: 119–127.
- Simpson M. G., 2010. *Plant systematics*. Second edition. Academic Press, Oxford, pp. 585–601.
- Slawinski W., 1924. *Zielone Jeziora pod Wilnem*. Wilno.
- Snarskis P., 1954. *Vadovas Lietuvos TSR augalams pažinti*. Vilnius.
- Sokal R.R., Rohlf F.J., 1995. *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. Third edition. W.H. Freeman and Company: New York. XIX: 887 pp.
- Spink A.J., Murphy K.J., Westlake D.F., 1997. Distribution and environmental regulation of species of *Ranunculus* subgenus *Batrachium* in British rivers. *Archiv für Hydrobiologie*, 139: 509–525.
- StatSoft, 2014. *Statistica Data and Text Miner User Manual*. Tulsa, OK. StatSoft, Inc.
- Stech M., Quandt D., 2010. 20,000 species and five key markers: the status of molecular bryophyte phylogenetics. *Phytotaxa*, 9: 196–228.
- Steinberg E.K., Jordan C., 1998. Using molecular genetics to learn about the ecology of threatened species: The allure and the illusion of measuring genetic structure in natural populations. In: Fiedler, P.L., Kareiva, P.M. (Eds.), *Conservation Biology*. Chapman and Hall, New York, pp. 440–460.

- Sun J.H., Li Z.C., Jewett D.K., Britton K.O., Ye W.H., Ge X.J., 2005. Genetic diversity of *Pueraria lobata* (kudzu) and closely related taxa as revealed by inter-simple sequence repeat analysis. *Weed Research*, 45: 255–260.
- Sun B.N., Wu J.Y., Liu Y., Sheng C., Ding S.T., Li X.C., Xie S.P., Yan D.F., Lin Z.C., 2011. Reconstructing Neogene vegetation and climates to infer tectonic uplift in western Yunnan, China. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 304(3-4): 328–336.
- Šumberová K., 2011. Vegetace vodních rostlin zakořeněných ve dně (Potametea) Vegetation of aquatic plants rooted in the bottom. In: Chytrý M. (ed.), *Vegetace České republiky. 3. Vodní a mokřadní vegetace* [Vegetation of the Czech Republic 3. Aquatic and wetland vegetation]. Academia, Praha, pp. 100–247.
- Taylor A.C., Sherwin W.B., Wayne R.K., 1994. Genetic variation of microsatellite loci in a bottlenecked species: the northern hairy-nosed wombat *Lasiorhinus krefftii*. *Molecular Ecology*, 3: 277–290.
- Telford A., O'Hare M.T., Cavers S., Holmes N., 2011. Can genetic bar-coding be used to identify aquatic *Ranunculus* L. subgenus *Batrachium*? A test using some species from the British Isles. *Aquatic Botany*, 95: 65–70.
- Theis C., Reeder J., Giegerich R., 2008. KnotInFrame: prediction of –1 ribosomal frameshift events. *Nucleic Acids Research*, 36: 6013–6020.
- Tovar-Sánchez E., Rodríguez-Carmona F., Aguilar-Mendiola V., Mussali-Galante P., López-Caamal A., Valencia-Cuevas L., 2012. Molecular evidence of hybridization in two native invasive species: *Tithonia tubaeformis* and *T. rotundifolia* (Asteraceae) in Mexico. *Plant Systematics and Evolution*, 298: 1947–1959.
- Triest L., Thi V.T., Thi D.L., Sierens T., Van Geert A., 2010. Genetic differentiation of submerged plant populations and taxa between habitats. *Hydrobiologia*, 656: 15–27.
- Tzvelev N.N., 1998. Genus *Batrachium* (DC.) S.F.Gray (Ranunculaceae) in Eastern Europe. *Novitates Systematicae Plantarum Vascularium*, 31: 67–81.

- Valentini A., Miquel C., Nawaz M.A., Bellemain E., Coissac E., Pompanon F., Gielly L., Cruaud C., Nascetti G., Wincker P., Swenson J.E., Taberlet P., 2009. New perspectives in diet analysis based on DNA barcoding and parallel pyrosequencing: the *trnL* approach. *Molecular Ecology Resources*, 9: 51–60.
- Vekemans X., Beauwens T., Lemaire M., Roldan-Ruiz I., 2002. Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. *Molecular Ecology*, 11: 139–151.
- Vyšniauskienė R., Naugžemys D., Patamsytė J., Rančelienė V., Čėsniienė T., Žvingila D., 2015. ISSR and chloroplast DNA analyses indicate frequent hybridization of alien *Medicago sativa* subsp. *sativa* and native *M. sativa* subsp. *falcata*. *Plant Systematics and Evolution*, 301: 2341–2350.
- Vollrath H., Kohler A., 1972. *Batrachium*-Fundorte aus bayerischen Naturräumen. *Berichte der Bayerischen Botanischen Gesellschaft*, 43: 63–75.
- Wade A.J., Whitehead P.G., Hornberger G.M., Snoo D., 2002. Flow controls on phosphorus and macrophyte dynamics in the River Kennet, S. England. *Science of the Total Environment*, 282–283: 375–393.
- Wang A., Gopurenko D., Wu H., Lepshi B., 2017. Evaluation of six candidate DNA barcode loci for identification of five important invasive grasses in eastern Australia. *PLoS ONE* 12(4): e0175338. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175338>.
- Wang Y.H., Chen, J.M., Xu, C., Liu, X., Wang, Q.F., Motley, T.J., 2010. Population genetic structure of an aquatic herb *Batrachium bungei* (Ranunculaceae) in the Hengduan Mountains of China. *Aquatic Botany*, 92: 221–225.
- Wang F.H., Lu J.M., Wen J., Ebihara A., Li D.Z., 2016. Applying DNA barcodes to identify closely related species of ferns: a case study of the Chinese *Adiantum* (Pteridaceae). *PLoS ONE* 11(9): e0160611. [doi:10.1371/journal.pone.0160611](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160611).

- Webster S.D., Rich T.C.G., 1998. *Ranunculus* Subgenus *Batrachium*. In: Rich T.C.G., Jermy A.C. (Eds), Plant Crib. pp. 51–66.
- Webster S.D., 1988. *Ranunculus penicillatus* (Dumort.) Bab. in Great Britain and Ireland. *Watsonia*, 17: 1–22.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 18: 315–322.
- Widén B., Cronberg N., Widén M., 1994. Genotypic diversity, molecular markers and spatial distribution of genets in clonal plants, a literature survey. *Folia Geobotanica Phytotaxonomica*, 29: 245–263.
- Wiegleb G., Herr W., 1983. Taxonomie und Verbreitung, von *Ranunculus* subgenus *Batrachium* in niedersächsischen Fließgewässern unter besonderer Berücksichtigung des *Ranunculus penicillatus* komplexes. *Göttinger Floristische Rundbriefe*, 17: 101–150.
- Wiegleb G., Bobrov A., Zalewska-Gałosz J., 2017. A taxonomic account of *Ranunculus* section *Batrachium* (Ranunculaceae). *Phytotaxa*, 319: 001–055.
- Wolfe A.D., Xiang Q.Y., Kephart S.R., 1998a. Diploid hybrid speciation in *Penstemon* (Scrophulariaceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 95: 5112–5115.
- Wolfe A.D., Xiang Q.Y., Kephart S., 1998b. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable inter-simple sequence repeat markers. *Molecular Ecology*, 7: 1107–1125.
- Xing C., Tian Y., Guan F., Meng F., 2015. Evaluation of genetic diversity in *Amygdalus mira* (Koehne) Ricker using SSR and ISSR markers. *Plant Systematics and Evolution*, 301: 1055–1064.
- Zalewska-Gałosz J., Jopek M., Ilnicki T., 2014. Hybridization in *Batrachium* group: Controversial delimitation between heterophyllous *Ranunculus penicillatus* and the hybrid *Ranunculus fluitans* × *R. peltatus*. *Aquatic Botany*, 120: 160–168.

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