

JŪRMALAS ZILPODZES *ERYNGIUM MARITIMUM* L. LATVIJAS POPULĀCIJAS ĢENĒTISKĀS DAUDZVEIDĪBAS ANALĪZE

Baiba Ieviņa, Nils Rostoks, Ģederts Ieviņš

Latvijas Universitāte, Bioloģijas fakultāte, Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas katedra, Augu fizioloģijas katedra, Kronvalda bulvāris 4, Rīga, LV-1586, e-pasts: gederts@lanet.lv

Aizsargājamais augs jūrmalas zilpodze *Eryngium maritimum* L. Latvijā atrasts divās vietās – Ziemeļpē un Užavā. Ar kodola un hloroplastu molekulāro marķieru palīdzību noteikta ģenētiskā daudzveidība 53 Latvijas populācijas indivīdos un veikts salīdzinājums ar citām jūrmalas zilpodzes populācijām Eiropā. Latvijas populācijā novērots zems ģenētiskās daudzveidības līmenis un zema diferenciācijas pakāpe starp abām atradnēm Latvijas teritorijā. Latvijas populācija ir ģenētiski līdzīga Igaunijas populācijai, bet atšķirīga no Lietuvas populācijas, kura ir izteikti ģenētiski diferencēta.

Raksturvārdi: jūrmalas zilpodze, molekulārie marķieri, ģenētiskā daudzveidība

IEVADS

Jūrmalas zilpodze *Eryngium maritimum* L. ir daudzgadīgs čemurziežu dzimtas piekrastes augs, kam raksturīgais biotops ir priekškāpas. Jūrmalas zilpodze ir iekļauta Latvijas Sarkanās grāmatas 1. kategorijā un Latvijas Republikas Ministru kabineta īpaši aizsargājamo sugu sarakstā. Latvijas teritorijā pašreiz ir zināmas tikai divas jūrmalas zilpodzes atradnes, no kurām viena atrodas Liepājas rajona Ziemeļpē, bet otra – Ventspils rajona Užavā (skat. 1. attēlu).



1. attēls. Jūrmalas zilpodzes atradnes Latvijā.
Figure 1. Location of Latvian population of Sea Holly.

Kopumā abās atradnēs novēroti apmēram 100 – 150 augi. Latvijā jūrmalas zilpodze atrodas tuvu izplatības areāla ziemeļu robežai (skat. 2. attēlu). Tālāk uz ziemeļiem tā sastopama tikai Norvēģijas piekrastē un Igaunijas un Zviedrijas salās. Būtiski, ka jūrmalas zilpodzes populācija kopumā, kā arī indivīdu skaits Eiropā pēdējā laikā strauji samazinās (Łabuz 2007, Curle et al. 2007), tādēļ īpaši nozīmīgi ir izstrādāt šīs sugas aizsardzības plānu. Jūrmalas zilpodzes daudzveidība Rietumeiropā jau ir pētīta (Clausing et al. 2000), taču tā kā autori no katras populācijas analizēja tikai vienu indivīdu, tad šis pētījums nedod ieskatu jūrmalas zilpodzes populāciju ģenētiskajā struktūrā. Informācija par ģenētisko daudzveidību populāciju iekšienē un starp populācijām ir nepieciešama populāciju dinamikas prognozēšanai, sugas *in situ* un *ex situ* aizsardzības plāna izstrādei un sugas saglabāšanai. Molekulārās ģenētikas priekšrocības ir nedestruktīvas metodes (augi tiek saglabāti to dabiskajā vidē), informāciju iespējams iegūt salīdzinoši ātri un analizē tieši iedzimtības materiālu (genotipu), nevis genotipa izpausmes atkarībā no vides faktoriem (fenotipu).



2. attēls. Jūrmalas zilpodzes izplatības areāls. (Karte ņemta no Clausing et al. 2000)

Figure 2. Distribution range of Sea Holly. (Map from Clausing et al. 2000)

Populāciju ģenētiskās daudzveidības samazināšanās ir galvenais sugu izmiršanas cēlonis, jo ģenētiskā daudzveidība ir pamatā sugas spējam pielāgoties mainīgajiem ārējās vides apstākļiem. Katra indivīda spēju pielāgoties apkārtējai videi nosaka tā genotips (indivīda genomā kodēto īpašību kopums). Sugu un populāciju pielāgošanās spēju kopumā nosaka ģenētiskā daudzveidība to veidojošajos indivīdos. Vienkāršoti izsakoties, jo lielāka indivīdu daudzveidība, jo

lielāka iespēja sugai kopumā izdzīvot. Tradicionāli populāciju daudzveidība pētīta, izmantojot morfoloģiskos un bioķīmiskos parametrus, taču iegūto rādītāju daudzums parasti ir nepietiekams objektīvai daudzveidības novērtēšanai, kā arī šie rādītāji var būt atkarīgi no apkārtējās vides apstākļiem (Maxted et al. 2007, Schlötterer 2004). Pēdējos gados aizvien plašāk populāciju struktūras un ģenētiskās daudzveidības pētījumos tiek pielietotas molekulāro marķieru tehnoloģijas. Molekulārais marķieris ir specifisks DNS rajons, kas var tikt identificēts no visa kopējā genoma. Par marķieri var kalpot jebkura variācija (polimorfisms) genomā. Ģenētisko marķieru galvenā priekšrocība ir bezgalīgais rādītāju skaits, ko tie potenciāli var atklāt (Karp et al. 1996).

Molekulāros marķierus pašreiz sekmīgi pielieto lauksaimniecības augu pētījumos, kuru genomi ir samērā labi izpētīti. Ģenētiskos pētījumus pārsvarā veic ar lauksaimniecības augiem to ekonomiskās nozīmes dēļ, vai arī ar atsevišķiem modeļorganismiem (Stein 2007, Varshney et al. 2007). Pie vislabāk izpētītajiem augiem jāpieskaita tāla sīkplikstiņš *Arabidopsis thaliana* L. Heynh, rīsi *Oryza sativa* L., kvieši *Triticum aestivum* L. un mieži *Hordeum vulgare* L. Lai gan ne visu lauksaimniecības augu genomi ir nosekvenēti, ir pieejamas tūkstošiem gēnu sekvences un daudz dažādu molekulāro marķieru, kas ļauj pētīt ģenētisko daudzveidību gan lauksaimniecības augu šķirnēs, gan to savvaļas radniekos (Varshney et al. 2005). Sākot jau no pagājušā gadsimta 80-tajiem gadiem, molekulāro marķieru tehnoloģijas ir strauji attīstījušās un augu ģenētikā veiksmīgi ir pielietotas restrikcijas fragmentu garuma polimorfisma (RFLP) (Botstein et al. 1980), mikrosatelītu (MS) (Litt and Luty 1989), amplificēto fragmentu garuma polimorfisma (AFLP) (Vos et al. 1995) un punktveida mutāciju (SNP) genotipēšanas metodes (Bornet & Branchard 2001, Rafalski 2002). Šo molekulāro marķieru pielietojums atkarīgs no informācijas pieejamības par konkrēto augu un tā genomu. Piemēram, mikrosatelītu analīzei nepieciešama informācija par DNS sekvencēm, kas atrodas ap MS lokusu un dod iespēju to selektīvi amplificēt izmantojot polimerāzes ķēdes reakciju (PCR). Savvaļas augi nav tik plaši pētīti kā kultūraugi un vairumā gadījumu sekvences informācija par savvaļas augu genomu nav pieejama, tādēļ izmantojamo marķieru skaits ir ierobežots. Tādēļ bieži vien ir nepieciešams izvēlēties kādu no „universālām” marķieru sistēmām, kuru pielietošanai nav nepieciešama iepriekšēja informācija par pētāmās sugas genomu (Weising et al. 2005).

Atšķirībā no dzīvniekiem, augu šūnas satur ne tikai kodola un mitohondriju genomu, bet arī hloroplastu genomu. Ziedaugos to līdzīgi kā mitohondriju genomu nodod pa mātes līniju un to plaši pielieto filoģenētiskajos un populāciju ģenētiskās daudzveidības pētījumos. Lai gan hloroplastu genoms ir samērā nemainīgs, cpDNS nekodējošie rajoni, piemēram, introni un starpgēnu rajoni, evolucionē daudz straujāk nekā kodējošie rajoni gan punktveida mutāciju skaita ziņā, gan inserciju un delēciju uzkrāšanās ziņā. Tādēļ nekodējošie rajoni ir daudz variablāki par kodējošiem rajoniem (Zhang and Hewitt 2003). Šī iemesla dēļ tos plaši izmanto filoģenētiskajos un daudzveidības pētījumos lai atklātu ģenētiskās atšķirības starp tuviem taksoniem vai atsevišķām populācijām sugas iekšienē.

Šajā darbā mēs pētījām ģenētisko daudzveidību jūrmalas zilpodzes Latvijas populācijā un salīdzinājām to ar citām Eiropas jūrmalas zilpodzes populācijām. Pētījuma rezultāti palīdzēs novērtēt Latvijas populācijas statusu un izstrādāt efektīvākus sugas aizsardzības pasākumus.

MATERIĀLI UN METODES

Paraugu ievākšana

Jūrmalas zilpodzes *Eryngium maritimum* L. Latvijas populācijas ģenētiskās daudzveidības pētījumus uzsāka 2006. gada rudenī. 2006. gada oktobrī apsekoja zilpodzes populācijas Liepājas rajona Ziemupē un Ventpils rajona Užavā, nosakot individuālo augu ģeogrāfiskās koordinātes un ievācot lapu paraugus DNS analīzēm no 53 individuāliem augiem. 2007. gada vasaras sezonā veica vairākas ekspedīcijas jūrmalas zilpodzes paraugu ievākšanai no Igaunijas, Lietuvas, Polijas un Lielbritānijas populācijām, lai novērtētu Latvijas populāciju daudzveidību Eiropas populāciju kontekstā, kā arī, lai noteiktu populāciju ģenētisko diferenciāciju un varbūtējo gēnu plūsmu starp populācijām. Ekspedīcijās ievāca sekojošus paraugus:

1. Igaunija (Kihnu sala) – 10 indivīdi;
2. Lietuva (Kuršu kāpa) - 10 indivīdi;
3. Polija (*Krynica Morska, Piaski, Dabki, Lazy, Swinousczje*) – 31 indivīds;
4. Lielbritānija (*Prestatyn, Newborough, Formby*) – 27 indivīdi.

DNS ekstrakcija

DNS ekstrakciju veica, izmantojot genomiskās DNS izdalīšanas komplektu (*genomic DNA purification kit, Fermentas, Viļņa, Lietuva*) sekojot ražotāja protokolam. Izdalīto DNS elektroforētiski vizualizēja 1% agarozes gēlā UV gaismā (*BioSpectrum® AC Imaging System, Ultra-Violet Products, Kembridža, Lielbritānija*).

ISSR analīze

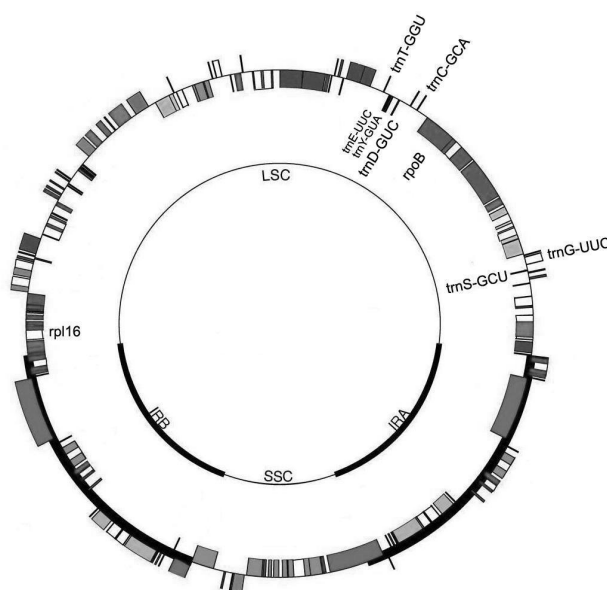
Informācijas trūkums par jūrmalas zilpodzes genomu noteica izvēlētās marķieru sistēmas – hloroplastu genoma mainīgo rajonu sekvenču analīzi un kodola genoma analīzi ar standarta ISSR praimeriem (Weising et al. 2005). Izmantotie genoma rajoni ir ar augstu mainības pakāpi, tādēļ ir īpaši piemēroti ģenētiskās daudzveidības pētījumiem sugas iekšienē.

ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeats*) analīzei izmantoja četrus praimerus (ISSR_848, ISSR_860, ISSR_885 un ISSR_OC), kuri jau sekmīgi pielietoti jūrmalas zilpodzes genoma analīzei (Clausing et al. 2000). Polimerāzes ķēdes reakcijas (PCR) apstākļi tika optimizēti izmantotajiem paraugiem un PCR veica sekojošos apstākļos: sākotnēja denaturācija - 95 °C 5 min, DNS denaturācija - 95 °C 30 s, praimeru hibridizācija - 52 °C 30 s, DNS sintēze 72 °C 1 min 30 s, beigu pagarināšana 72 °C 10 min, soļus 2 - 4 atkārtoja 50 reizes. Rezultātu

atkārtojamības pārbaudei DNS amplifikāciju ar katru praimeru atkārtoja divas reizes. Amplifikācijas rezultātus vizualizēja UV gaismā 2% agarozes gēlā, kas krāsots ar etīdija bromīdu. Veica gēla attēla analīzi saskaitot amplificētās zonas dažādiem paraugiem.

Hloroplastu DNS sekvences analīze

Balstoties uz literatūras datiem par hloroplastu genoma rajoniem, kas sekmīgi pielietoti ģenētiskās daudzveidības analīzei sugu un populāciju līmenī (Shaw et al., 2005; Downie et al., 2000), jūrmalas zilpodzes ģenētiskajai analīzei izvēlējās četrus hloroplastu genoma nekodējošos rajonus – *rpl16* gēna introns, gēnu *trnD-trnT* starpgēnu rajons, gēnu *rpoB-trnC* starpgēnu rajons un gēna *trnG* introns kopā ar gēnu *trnS-trnG* starpgēnu rajonu. Analizēto rajonu atrašanās vieta hloroplastu genomā attēlota 3. attēlā. Veica PCR reakciju un PCR produktus vizualizēja UV staru gaismā 1% agarozes gēlā, kas krāsots ar etīdija bromīdu. PCR produktus attīrīja, izmantojot DNS attīrīšanas komplektu (*DNA Extraction Kit, Fermentas, Lietuva*) sekojot ražotāja protokolam. Attīrītos PCR produktus izmantoja sekvenēšanas reakcijā, kuru veica izmantojot Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (*Applied Biosystems, Foster City, ASV*).



3. attēls. Analizēto nekodējošo rajonu atrašanās vieta hloroplastu genomā. (Attēls pēc Ruhlman et al. 2006, izmainīts)

Figure 3. Distribution of analyzed noncoding regions in chloroplast genome. (Picture after Ruhlman et al. 2006, changed)

Datu analīze

Ar ISSR marķieru sistēmu iegūtos datus apstrādāja datorprogrammās *VisionWorks* (*Ultra Violet Products*, Kembridža, Lielbritānija) un *Microsoft Excel* (*Microsoft*, Redmonda, ASV). Konstruēja datu matricu, kurā ar 1 apzīmēja zonas esamību konkrētam indivīdam, bet ar 0 zonas iztrūkumu. Indivīdi, kuriem DNS fragmenti ar attiecīgo praimeru netika amplificēti vai arī, kuriem fragmenti amplificējās tikai vienā no divām atkārtotības reizēm, no analīzes tika izslēgti. Starp indivīdiem aprēķināja ģenētiskās distances izmantojot Eiklīda koeficientu un konstruēja dendrogrammu izmantojot *Neighbour-Joining* metodi programmā *NTSYSpc 2.2* (Rohlf 1990).

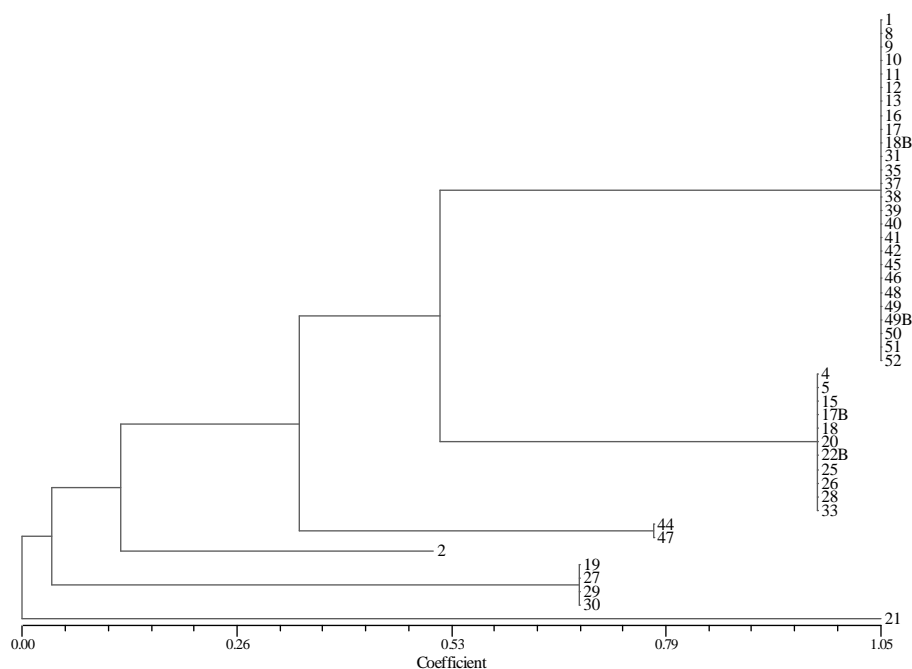
DNS sekvenču, kuras ieguva analizējot hloroplasta nekodējošos rajonus, apstrādāja izmantojot *Staden* programmu paketes 1.6.0 (Staden 1996) apakšprogrammas *preGap4* un *Gap4*. No dažādiem indivīdiem iegūtās noteiktā hloroplastu genoma rajona sekvenču ievadīja vienotā datu bāzē. Atšķirības starp DNS sekvenču no dažādiem indivīdiem pārbaudīja un rediģēja manuāli, aplūkojot hromatogrammas. Iegūto DNS sekvenču identitāti pārbaudīja ar *BLAST* homoloģijas analīzi *GenBank* datubāzē.

REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Izmantojot hloroplastu genoma nekodējošos rajonus – *rpl16* gēna intronu, gēnu *trnD-trnT* starpgēnu rajonu, gēnu *rpoB-trnC* starpgēnu rajonu un gēna *trnG* intronu kopā ar gēnu *trnS-trnG* starpgēnu rajonu starp visiem analizētajiem indivīdiem gan Latvijas populācijā, gan populācijās no Lietuvas, Igaunijas, Polijas un Lielbritānijas visos analizētajos rajonos analīzes neuzrādīja ģenētisko polimorfismu klātbūtni. Lai gan kopumā visos četros hloroplastu genoma rajonos analizēja vairāk nekā 4600 bp garas sekvenču, neatrada ne nukleotīdu nomaiņas, ne insercijas vai delēcijas. Hloroplastu nekodējošo rajonu analīze liecina par to, ka Latvijas populācija ir ģenētiski vienvēidīga, kā arī to, ka nepastāv ģenētiskā diferenciacija starp abām Latvijas jūrmalas zilpodzes atradnēm Užavā un Ziemupē. Interesanti, ka arī jūrmalas zilpodzes ārzemju populāciju un indivīdu starpā nenovēroja atšķirības sekvenču, lai gan paraugi bija ievākti no ģeogrāfiski attāliem reģioniem. Lai gan hloroplastu genoma sekvenču bieži pielieto ģenētiskās daudzveidības analīzei starp vienas sugas populācijām (Shaw et al. 2005), jāsecina, ka izvēlētie rajoni acīmredzot nav piemēroti jūrmalas zilpodzes populāciju analīzei. Tādējādi nepieciešama jutīgāka marķieru sistēma, lai atklātu ģenētisko diferenciaciju starp jūrmalas zilpodzes populācijām.

No četriem izmantotajiem ISSR praimeriem Latvijas populācijā tikai viens praimeris – ISSR_OC starp 53 analizētajiem indivīdiem uzrādīja polimorfismu atsevišķu indivīdu starpā. Pārējo trīs izmantoto praimeru (ISSR_848, ISSR_860 un ISSR_885) amplificētās zonas vai nu nebija polimorfas vai arī nebija iespējama pārliecinoša un ticama zonu nolasišana no gēla. Datu kopu analizējot ar *Neighbour-*

Joining metodi, kas balstīta uz Eiklīda ģenētiskajām distancēm, konstruēja dendrogrammu (skat. 4. attēlu), kur 82% no visiem analizētajiem indivīdiem veido divas galvenās grupas. Lielākajā atzarojumā ir grupēti indivīdi no abām Latvijas atradnēm – gan no Ziemupes, gan no Užavas. Otrajā atzarojumā ir grupējušies indivīdi tikai no Ziemupes atradnes (taču ne visi Ziemupes atradnes indivīdi). Abos galvenajos zaros visi indivīdi ir savstarpēji ģenētiski identiski. Pārējie dendrogrammas atzari neizrāda noteiktu tendenci. Uz ISSR rezultātiem balstītā *Neighbour-Joining* analīze atklāja, ka Latvijas jūrmalas zilpodzes populācija ir ģenētiski homogēna un ģenētiskā diferenciācija abu atradņu starpā ir niecīga. Lai gan neliela ģenētiskā diferenciācija abu Latvijas atradņu starpā pastāv, abas Latvijas atradnes pārsvarā ietver ģenētiski identiskus indivīdus.

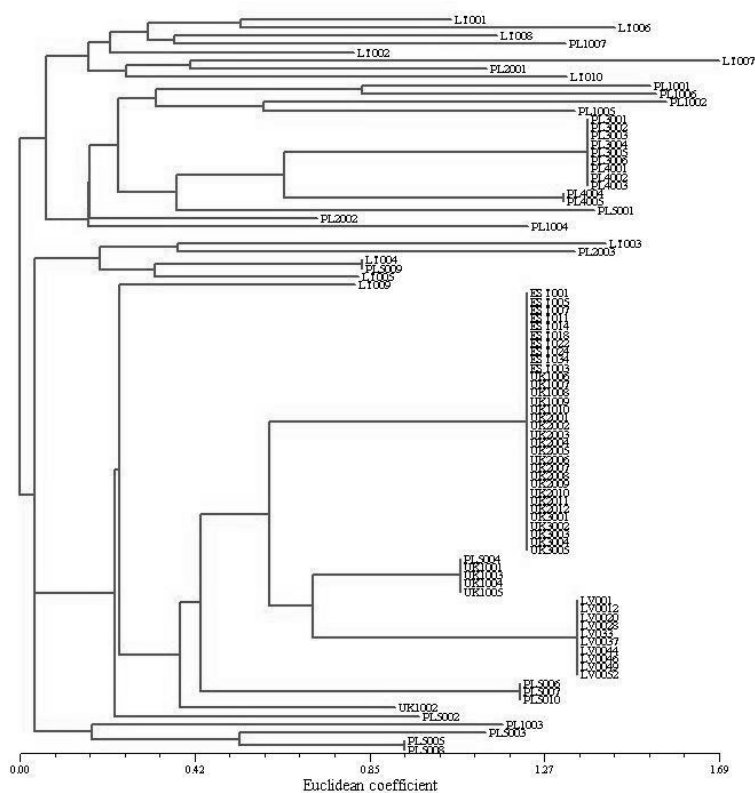


4. attēls. Latvijas populācijas Neighbour-Joining dendrogramma, kas balstīta uz ISSR marķieru amplificētajiem DNS fragmentiem.

Figure 4. Neighbour-Joining dendrogram of population from Latvia based on amplified DNA fragments with ISSR markers.

Ar ISSR marķierim analizējot pārējās jūrmalas zilpodzes Eiropas populācijas no četriem izmantotajiem ISSR praimeriem visās populācijās polimorfi bija trīs praimeru (ISSR_848, ISSR_860 un ISSR_885), tomēr pārliecinoša gēla nolasīšana bija iespējama tikai vienam - ISSR_848 praimerim. Uz šī praimera datiem balstīta turpmākā datu analīze un *Neighbour-Joining* dendrogramma. Iegūtā dendrogramma parāda Latvijas jūrmalas zilpodzes populācijas stāvokli citu Eiropas

zilpodzes populāciju kontekstā. No iegūtās dendrogrammas redzams, ka Latvijas populācijai vistuvākās ir Igaunijas un Lielbritānijas populācijas, kuras līdzīgi Latvijas populācijai ir ģenētiski homogēnas (skat. 5. attēlu). Interesanti, ka Igaunijas un Lielbritānijas populācijas veido vienu indivīdu grupu, norādot uz to, ka Igaunijas un Lielbritānijas populācijas ir ģenētiski vienādas. Pretēji homogēnajai Igaunijas zilpodzes populācijai Lietuvas populācija ietver ģenētiski atšķirīgus indivīdus un ir ģenētiski daudzveidīgākā no analizētajām populācijām. Polijas zilpodzes populācijas ir līdzīgas Lietuvas populācijai, bet ietver gan ģenētiski daudzveidīgus, gan arī identiskus indivīdus. ISSR marķieru pielietojums parāda, ka ģenētiskās atšķirības jūrmalas zilpodzes populāciju starpā pastāv. Tomēr, iegūtie rezultāti jāvērtē kritiski, jo nepieciešams lielāks skaits polimorfu ISSR marķieru, lai objektīvi varētu novērtēt daudzveidību populāciju starpā.



5. attēls. Visu analizēto jūrmalas zilpodzes populāciju Neighbour-Joining dendrogramma, kas balstīta uz ISSR marķieru amplificētajiem DNS fragmentiem. LV – Latvijas, LT – Lietuvas, EST – Igaunijas, PL – Polijas, UK – Lielbritānijas populācijas.

Figure 4. Neighbour-Joining dendrogram of all populations analyzed based on amplified DNA fragments with ISSR markers. Populations from: LV – Latvia, LT – Lithuania, EST – Estonia, PL – Poland, UK – United Kingdom.

Abu Latvijas atradņu ģenētisko vienveidību un zemu diferenciacijas līmeni varētu skaidrot ar krasu jūrmalas zilpodzes indivīdu skaita samazināšanos. Pēc Latvijas PSR floras datiem senāk jūrmalas zilpodzes izplatības apgabals Latvijas teritorijā ir bijis plašāks un sugas atradnes bijušas arī Papes ezera teritorijā, Sārnatē (Galenieks u.c. 1957) un Pāvilostas apkārtnē (Andrušaitis u.c. 1985). Taču pēdējos gados nav ziņu par sugas atradnēm šajās teritorijās, tādēļ varētu spriest, ka šīs atradnes ir iznīkušas, bet to iznīkšanas iemesli nav zināmi. Literatūrā pieejamas ziņas, ka suga atsevišķu indivīdu veidā ir bijusi sastopama visā posmā gar Latvijas rietumu piekrasti no Papes līdz Ventspilij (Baroniņa un Lodziņa 1992), bet pašlaik ziņu par atradnēm šajā posmā nav. Tomēr lai to droši varētu apgalvot, būtu nepieciešama detalizēta šīs teritorijas izpēte. Zināms, ka strauja populācijas izmēra samazināšanās izraisa retu allēļu pazūšanu no populācijas, kas noved pie ģenētiskās daudzveidības samazināšanās (Tomimatsu and Ohara 2003).

Šajā pētījumā iegūtie rezultāti apstiprina iepriekšējo pētījumu, kurā ribosomālās DNS (rDNS) variablu rajonu sekvences analīze un mikrosatelītu rajonu analīze, izmantojot praimerus no radniecīgas sugas *Eryngium alpinum*, uzrādīja zemu ģenētiskās daudzveidības līmeni jūrmalas zilpodzes Latvijas atradnēs (Ieviņa 2007). Turpinot pētījumu par jūrmalas zilpodzes populāciju daudzveidību un ģenētisko struktūru plānots ievākt paraugus vēl no citām Eiropas jūrmalas zilpodzes populācijām un izstrādāt jaunu marķiersistēmu – retrotranspozonu SSAP (*Sequence-specific amplification polymorphisms*) marķierus (Syed and Flavell 2006).

SECINĀJUMI

1. Četru hloroplastu genoma rajonu sekvences analīze neatklāja ģenētiskās atšķirības ne Latvijas populācijā, ne starp Latvijas, Igaunijas, Lietuvas, Polijas vai Lielbritānijas populācijām.
2. Izmantotā kodola ISSR marķieru sistēma norādīja, ka abas Latvijas jūrmalas zilpodzes atradnes ir ģenētiski homogēnas, kā arī to, ka ģenētiskā diferenciacija starp atradnēm ir niecīga.
3. ISSR analīze ārzemju populācijās norādīja, ka pastāv ģenētiskā diferenciacija gan starp atsevišķām Eiropas populācijām, gan arī šo populāciju iekšienē.
4. Nepieciešams attīstīt jaunas marķieru sistēmas, kas spētu atklāt ģenētisko daudzveidību jūrmalas zilpodzes populācijās.

PATEICĪBAS

Pētījums veikts ar Latvijas Vides aizsardzības fonda projekta "Jūrmalas zilpodzes (*Eryngium maritimum*) Latvijas populācijas fizioloģiskā stāvokļa un ģenētiskās daudzveidības izpēte" (1-08/459/2006), kā arī LU pētniecības projektu ZP-20 un ZP-59 atbalstu. Autori ir pateicīgi Anetei Keišai un Annai Mežakai par palīdzību datu analīzē.

LITERATŪRA

- Andrušaitis G., Aigare V., Lipsbergs J., Lodziņa I., Tabaka L. 1985.** *Latvijas PSR Sarkanā grāmata: retās un iznīkstošās dzīvnieku un augu sugas.* Zinātne, Rīga, 526 lpp.
- Baroniņa V., Lodziņa I. 1992.** *Populārzinātniskā Latvijas Sarkanā grāmata. Augi.* Rīga: Zinātne, 137 lpp.
- Bornet B., Branchard M. 2001.** Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19: 209-215.
- Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. 1980.** Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32: 314-331.
- Clausing G., Vickers K., Kadereit J.W. 2000.** Historical biogeography in a linear system: genetic variation of sea rocket (*Cakile maritima*) and sea holly (*Eryngium maritimum*) along European coasts. *Molecular Ecology* 9 (11): 1823-1833.
- Curle C.M., Stabbetorp O.E., Nordal I. 2007.** *Eryngium maritimum*, biology of a plant at its northernmost localities. *Nordic Journal of Botany* 24 (5): 617-628.
- Downie S.R., Katz-Downie D.S., Watson M.F. 2000.** A phylogeny of the flowering plant family *Apiaceae* based on chloroplast DNA *rpl16* and *rpoC1* intron sequences: towards a suprageneric classification of subfamily *Apioidae*. *American Journal of Botany*. 87 (2): 273-292.
- Galenieks P., Bumbure M., Jaunzeme V., Līvena Dz., Pētersone A. 1957.** *Latvijas PSR flora.* 3. sējums. Latvijas Valsts izdevniecība, Rīga, 459 lpp.
- Ieviņa B. 2007.** *Apdraudētās auga jūrmalas zilpodzes Eryngium maritimum L. Latvijas populāciju ģenētiskās daudzveidības analīze.* Bakalaura darbs. Rīga, Latvijas Universitāte, 64 lpp.
- Karp A, Seberg O, Buiatti M. 1996.** Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. *Annals of Botany* 78:143-149.

- Łabuz T.A. 2007.** Evaluation of past and present sea holly (*Eryngium maritimum*) habitats on Polish coastal dunes. *Acta Universitatis Latviensis, Biology* 723: 99-114.
- Litt M., Luty J.A. 1989.** A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics* 44: 397-401.
- Maxted N, Ford-Lloyd BV, Hawkes JG 1997.** *Plant genetic conservation. The in situ approach.* Chapman & Hall, London, 446 pp.
- Rafalski A. 2002.** Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Current Opinions in Plant Biology* 5: 94-100.
- Rohlf F.J. 1990.** *NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system.* Exeter Software, New York.
- Ruhlman T, Lee SB, Jansen RK, Hostetler JB, Tallon LJ, Town CD, Daniell H 2006.** Complete plastid genome sequence of *Daucus carota*: implications for biotechnology and phylogeny of angiosperms. *BMC Genomics* 7: 222.
- Schlötterer C. 2004.** The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics* 5: 63-69.
- Shaw J., Lickey E.B., Beck J.T., Farmer S.S., 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. *American Journal of Botany* 92:142-166.
- Staden R. 1996.** The Staden sequence analysis package. *Molecular Biotechnology* 5(3): 233-241.
- Stein N. 2007.** Triticeae genomics: advances in sequence analysis of large genome cereal crops. *Chromosome Research* 15: 21-31.
- Syed N.H., Flavell A.J. 2006.** Sequence-specific amplification polymorphisms (SSAPs): a multi-locus approach for analyzing transposon insertions. *Nature Protocols* 1: 2746-2752.
- Tomimatsu H., Ohara M. 2003.** Genetic diversity and local population structure of fragmented populations of *Trillium camschatcense* (Trilliaceae). *Biological Conservation* 109: 249–258.
- Varshney R.K., Graner A., Sorrells M.E. 2005.** Genomics-assisted breeding for crop improvement. *Trends in Plant Sciences* 10: 621-630.
- Varshney R.K., Langridge P., Graner A. 2007.** Application of genomics to molecular breeding of wheat and barley. *Advances in Genetics* 58: 121-155.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. 1995.** AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.
- Weising K., Nybom H., Wolff K., Kahl G. 2005.** *DNA fingerprinting in plants. Principles, methods and applications.* CRC Press. Boca Raton, 444 pp.
- Zhang D., Hewitt G.M. 2003.** Nuclear DNA analysis in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology* 12: 563-584.

Genetic diversity in Latvian populations of Sea Holly *Eryngium maritimum* L.

Nils Rostoks, Baiba Ieviņa, Ģederts Ieviņš

Summary

Keywords: Sea Holly, *Eryngium maritimum*, molecular markers, genetic diversity.

Protected plant Sea Holly *Eryngium maritimum* L. is found at two places in Latvia – Ziemeupe and Užava. Estimation of genetic diversity in 53 individuals from Latvian population with nuclear and chloroplast molecular markers has been done as well as comparison with other Sea Holly populations in Europe. Low genetic diversity has been observed in Latvian population and low genetic differentiation between both subpopulations. Latvian population is genetically similar to Estonian Sea Holly population but varied from Lithuanian population which is genetically highly differenced.